

**Agnieszka Grzywna**

**Ocena występowania alfa- i beta-defensyn  
w ślinie osób dorosłych z aktywną próchnicą zębów  
lub przewlekłym zapaleniem przyzębia**

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Promotor

Dr hab. n. med. Tomasz M. Karpiński

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2019

Składam serdeczne podziękowania promotorowi pracy

**Dr hab. n. med. Tomaszowi M. Karpińskiemu**

Kierownikowi Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

za życzliwość, opiekę merytoryczną i wszechstronną pomoc w realizacji tej pracy.

**Dziękuję Moim Kochanym Dzieciom  
za ich miłość i wsparcie.**

# SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI .....	4
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....	5
1. WSTĘP .....	6
1.1. Próchnica zębów .....	6
1.2. Przewlekłe zapalenie przyzębia .....	13
1.3. Defensyny.....	16
1.3.1. Defensyny alfa.....	17
1.3.2. Defensyny beta .....	20
2. CEL PRACY .....	23
3. MATERIAŁ I METODY .....	24
3.1. Grupy badawcze .....	24
3.2. Materiał badawczy .....	26
3.3. Badanie stomatologiczne.....	27
3.4. Zasada oznaczenia poziomów defensyn.....	32
3.5. Analiza statystyczna .....	35
4. WYNIKI.....	36
4.1. Wyniki badania stomatologicznego pacjentów .....	36
4.2. Wyniki badania poziomów defensyn .....	37
4.3. Wyniki badania korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi oraz poziomami defensyn .....	41
5. DYSKUSJA .....	45
6. WNIOSKI.....	50
7. STRESZCZENIE .....	51
8. SUMMARY .....	53
9. WYKAZ TABEL I RYCIN .....	55
10. PIŚMIENNICTWO .....	58
11. ZAŁĄCZNIKI.....	71

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

CAL – kliniczna utrata przyczepu łącznotkankowego

CBCT – (ang. Cone Beam Computed Tomography) tomografia komputerowa z wiązką promieniowania w kształcie stożka; tomografia wolumetryczna

ELISA – (ang. Enzyme-linked immunosorbent assay) test immunoenzymatyczny

EPS – (ang. extracellular polymeric substance) zewnątrzkomórkowa substancja polimerowa

GI – wskaźnik dziąsłowy

HBD – defensyna beta

HNP – defensyna alfa

IFN- $\gamma$  – interferon gamma

IL-1 $\beta$  – interleukina 1-beta

LPS – lipopolisacharyd

P – liczba zębów z aktywną chorobą próchnicową

PD lub PPD – głębokość kieszonek przyzębnych

PI.I – wskaźnik płytki nazębnej

PUW – liczba, która jest sumą zębów z próchnicą pierwotną lub wtórną (P), zębów usuniętych z powodu próchnicy (U) oraz zębów, w których stwierdza się wypełnienia (W)

PUWP – liczba PUW, odnosząca się do odpowiednich powierzchni

TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworów alfa

U – liczba zębów usuniętych z powodu próchnicy

W – liczba zębów wypełnionych

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia

# 1. WSTĘP

## 1.1. Próchnica zębów

Wśród gatunków mikroflory jamy ustnej człowieka opisanych zostało 770 bakterii [HOMD, 2018], u każdej osoby w jamie ustnej występuje około 200-300 gatunków. Około 57% tych mikroorganizmów jest hodowlanych i posiada nazwy gatunkowe, 13% nie posiada nazwy, ale można je hodować, a 30% jest niehodowlane i nie posiada nazwy [Verma i wsp., 2018]. Sekwencjonowanie 16S rRNA wykazało, że 96% wszystkich bakterii jamy ustnej należy do 11 rodzajów i jednej rodziny, sklasyfikowanych w pięciu gromadach: Firmicutes (rodzaje *Streptococcus*, *Granulicatella*, rodzina Veillonellaceae), Proteobacteria (rodzaje *Neisseria*, *Haemophilus*), Actinobacteria (rodzaje *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*), Bacteroidetes (rodzaje *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*) i Fusobacteria (rodzaj *Fusobacterium*) [Zaura i wsp., 2009]. Dewhirst i wsp. opisali dodatkowo szóstą istotną gromadę Spirochaetes z rodzajem *Treponema* [Dewhirst i wsp., 2010]. Bakterie kolonizują różne obszary jamy ustnej, m.in. zęby, szczeliny dziąsłowe, język, błonę śluzową policzków i podniebienia. W przypadku dysbiozy, czyli zaburzeń mikroflory jamy ustnej niektóre bakterie stają się czynnikiem etiologicznym chorób, takich jak próchnica, choroby dziąseł i przyzębia [Paster i wsp., 2006; He i Shi, 2009].

Próchnica zębów jest przewlekłą chorobą bakteryjną, w której dochodzi do demineralizacji oraz rozpadu proteolitycznego tkanek twardych zęba [Faustova i wsp., 2018]. Istotną rolę w rozwoju próchnicy posiada biofilm płytki nazębnej. Biofilm jest złożoną strukturą mikroorganizmów oraz produkowanych przez nie substancji organicznych i nieorganicznych. W płytce nazębnej występują także składniki śliny, złuszczone komórki nabłonka i leukocyty oraz macierz, będąca zewnątrzkomórkową substancją polimerową (EPS, ang. extracellular polymeric substance). EPS jest mieszaniną polisacharydów, białek, kwasów nukleinowych, lipidów i innych związków. EPS jest trójwymiarową strukturą łączącą komórki mikroorganizmów i zapewniającą stabilność biofilmu. EPS chroni również obecne w niej bakterie i czasami grzyby przed czynnikami zewnętrznymi, takimi jak stres środowiskowy, odwodnienie, substancje przeciwbakteryjne, w tym antybiotyki [Vu i wsp., 2009; Fleming i Wingender, 2010]. Produkcja EPS zależy m.in. od obecności dostarczanych

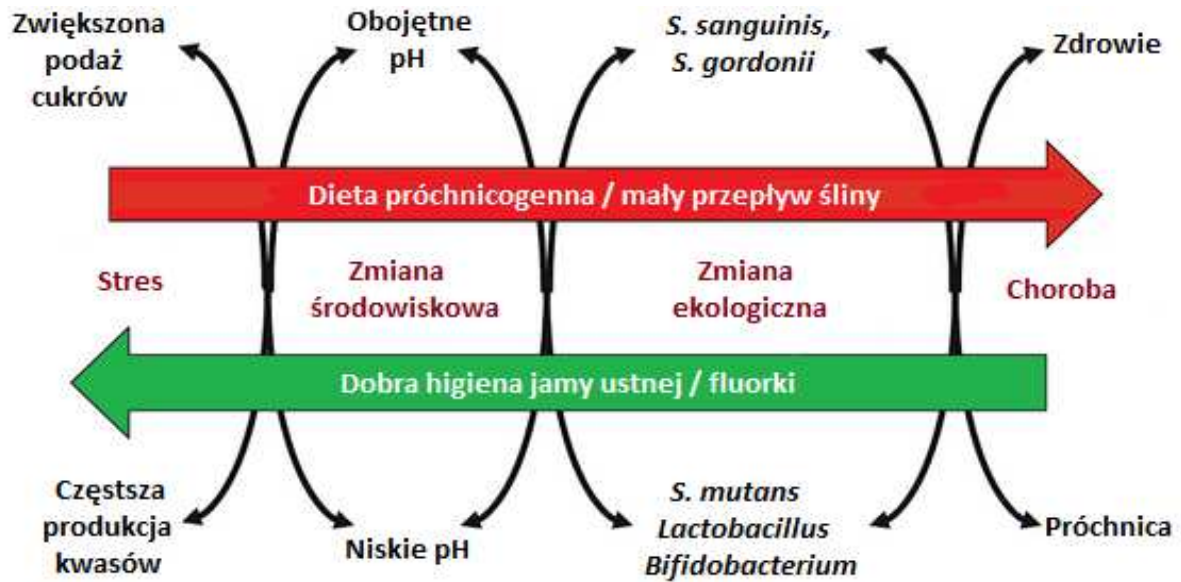
z pożywieniem węglowodanów, głównie sacharozy. Bogate energetycznie wiązanie glikozydowe między ugrupowaniami glukozy i fruktozy w sacharozie dostarcza energii potrzebnej do syntezy EPS. Homopolisacharydy glukozy nazywane są glukanami i wytwarzane są przez glukozylotransferazy, zaś homopolisacharydy fruktozy nazywane są fruktanami i wytwarzane są przez fruktozylotransferazy. W produkcji glukanów biorą udział bakterie z rodzaju *Streptococcus* i *Lactobacillus*, zaś w produkcji fruktanów bakterie *Streptococcus* i *Actinomyces* [Monsan i wsp., 2001; Rozen i wsp., 2001; Barrientos i Rodrigues, 2011].

Tworzenie płytki nazębnej jest procesem wieloetapowym i bardzo dynamicznym. Proces ten rozpoczyna się już po kilku sekundach od czasu oczyszczenia zębów. W pierwszym etapie ząb zostaje pokryty tzw. błonką nabytą utworzoną przez cząsteczki śliny, w tym glikoproteiny, białka bogate w prolinę, mucyny i kwas sjałowy. Błonka nabyta chroni zęby przed czynnikami mogącymi wywołać erozję szkliwa, a jednocześnie umożliwia adhezję bakterii do zębów. W ciągu pierwszych 4 godzin następuje zasiedlanie błonki przez pojedyncze ziarniaki Gram-dodatnie, które namnażając się tworzą mikrokolonie. W późniejszym okresie bakterie, głównie *Streptococcus sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. mutans* i *Actinomyces viscosus* produkują składniki macierzy, co prowadzi do powstania biofilmu [Pasich i wsp., 2013; Kalesinskas i wsp., 2014]. Na etapach początkowych najważniejszą rolę w płytce nazębnej odgrywają bakterie Gram-dodatnie, głównie z rodzajów *Streptococcus*, *Gemella* i *Granulicatella*. Z czasem wzrasta liczba pałeczek Gram-dodatnich z rodzajów *Actinomyces* i *Corynebacterium*. Wraz z rozwojem biofilmu, w płytce nazębnej dochodzi do zmian biochemicznych i pojawiają się bakterie beztlenowe, głównie Gram-ujemne z rodzajów *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Capnocytophaga* i *Fusobacterium* [Aas i wsp., 2005; Hojo i wsp., 2009; Huang i wsp., 2011; Chałas i wsp., 2015].

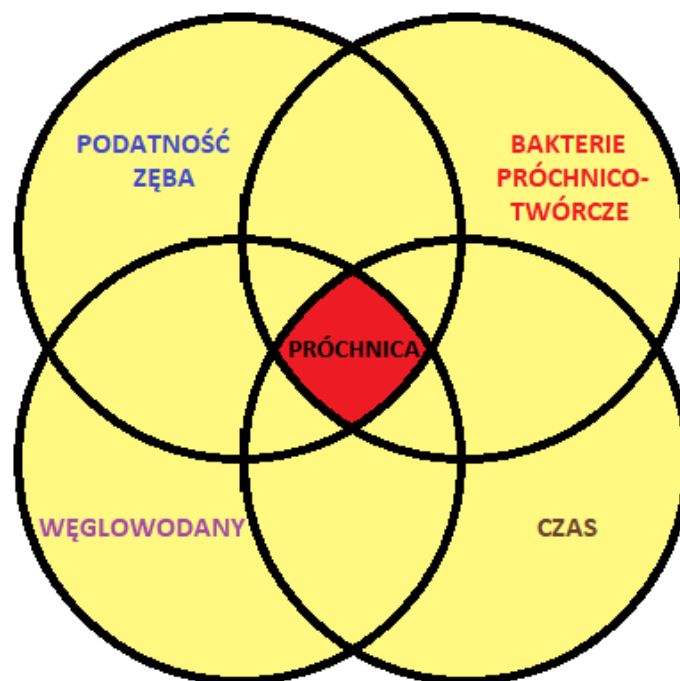
Zgodnie z ekologiczną hipotezą płytki nazębnej, na rozwój próchnicy mają wpływ interakcje pomiędzy bakteriami biofilmu (Rycina 1) [Marsh, 2016]. Powstanie zmiany próchnicowej uwarunkowane jest współlistnieniem czterech podstawowych czynników (Rycina 2):

- występowaniem bakterii próchnicotwórczych,
- podażą określonych węglowodanów (głównie sacharozy, glukozy, fruktozy),
- podatnością tkanek zębów na działanie kwasów,

- odpowiednio długim czasem działania w/w czynników [Bradshaw i Lynch, 2013; Marsh, 2016].



Rycina 1. Ekologiczna hipoteza płytki nazębnej (na podstawie [Marsh, 2016]).



Rycina 2. Schemat podstawowych czynników etiologicznych próchnicy (na podstawie [Fejerskov i Manji, 1990; Selwitz i wsp., 2007]).



Poza wyżej wymienionymi czynnikami, wpływ na rozwój próchnicy mają również: dieta (obecność białek, cukrów, fluoru, jonów wapniowych i fosforanowych), skład śliny (m.in. zawartość mucyn, białek bogatych w prolinę, białek przeciwdrobnoustrojowych), jej przepływ i zdolność buforowa, działanie substancji przeciwbakteryjnych, a także higiena jamy ustnej, status socjoekonomiczny, edukacja i inne [Moynihan i Petersen, 2004; Selwitz i wsp., 2007].

Próchnica zębów ma podłoże wieloczynnikowe i uważana jest za chorobę cywilizacyjną. Jest ona jedną z najczęstszych chorób wieku dziecięcego [Wójcicka i wsp., 2012]. W wieku przedszkolnym odsetek dzieci z próchnicą wynosi do 85%, zaś u dzieci między 6 a 7 rokiem życia prawie 100% [Pawka i wsp., 2010]. W badaniach na terenie Polski wykazano, że próchnica dotyka 37,7% 3-latków, w grupie dzieci 6-letnich częstość występowania próchnicy wynosi od 64,6 do 87,6%, natomiast wśród dzieci 12-letnich choroba ta występuje aż u 98,08% z nich [Milewska i Łuczaj-Cepowicz, 2004; Kamińska i wsp., 2016]. Próchnica jest również powszechną chorobą u osób dorosłych i stanowi u nich najczęstszą przyczynę utraty zębów [Hyde i wsp., 2017]. Istotą procesu próchnicowego jest miejscowa demineralizacja szkliwa, będąca wynikiem degradacji kryształów hydroksyapatytu. Proces ten następuje w biofilmie płytki nazębnej, w którym dochodzi do miejscowego zakwaszenia środowiska zęba. Wpływ na ten proces mają m.in. liczba i gatunki bakterii, szybkość uwalniania, lepkość i zdolność buforowa śliny, obecność fluoru w szkliwie i płytce nazębnej, rodzaj diety i częstotliwość spożywania cukrów [Featherstone, 2008; Velsko i wsp., 2017]. Obniżenie pH płytki nazębnej poniżej 5,5 powoduje rozpuszczanie fosforanów wapnia zawartych w hydroksyapatycie i prowadzi do utraty substancji mineralnych zębów. Miejscowe działanie kwasów w odpowiednio długim czasie prowadzi do demineralizacji powierzchni zęba i rozwoju próchnicy a także do powikłań takich jak zakażenie miazgi zęba, czy zapalenie przyzębia [Featherstone, 2004; Selwitz i wsp., 2007; Strużycka, 2014].

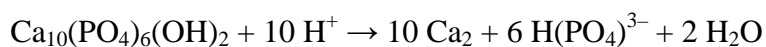
Uważa się, że bakteriami odgrywającymi najważniejszą rolę w powstawaniu próchnicy są paciorkowce *Streptococcus mutans* [Clarke, 1924; Loesche, 1996]. Obecnie wiadomo, że wpływ na rozwój tej choroby mają także inne paciorkowce m.in. *S. mitis*, *S. sanguis* i *S. intermedius* [Sansone i wsp., 1993; van Ruyven i wsp., 2000]. Stwierdzono również, że u pacjentów z obecnością *S. mutans*, gatunki z rodzaju *Atopobium*, *Propionibacterium* i *Lactobacillus* mogą być obecne w istotnie większej liczebności niż *S. mutans* [Becker i wsp., 2002; Aas i wsp., 2008]. Ważną rolę w rozwoju próchnicy

mogą odgrywać też gatunki z rodzaju *Veillonella*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* i *Actinomyces* [Aas i wsp., 2008; Strużycka, 2014]. Natomiast, w obrębie próchnicy zębinowej wzrasta liczba bakterii względnie i bezwzględnie beztlenowych, należących do rodzajów: *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Parvimonas* i *Rothia* [Marsch i Martin, 2009; Takahashi i Nyvad, 2016]. W ubytkach próchnicowych wykazano również obecność *Enterococcus faecalis* oraz bakterii z rodzaju *Scardovia* [Thomas i wsp., 2012; Wade, 2013]. W badaniach molekularnych z zastosowaniem analizy 16S rRNA wykazano, że dominującymi mikroorganizmami w głębokiej próchnicy są *S. mutans* i bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Dialister*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium* i *Pseudoramibacter* [Munson i wsp., 2004; Chhour i wsp., 2005].

Pomimo obecnej wiedzy dotyczącej bakterii próchnicotwórczych za modelowy patogen wywołujący próchnicę nadal uważa się *Streptococcus mutans*. W początkowej demineralizacji szkliwa oprócz *S. mutans* biorą udział m.in. *S. sanguis* i *S. sobrinus*), których wirulencja związana jest z trzema właściwościami:

- metabolizowaniem cukrów z pożywienia do nierozpuszczalnych polisacharydów, które mają wpływ na kolonizację powierzchni zębów,
- produkcją dużych ilości kwasów organicznych (głównie kwasu mlekowego) z węglowodanów (kwasogenność),
- tolerancją na różne czynniki środowiskowe, szczególnie niskie pH (kwasolubność) [Matsui i Cvitkovitch, 2010; Karpiński i Szkaradkiewicz, 2013].

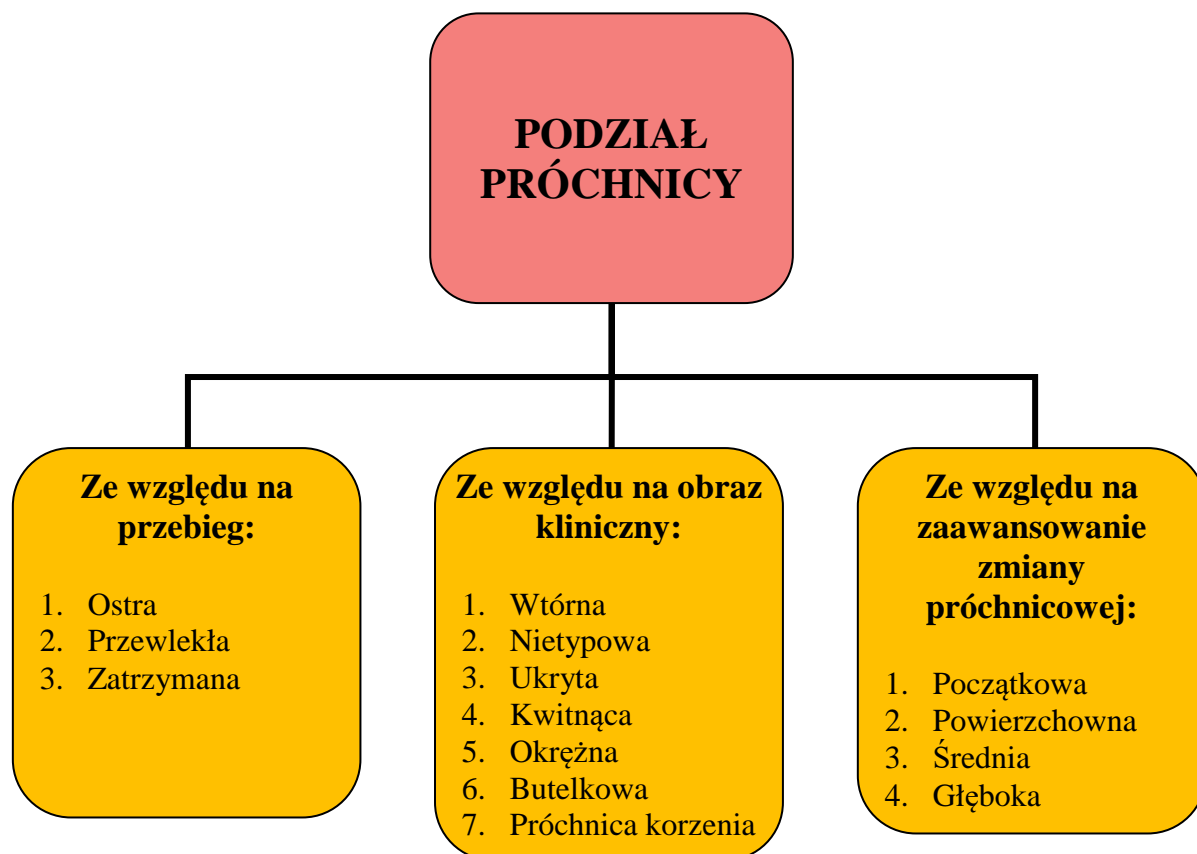
Demineralizacja szkliwa zębów jest procesem chemicznym. Rozpuszczanie hydroksyapatytu można przedstawić w postaci wzoru:



Demineralizacja szkliwa powodowana jest przez wytwarzane przez bakterie kwasy (mlekowy i octowy), które rozpuszczają hydroksyapatyty szkliwa. Wapń i fosforany na powierzchni szkliwa oraz w biofilmie płytki prowadzą do buforowania i rozwoju zmiany podpowierzchniowej szkliwa, obserwowanej jako biała plama. Kontynuacja tego procesu prowadzi do zniszczenia powierzchni szkliwa i powstania ubytku [Manton i wsp., 2013].

Na podstawie obrazu klinicznego próchnicy, zaawansowania zmian lub ich lokalizacji wyróżnia się różne podziały próchnicy (Rycina 3). Z klinicznego punktu widzenia istotny jest podział zmian próchnicowych na aktywne i nieaktywne, od którego zależy sposób leczenia. Zmianę próchnicową uznaje się za aktywną w przypadku stwierdzenia utraty

przezierności i połysku szkliva z jego białym lub żółtym przebarwieniem. Podczas sondowania zmiany najczęściej stwierdza się obecność płytki bakteryjnej na jej powierzchni, a sama zmiana jest chropowata. Zmiana nieaktywna charakteryzuje się białą lub brązową plamą o twardej, gładkiej i błyszczącej powierzchni [Składnik i wsp., 2005].



**Rycina 3.** Podział próchnicy (na podstawie [Kettler, 1994; Kaczmarek, 2004; Fejerskov i Kidd, 2006]).

W praktyce stomatologicznej wyróżnia się różne podziały oraz postacie próchnicy, biorąc pod uwagę przebieg, obraz kliniczny i zaawansowanie zmian (Rycina 3) [Kettler, 1994; Kaczmarek, 2004; Fejerskov i Kidd, 2006].

Podział ze względu na przebieg:

- próchnica ostra - najczęściej u osób młodych, u których szerokie kanaliki zębiny ułatwiają szybki rozwój choroby;
- próchnica przewlekła - głównie u osób dorosłych i starszych, ma wolny przebieg;

- próchnica zatrzymana - to zmiana, której rozwój został zatrzymany dzięki np. intensywnym zabiegom higienicznym zębów.

Podział ze względu na obraz kliniczny:

- próchnica wtórna - rozwija się w zębach przy wypełnieniu, które uległo rozszczelnieniu;
- próchnica nietypowa - występuje w zębach martwych, może się pojawić w zębach leczonych kanałowo;
- próchnica ukryta - rozwija się pod szkliwem i można ją wykryć tylko na zdjęciu radiologicznym;
- próchnica kwitnąca - rozwija się nagle i dotyka na raz wiele zębów, często pojawia się u osób spożywających dużej ilości słodczy i słodkich napojów;
- próchnica okrężna - rozwija się przy szyjkowej części zęba lub w obrębie korzenia;
- próchnica butelkowa - występuje u małych dzieci i atakuje zęby przednie;
- próchnica korzenia - rozwija się głównie u osób, które w wyniku chorób mają odsłonięte szyjki zębów, pierwszej kolejności atakuje cement korzeniowy.

Podział ze względu na stadium rozwoju:

- próchnica początkowa - początkowe, odwracalne stadium choroby, w którym nie nastąpiło jeszcze uszkodzenie szkliwa;
- próchnica powierzchniowa - dochodzi do nieodwracalnego uszkodzenia szkliwa;
- próchnica średnia - uszkodzenia dochodzą do zębiny;
- próchnica głęboka - ubytek sięga miazgi zębowej, może doprowadzić do obumarcia zęba i stanu zapalnego przyzębia.

Podział ze względu na zaawansowanie zmian:

- D1 - zmiana w szkliwie, ale bez ubytku;
- D2 - zmiana w szkliwie, z minimalnym ubytkiem;
- D3 - zmiana sięgająca zębiny;
- D4 - zmiana sięgająca miazgi.

Zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) próchnica zębów oceniana jest na podstawie liczby PUW, która jest sumą zębów z próchnicą pierwotną lub wtórną (P), zębów usuniętych z powodu próchnicy (U) oraz zębów, w których stwierdza się obecność jednego lub więcej wypełnień, ale bez próchnicy wtórnej. Liczba PUW może odnosić się do zębów lub do poszczególnych ich powierzchni (PUWP). W ocenie aktywności próchnicy należy uwzględniać również wskaźnik dziąsłowy (GI) i płytki nazębnej (PI.I) [WHO, 2013].

## ***1.2. Przewlekłe zapalenie przyzębia***

Przewlekłe zapalenie przyzębia (chronic periodontitis) jest chorobą tkanek dziąsła, kości zębodołu, ozębnej i cementu korzeniowego. Najczęściej przewlekłe zapalenie przyzębia jest poprzedzone zapaleniem dziąseł i związane z brakiem higieny jamy ustnej pacjenta. Zapalenie przyzębia prowadzi z czasem do utraty tkanek przyzębia (utrata przyczepu łącznotkankowego i zaniku kości wyrostka zębodołowego) i ostatecznie do wypadania zębów [Szkardkiewicz i Karpiński, 2013]. Do najważniejszych czynników ryzyka rozwoju przewlekłego zapalenia przyzębia należą: mikroorganizmy jamy ustnej, głównie Gram-ujemne bakterie beztlenowe, czynniki genetyczne, palenie tytoniu, picie alkoholu, zakażenie HIV, niedobór witaminy C, osteoporoza, cukrzyca i stres [Vargas Segura i wsp., 2015]. Według najnowszych danych zapalenie przyzębia jest chorobą występującą u ponad 10,8% populacji, czyli 743 milionów ludzi w wieku 15-99 lat [Frencken i wsp., 2017].

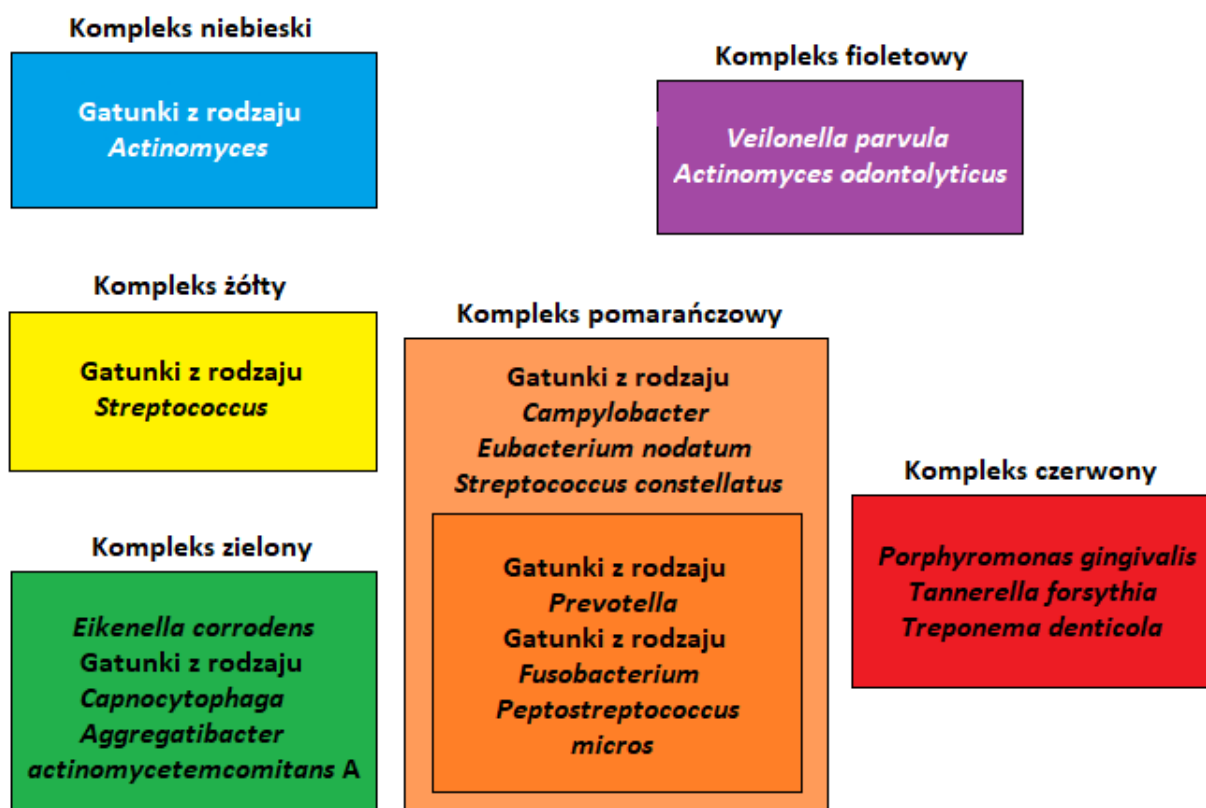
Obecnie, uznaje się, że choroby przyzębia są znaczącym czynnikiem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego, takich jak: choroba niedokrwienna serca, choroba tętnic obwodowych, miażdżycy, zawał mięśnia sercowego oraz infekcyjne zapalenie wsierdzia [Miskiewicz i Szparecki, 2010; Carramolino-Cuéllar i wsp., 2014; Dietrich i wsp., 2017]. Jednocześnie, wykazano wzajemną zależność między chorobami przyzębia a cukrzycą. Choroby przyzębia wpływają na pogorszenie kontroli glikemii, natomiast źle kontrolowana cukrzyca prowadzi do szybszej utraty przyczepu łącznotkankowego, zaniku kości wyrostka zębodołowego i destrukcji tkanki przyzębia [Preshaw i wsp., 2012; Zhou i wsp., 2015].

Przewlekłe zapalenie przyzębia jest najczęstszą postacią chorób przyzębia. Częstość występowania i intensywność choroby zwiększa się wraz z wiekiem. Przewlekłe zapalenie przyzębia może występować w postaci zlokalizowanej lub uogólnionej. W zależności od stopnia zaawansowania można je podzielić na łagodne, średnio zaawansowane

(umiarkowane) i zaawansowane (ciężkie). Objawami przewlekłego zapalenia przyzębia są: wysięk z kieszonki dziąsłowej, krwawienie z dziąseł przy szczotkowaniu, obrzęk i ból dziąseł, nieprzyjemny zapach z ust, utrata przyczepu łącznotkankowego, zanik kości wyrostka zębodołowego, recesja dziąseł, rozchwianie i przemieszczanie się zębów [Górska, 2015].

W zainicjowaniu periodontitis bierze udział biofilm płytki nazębnej, natomiast w rozwoju choroby istotne znaczenie ma zaburzona odpowiedź immunologiczna gospodarza [Costalonga i Herzberg, 2014; Chukkapalli i wsp., 2018]. U osób nieprzestrzegających higieny jamy ustnej dochodzi do szybszego namnażania się bakterii i rozwoju płytki nazębnej naddziąsłowej a następnie poddziąsłowej. W okresie dojrzewania płytki nazębnej zmienia się liczba i zjadliwość bakterii przyzębia, które kolonizują tkanki przyzębia [Mombelli, 2003].

Socransky i Haffajee sklasyfikowali bakterie pod względem ich patogenności względem przyzębia w pięciu głównych kompleksach: żółtym, zielonym, czerwonym, pomarańczowym i fioletowym. Obecnie wyróżnia się dodatkowo szósty kompleks - niebieski (Rycina 4, Tabela 1).



**Rycina 4.** Klasyfikacja bakterii poddziąsłowych w kompleksach Socransky'ego (na podstawie [Socransky i wsp., 1998a; Socransky i wsp., 1998b]).

**Tabela 1.** Klasyfikacja i znaczenie bakterii odpowiedzialnych za choroby przyzębia  
(na podstawie [Socransky i Haffajee, 2002; Lima i wsp., 2015]).

<b>Kompleks</b>	<b>Bakterie</b>	<b>Rola w chorobach przyzębia</b>
Żółty	<i>Streptococcus sanguis</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. intermedius</i>	Wczesna kolonizacja
Niebieski	Gatunki z rodzaju <i>Actinomyces</i>	Wczesna kolonizacja
Zielony	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> <i>C. ochracea</i> <i>C. sputigena</i> <i>Campylobacter concisus</i>	Wtórna kolonizacja
Pomarańczowy	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>P. nigrescens</i> <i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Streptococcus constellatus</i> <i>Eubacterium nodatum</i> <i>Campylobacter showae</i> <i>C. gracilis</i> <i>C. rectus</i>	Wtórna kolonizacja. Poprzedzają kolonizację przez bakterie kompleksu czerwonego
Fioletowy	<i>Veillonella parvula</i> <i>Actinomyces odontolyticus</i>	Most pomiędzy kompleksem pomarańczowym i czerwonym
Czerwony	<i>Tannerella forsythia</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Treponema denticola</i>	Wtórna kolonizacja. Główne patogeny związane z krwawieniem przy sondowaniu

Najbardziej patogenny w zapaleniu przyzębia jest kompleks czerwony, składający się z *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* i *Treponema denticola*. Bezpośrednio związany z kompleksem czerwonym jest kompleks pomarańczowy, do którego należą: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros* i *Campylobacter rectus*. Pozostałe kompleksy odznaczają się niskim bądź umiarkowanym ryzykiem rozwoju zapalenia przyzębia [Socransky i wsp., 1998a; 1998b]. Klinicznie

bakterie kompleksu zielonego i żółtego są związane z płytkami kieszonkami przyzębnymi (głębokość kieszonek PPD < 3 mm), a patogeny kompleksu pomarańczowego i czerwonego z zaawansowaną chorobą przyzębia i głębszymi kieszonkami przyzębnymi (PPD > 4 mm) [Sbordone i Bortolaia, 2003].

Haffajee i wsp. wykazali, że w przypadku płytki nazębnej naddziąsłowej po siedmiu dniach od zastosowania profesjonalnego czyszczenia zębów dochodzi do ponownego powstania biofilmu, co skutkuje rozwojem kompleksów bakteryjnych podobnych do tych w biofilmie płytki poddziąsłowej. Wraz ze wzrostem ilości płytki nazębnej zmienia się również mikrośrodowisko płytki, skład mikroflory i wzrasta liczba bakterii beztlenowych. Jednocześnie, następuje zaawansowane zapalenie przyzębia oraz recesja i pogłębienie kieszeni przyzębnych [Haffajee i wsp., 2008; 2009].

### ***1.3. Defensyny***

Istotne znaczenie w jamie ustnej odgrywa ślina i jej składniki. Ślina składa się z wydzieliny gruczołów ślinowych, płynu dziąsłowego, resztek pokarmowych, złuszczonych komórek nabłonka, bakterii i ich metabolitów. Głównym składnikiem śliny jest woda. Pozostałą część stanowią składniki organiczne i nieorganiczne. Do składników organicznych należą białka (immunoglobuliny, albuminy, glikoproteiny, enzymy), niebiałkowe substancje azotowe (mocznik, kwas moczowy, aminokwasy, kreatynina), węglowodany, lipidy oraz hormony [de Almeida Pdel i wsp., 2008; Carpenter, 2013]. Wiele substancji występujących w ślinie posiada aktywność przeciwdrobnoustrojową. Należą do nich m.in. stateryna, histatyny, lizozym, laktoperoksydaza i defensyny [Marsh i wsp., 2015].

Defensyny są krótkimi peptydami kationowymi, o małej masie cząsteczkowej (3-5 kDa) z 6-8 resztami cysteinowymi, które tworzą 3-4 wewnątrzcząsteczkowe wiązania dwusiarczkowe [Chen i wsp., 2006; Żyłowska i wsp., 2011]. Defensyny cechują się zdolnością do zabijania bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, grzybów oraz wirusów [Mattar i wsp., 2016; Polesello i wsp., 2017; Kudryashova i wsp., 2017; Park i wsp., 2018]. Niektóre z nich mają też działanie przeciwnowotworowe [Yoshimoto i wsp., 2003; Kida-Takaoka i wsp., 2014]. Na podstawie występowania, długości i budowy łańcuchów peptydowych oraz położenia cysteiny wyróżnia się  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\theta$ -defensyny [Karpiński i Szkaradkiewicz, 2013; Greer i wsp., 2013]. Obecnie znamy około 550 defensyn [www.defensins.bii.a-star.edu.sg]. Dotychczas opisano 12  $\alpha$ -defensyn (HNP1-4, HD5-6, NP1



i 5, kryptodyna 3 i 4, RMAD3-4), 25  $\beta$ -defensyn (HBD1-4, SBD1-2, TAP, LAP, EBD, BNBD1-13, PBD1-2, mBD-1) oraz 5  $\theta$ -defensyn (retrocyklina 1, 2, RTD1-3) [Niedźwiedzka-Rystwej i Deptuła, 2008]. U człowieka występuje 7 defensyn alfa (HNP1-4, HD5-6 i NP5), oraz 11 defensyn beta (w tym najważniejsze HBD1-4) [Niedźwiedzka-Rystwej i Deptuła, 2008; Jarczak i wsp., 2013]. Sekwencję aminokwasową wybranych defensyn człowieka przedstawiono w Tabeli 2.

**Tabela 2.** Sekwencje aminokwasowe wybranych defensyn człowieka (na podstawie [Bowdish i wsp., 2006]).

<b><math>\alpha</math>-Defensyny</b>	
HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
HNP-2	CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
HNP-3	DCYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
HNP-4	VCSCRLVFCRTELRVGNCLIGGVSFTYCCTRV
<b><math>\beta</math>-Defensyny</b>	
HBD-1	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKACCK
HBD-2	TCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP
HBD-3	GIINTLQKYYCRVRRGRCVLSCLPKEEQIGKCTRGRKCCRKK
HBD-4	MQRLVLLAVSLLLYQDLPVRSEFELDRICGYGTARCRKKCRSQE YRIGRCPNTYACCLRKWDESLLNRTKP

### 1.3.1. Defensyny alfa

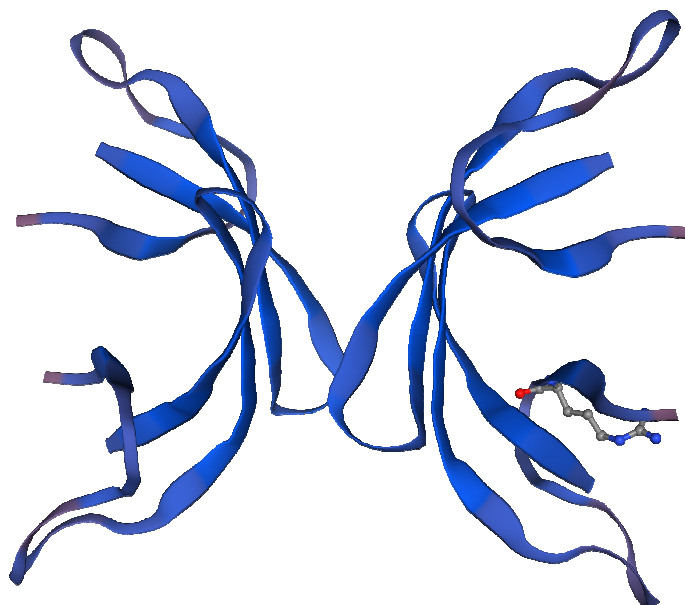
Defensyny alfa (Rycina 5, Tabela 3) nazywane są defensynami klasycznymi. Występują powszechnie u ssaków. Do chwili obecnej opisano około 80  $\alpha$ -defensyn. U człowieka wykazano obecność siedmiu  $\alpha$ -defensyn, z których cztery są produkowane głównie w ziarnistościach granulocytów (HPN-1, HPN-2, HPN-3 i HPN-4), a pozostałe trzy w komórkach Panetha jelita cienkiego (HD-5, HD-6 i NP5) [Niedźwiedzka-Rystwej i Deptuła, 2008; Jarczak i wsp., 2013].

**Tabela 3.** Charakterystyka wybranych defensyn alfa człowieka (na podstawie [Żyłowska i wsp., 2011; Jarczak i wsp., 2013; Suarez-Carmona i wsp., 2015; Niedźwiedzka-Rystwej i Deptuła, 2008; Droin i wsp., 2009]).

Nazwa defensyny	Gen i jego umiejscowienie	Miejsce ekspresji	Działanie	Produkcja
HNP-1	DEFA1 (8p23.1)	Neutrofile, monocyty, makrofagi, komórki NK	Przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe	Konstytutywna
HNP-2	DEFA2 (8p23.1)			
HNP-3	DEFA3 (8p23.1)			
HNP-4	DEFA4 (8p23)		Przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe	
HD-5	DEFA5 (8p23.1)	Komórki Panetha, komórki nabłonka pochwy	Przeciwbakteryjne	Konstytutywna; indukowana w zakażeniach bakteryjnych
HD-6	DEFA6 (8p23.1)		Przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe	

Ludzkie defensyny alfa wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe. Defensyny HNP1-3 neutralizują niektóre enzymy bakteryjne, takie jak toksyna węglikowa i dlatego mogą chronić gospodarza przed śmiertelnymi skutkami zakażenia [Kim i wsp., 2005]. Wykazano, że defensyny  $\alpha$  posiadają różną aktywność bakteriobójczą. Najsilniejsze działanie przeciwko *Staphylococcus aureus* wykazuje defensyna HNP-2 a najsłabszą HNP-4. Natomiast przeciwko *Escherichia coli* i *Enterobacter aerogenes* najsilniej działa HNP-4, a najsłabiej HNP-1 i HNP-3 [Ericksen i wsp., 2005]. HNP-4 działa także przeciwko *E. coli*, *Enterococcus faecalis* oraz grzybom *Candida albicans* [Wilde i wsp., 1989]. Natomiast defensyny HNP-2 i HD-5 wykazują wysoką aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych, podczas gdy defensyna HD-6 działa tylko wobec *Bacillus cereus* [Ericksen i wsp., 2005]. Wykazano, że stężenie HNP-1 jest wyższe w ślinie u pacjentów z chorobami jamy ustnej, takich jak liszaj płaski, leukoplakia i rak płaskonabłonkowy w przeciwieństwie do zdrowych osób [Dunsche i wsp., 2001]. Wykazano,

że poziom HNP-1 do 3 wzrasta u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia, niezależnie od stanu zaawansowania. W postaci umiarkowanej i ciężkiej zapalenia przyzębia poziomy HNP1-3 w supernatantach śliny wynosiły odpowiednio  $628 \pm 378$  pg/ml i  $784 \pm 640$  pg/ml, zaś w grupie kontrolnej osób zdrowych  $246 \pm 148$  pg/ml [Hofman i wsp., 2008]. Dale i wsp. wykazali, że poziom alfa-defensyn HNP1-3 jest odwrotnie skorelowany z próchnicą zębów. Autorzy zasugerowali, że HNP1-3 można wykorzystać do oceny ryzyka próchnicy w populacji ogólnej [Dale i wsp., 2006]. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego  $\alpha$ -defensyn wyjaśnił De Leeuw i wsp., którzy udowodnili, że białka te wiążą się z prekursorem syntezy ściany komórkowej, lipidem II, przez co następuje zahamowanie syntezy ściany komórkowej patogenów. Prawdopodobnie, dlatego  $\alpha$ -defensyny są bardziej skuteczne wobec bakterii Gram-dodatnich niż defensyny  $\beta$  [De Leeuw i wsp., 2010].



**Rycina 5.** Dimer defensyny HNP-1. Model wykonany przy użyciu oprogramowania SWISS-MODEL [<https://swissmodel.expasy.org/>], na podstawie sekwencji aminokwasowej uzyskanej z bazy UniProt [<https://www.uniprot.org/>].

Niektóre defensyny  $\alpha$  posiadają aktywność przeciwwirusową poprzez interakcję z receptorami powierzchniowymi komórki. Defensyny HNP prowadzą do zahamowania replikacji lub transkrypcji wirusa [Chang i wsp., 2005; Klotman i Chang, 2006]. HNP i HD-5 mogą hamować rozwój wirusa grypy i wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) [Klotman i Chang, 2006; Wu i wsp., 2003]. HNP1 wykazuje też działanie przeciwwirusowe wobec

HSV-1, HSV-2 (herpes simplex virus-1 i 2), VSV (vesicular stomatitis virus) oraz wirusa grypy i CMV (cytomegalovirusa) [Daher i wsp., 1986].

### 1.3.2. Defensyny beta

U ludzi pierwszą  $\beta$ -defensynę, a mianowicie HBD-1 (Rycina 6, Tabela 4) odkryto w 1995 roku [Bensch i wsp., 1995]. Występuje ona w komórkach nabłonkowych tchawicy, oskrzeli, dróg oddechowych, przyusznicy, błony śluzowej policzków, języka i dziąseł także w jelicie cienkim, trzustce, nerkach, prostaty, jądrach, pochwie, macicy, jajowodach, łożysku i grasicy [Żyłowska i wsp., 2011]. Porównanie miejsca syntezy defensyn alfa i beta w jamie ustnej człowieka przedstawiono na Rycinie 7. Obecnie znanych jest ok. 190  $\beta$ -defensyn, w tym 48 występujących u człowieka.  $\beta$ -defensyny posiadają sześć reszt cysteinowych, natomiast w HBD1-4 człowieka stwierdzono wysoką zawartość reszt lizyny i argininy [Pazgier i wsp., 2006].

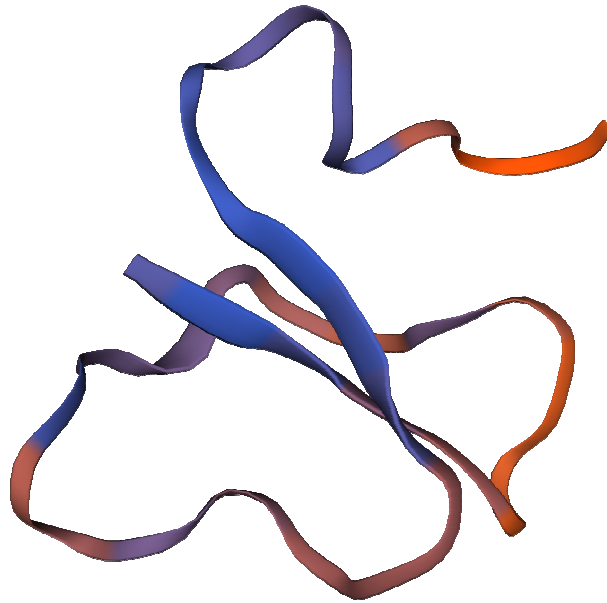
$\beta$ -defensyny wykazują różne spektrum działania, najczęściej jednak są aktywne wobec bakterii i drożdżaków. HBD-2 i HBD-3 są szczególnie aktywne wobec patogenów tlenowych, podczas gdy tylko 21,4% do 50% bakterii beztlenowych jest wrażliwych na działanie tych białek [Joly i wsp., 2004]. Badania wykazały, że tylko trzy  $\beta$ -defensyny HBD-1, HBD-2 i HBD-3 ulegają ekspresji w jamie ustnej, głównie w nabłonku dziąseł, języka i podniebienia [Dale i Krisanaprakornkit, 2001]. HBD-1 ulega ciągłej ekspresji i odgrywa rolę w regulacji normalnej flory jamy ustnej, podczas gdy HBD-2 i -3 są indukowane w odpowiedzi na mediatory prozapalne (interleukinę IL-1 $\beta$ , czynnik martwicy nowotworów TNF- $\alpha$ , interferon IFN- $\gamma$ ) oraz lipopolisacharydy bakteryjne (LPS) patogenów przyzębia (*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*) [Krisanaprakornkit i wsp., 1998; Dale i Krisanaprakornkit, 2001]. Jednocześnie, indukowany przez stan zapalny HBD-2 odgrywa rolę w ochronie przeciw zakażeniu *Candida albicans* [Abiko i wsp., 2002].

HBD-1 określany jest jako supresor nowotworów, prowadzi do swoistej dla raka utraty ekspresji lub jej zmniejszenia. Spadek ekspresji mRNA HBD-1 wykazano w zmianach przednowotworowych i raku jamy ustnej oraz w liniach komórkowych raka płaskonabłonkowego jamy ustnej w porównaniu do normalnych komórek nabłonka [Röhrl i wsp., 2010; Funderburg i wsp., 2007]. Natomiast, w przypadku HBD-2 i HBD-3 stwierdzono niejednoznaczne wyniki. W niektórych badaniach wykazano zwiększoną ekspresję HBD-2 w raku przełyku [Shi i wsp., 2014] i HBD-3 w nowotworach głowy i szyi

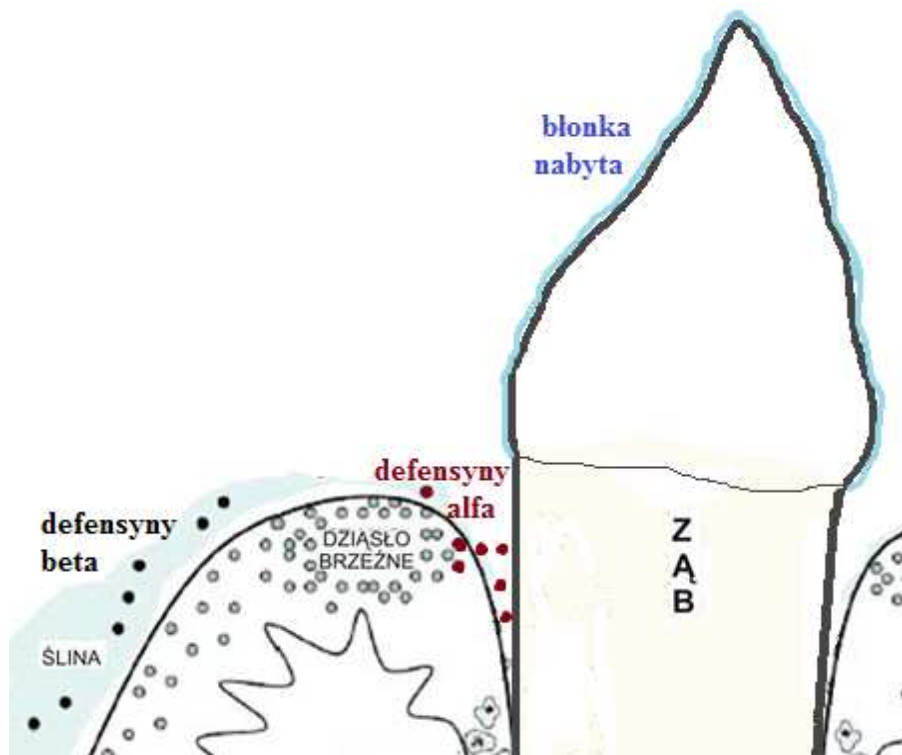
[Kesting i wsp., 2009; Shuyi i wsp., 2011], zaś w innych stwierdzono spadek ekspresji HBD-1 i HBD-2 na liniach komórkowych nowotworów jamy ustnej [Joly i wsp., 2009] oraz HBD-1 w tkankach uzyskanych od pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej [Wenghoefer i wsp., 2008].

**Tabela 4.** Charakterystyka wybranych defensyn beta człowieka (na podstawie [Żyłowska 2011; Jarczak 2013; Suarez-Carmona 2015; Niedźwiedzka-Rystwej 2008; Droin 2009]).

Nazwa defensyny	Gen i jego umiejscowienie	Miejsce ekspresji	Działanie	Produkcja
HBD-1	DEFB1 (8p23.1)	Komórki nabłonkowe płuc, dróg moczowych, łożysko, nerki, trzustka, tchawica, prostata	Przeciwbakteryjne	Indukowana przez mikroorganizmy lub cytokiny prozapalne
HBD-2	DEFB4A (8p23.1)	Komórki nabłonkowe skóry, płuc, jelit, dróg moczowo-płciowych	Przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe	
HBD-3	DEFB103 (8p23.1)	Komórki nabłonkowe nosa, migdałków, trzustki, oskrzeli, ślina, wydzielina pochwowa	Przeciwbakteryjne	
HBD-4	DEFB104 (8p23.1)	Jądra, żołądek, macica, płuca, nerki	Przeciwbakteryjne	



**Rycina 6.** Defensyna HBD-1. Model wykonany przy użyciu oprogramowania SWISS-MODEL [<https://swissmodel.expasy.org/>], na podstawie sekwencji aminokwasowej uzyskanej z bazy UniProt [<https://www.uniprot.org/>].



**Rycina 7.** Porównanie miejsca syntezy defensyn alfa i beta w jamie ustnej człowieka.

## **2. CEL PRACY**

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie poziomów defensyn w ślinie dorosłych osób.

Badania prowadzono realizując następujące cele szczegółowe:

1. Ocena stężenia alfa- i beta-defensyn w ślinie zdrowych dorosłych osób.
2. Ocena stężenia alfa- i beta-defensyn w ślinie dorosłych osób w przebiegu procesu próchnicowego zębów.
3. Ocena stężenia alfa- i beta-defensyn w ślinie dorosłych osób z przewlekłym umiarkowanym zapaleniem przyzębia.

## 3. MATERIAŁ I METODY

### 3.1. Grupy badawcze

Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu Uchwała nr 957/14.

Badaniami objęto 135 dorosłych pacjentów (62 kobiety i 73 mężczyzn) w wieku 20-45 lat. Strukturę grup badawczych przedstawiono na Rycinie 8. Wybór pacjentów do poszczególnych grup badawczych został dokonany na podstawie badania stomatologicznego w oparciu o przyjęte kryteria [Nyvad i Fejerskov, 1997; Ismail i wsp., 2007; WHO, 2013; Górska, 2015].

Grupę 1 stanowiło 25 osób wolnych od próchnicy i chorób przyzębia, spełniający kryteria włączenia: wskaźnik PUW  $< 5$  (ubytki próchnicowe, zęby usunięte i zęby wypełnione), P (ubytki próchnicowe) = 0.

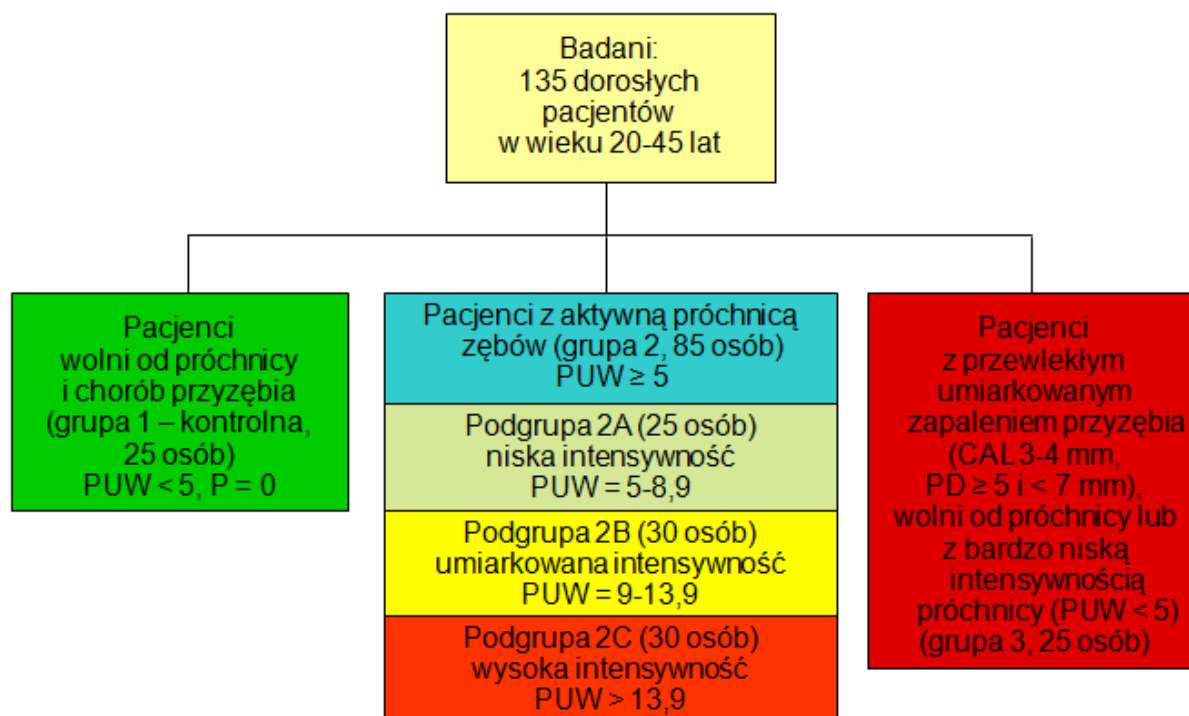
Grupę 2 stanowiło 85 pacjentów z aktywną próchnicą zębów (PUW  $\geq 5$ ) (Rycina 9 i 10), których podzielono na trzy podgrupy:

- 2A zawierającą 25 osób z niską intensywnością próchnicy (PUW 5-8,9),
- 2B zawierającą 30 osób z umiarkowaną intensywnością próchnicy (PUW 9-13,9),
- 2C zawierającą 30 osób z wysoką intensywnością próchnicy (PUW  $> 13,9$ ).

Do grupy 3 należało 25 pacjentów z przewlekłym umiarkowanym zapaleniem przyzębia, wolnych od próchnicy lub z bardzo niską intensywnością próchnicy, spełniający kryteria: CAL (kliniczna utrata przyczepu łącznotkankowego) 3-4 mm, PD (głębokość kieszonek)  $\geq 5$  i  $< 7$ , PUW  $< 5$ .

Do badań zostali zakwalifikowani pacjenci ogólnie zdrowi, nie podający w wywiadzie występowania chorób ogólnych oraz nie przyjmujący leków przeciwbakteryjnych w ostatnich 3 tygodniach.





**Rycina 8.** Grupy pacjentów zakwalifikowanych do badań.



**Rycina 9.** Pacjent z licznymi ubytkami próchnicowymi.



**Rycina 10.** Ubytek próchnicowy na powierzchni żującej zębów 37 i 38.

Kryteria wykluczenia z badań były następujące:

- rozpoznanie choroby ogólnoustrojowej lub grzybicy jamy ustnej,
- palenie tytoniu,
- leczenie ogólne lub miejscowe antybiotykiem, chemioterapeutykiem lub stosowanie płukanek przeciwbakteryjnych a także profesjonalnych zabiegów higienizacyjnych w gabinecie stomatologicznym w okresie ostatnich 3 tygodni poprzedzających badanie.

### ***3.2. Materiał badawczy***

Materiał do badań stanowiły próbki pełnej śliny spoczynkowej pobrane od pacjentów w godzinach porannych, po upływie co najmniej dwóch godzin od posiłku i/lub mycia zębów. Próbki od pacjentów były pozyskiwane przed rozpoczęciem leczenia stomatologicznego. Ślinę pobierano do sterylnych probówek typu Falcon. Następnie 2 ml pobranej śliny umieszczano w jałowych probówkach i wirowano (3000 obr./min., 30 min., w temp. 4°C). Supernatanty odwirowanej pełnej śliny przechowywano w temperaturze -70°C do czasu wykonania oznaczeń.

### **3.3. Badanie stomatologiczne**

Kliniczne badanie stomatologiczne obejmowało badanie podmiotowe oraz przedmiotowe. Badanie podmiotowe dotyczyło m.in. występowania u pacjentów kryteriów włączenia i wykluczenia. W badaniu przedmiotowym dokonano oceny higieny jamy ustnej, intensywności próchnicy i stanu przyzębia.

Aktywność próchnicy została określona na podstawie zmodyfikowanych kryteriów Światowej Organizacji Zdrowia [Nyvad i Fejerskov, 1997; Ismail i wsp., 2007; WHO, 2013]. Pacjenci zostali zakwalifikowani do grupy z próchnicą aktywną (caries active) według następujących kryteriów:

- liczba PUWZ  $\geq 5$ ,
- liczba P  $\geq 1$  (próchnica, składowa liczby PUWZ).

Stan uzębienia oznacza się literami:

- P - ząb z jednym lub kilkoma ubytkami próchnicy pierwotnej i/lub wtórnej, ząb z czasowym wypełnieniem,
- U - ząb utracony lub usunięty z powodu próchnicy,
- W - ząb z jednym lub większą liczbą wypełnień, bez próchnicy wtórnej lub pokryty koroną z powodu próchnicy,
- Z - oznacza, że badano zęby stałe [Wilczyńska-Borawska i wsp., 2013].

Umiarkowane zapalenie przyzębia określono na podstawie następujących kryteriów wg Światowej Organizacji Zdrowia i grupy roboczej Amerykańskiej Akademii Periodontologicznej [WHO, 2013; Górska, 2015]:

- wskaźnik dziąsłowy GI  $> 0$ ,
- wskaźnik położenia i utraty przyczepu łącznotkankowego CAL 3-4 mm,
- 2 zęby z kieszonkami o głębokości PD  $\geq 5$  i  $< 7$  mm.

W 2017 roku pojawiła się nowa klasyfikacja chorób przyzębia [Tonetti i wsp., 2018], jednak z powodu, że wielu pacjentów zostało zbadanych do tego czasu wg wytycznych z 2013 roku, nie zdecydowano się na zmianę kryteriów oceny tkanek przyzębia.

Obecność stanu zapalnego dziąsła oceniano na podstawie wskaźnika dziąsłowego GI (Gingival Index) według Löe i Silness [Löe i Silness, 1963a; 1963b]. Kryteria oceny opierają się na zmianach jakościowych dziąsła:

- 0 - brak objawów zapalenia i zmiany zabarwienia dziąsła,
- 1 - łagodny stan zapalny z niewielką zmianą zabarwienia dziąsła,
- 2 - umiarkowane zapalenie z zaczerwienieniem, obrzękiem i krwawieniem podczas badania sondą,
- 3 - ciężkie zapalenie ze znacznym zaczerwienieniem, obrzękiem, skłonnością do krwawienia samoistnego oraz obecnością owrzodzeń dziąseł [Wilczyńska-Borawska i wsp., 2013].

Stan dziąsła punktuje się w obrębie czterech powierzchni otaczających każdy ząb. Następnie, po dodaniu punktów i podzieleniu sumy przez 4 otrzymuje się wartości wskaźnika dla danego zęba.

Utratę tkanek przyzębia określono na podstawie pomiaru położenia przyczepu łącznotkankowego CAL (Clinical Attachment Level) oraz głębokości kieszonek PD (Pocket Depth). Do badania CAL i PD zastosowano sondę periodontologiczną WHO 621 Hu Friedy. Pomiaru klinicznej utraty przyczepu łącznotkankowego dokonywano przy sześciu powierzchniach każdego z zębów. Wartość CAL obliczano na podstawie pomiaru odległości od połączenia szkliwno-cementowego do dna kieszonki dziąsłowej. Uzyskane dane stanowiły podstawę do obliczenia wartości średnich CAL u poszczególnych pacjentów. Natomiast, obecność kieszonek patologicznych w umiarkowanym zapaleniu przyzębia stwierdzano, gdy u badanego znaleziono jedno lub więcej miejsc z głębokością kieszonek  $\geq 5$  i  $< 7$  mm. Wskaźnik PD ocenia odległość pomiędzy brzegiem dziąsła, a dnem kieszonki dziąsłowej [Jańczuk, 2004; Wolf i wsp., 2006].

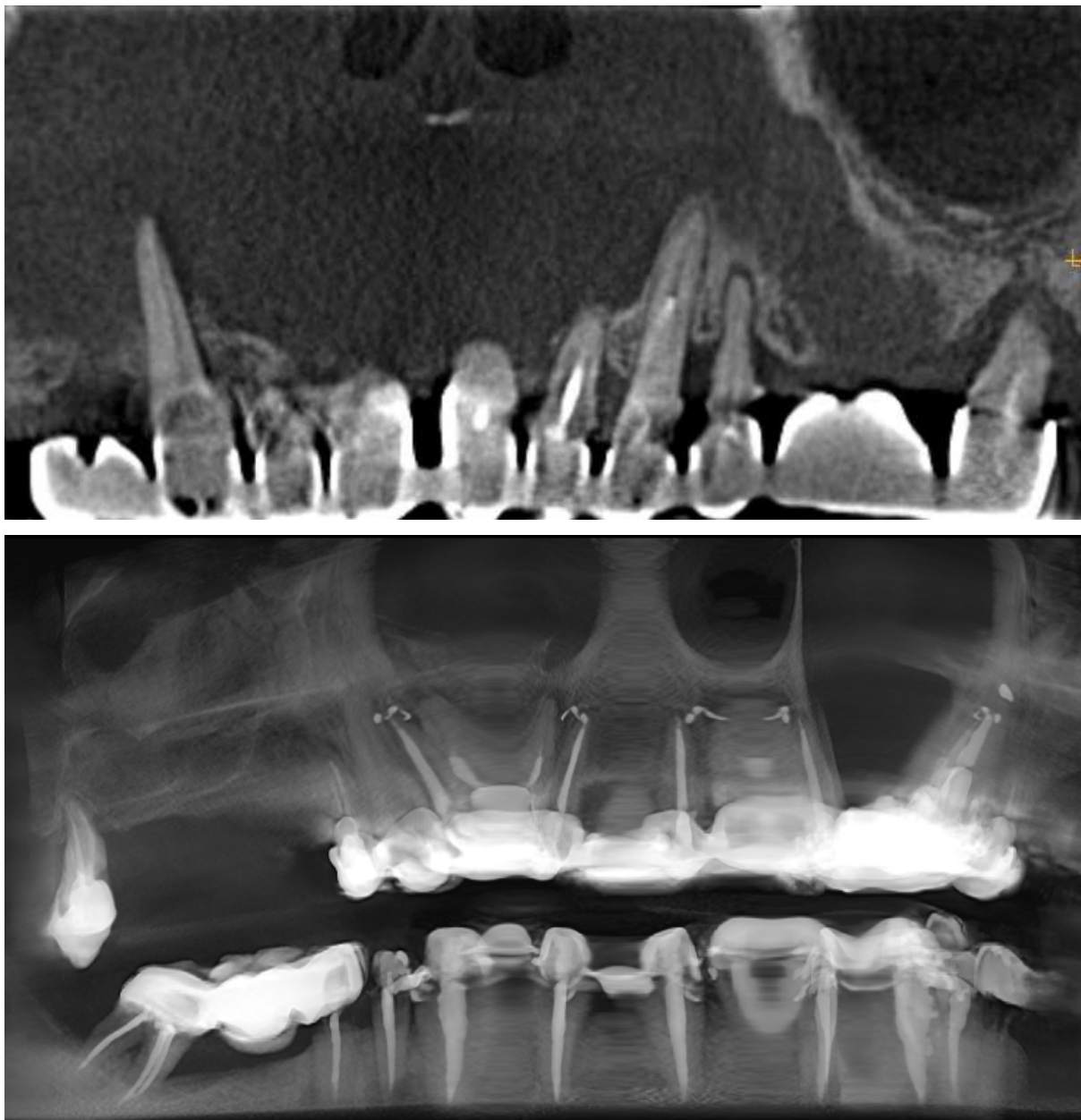
U pacjentów z umiarkowanym zapaleniem przyzębia wykonywano dodatkowo zdjęcia rentgenowskie pantomograficzne. Zdjęcie pantomograficzne umożliwia ocenę stanu uzębienia (Rycina 11) oraz dokładną ocenę stanu przyzębia (Rycina 12). U wybranych pacjentów wykonano również zdjęcia z tomografii komputerowej wolumetrycznej - CBCT (Rycina 13). CBCT (Cone Beam Computed Tomography) jest rodzajem tomografii komputerowej z wiązką promieniowania w kształcie stożka. W porównaniu do klasycznej tomografii komputerowej jest szybsza, bezpieczniejsza a pacjent otrzymuje niższą dawkę promieniowania jonizującego. Obecnie CBCT jest najdokładniejszą metodą obrazowania i diagnozowania w stomatologii [Venkatesh i Elluru, 2017].



**Rycina 11.** Przykładowe zdjęcia pantomograficzne pacjentów z licznymi ubytkami próchnicowymi.



**Rycina 12.** Przykładowe zdjęcia pantomograficzne pacjentów z umiarkowanym zapaleniem przyzębia.



**Rycina 13.** Przykładowe zdjęcia z tomografii komputerowej (CBCT) pacjentów z zapaleniem przyzębia.

### ***3.4. Zasada oznaczenia poziomów defensyn***

Oznaczanie poziomów defensyn wykonano w ślinie spoczynkowej uzyskanej od pacjentów metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

Poziom  $\alpha$ -defensyn (HNP 1-3) oznaczano stosując zestaw HNP1-3, Human, ELISA kit (Hycult Biotechnology, Hbt, Uden). Postępowano według zaleceń producenta:

1. Przygotowanie próbek badanej śliny (Rozdział 3.2.).
2. Umieszczenie w studzienkach płytki titracyjnej po 100  $\mu$ l standardów, próbek i kontroli.
3. Inkubacja przez 1 godz., temp. 25°C.
4. Płukanie 4-krotne studzienek 200  $\mu$ l buforu płuczającego.
5. Dodanie 100  $\mu$ l rozcieńczonego znacznika do każdej studzienki.
6. Inkubacja przez 1 godz. w temp. pokojowej.
7. Płukanie 4-krotne studzienek 200  $\mu$ l buforu płuczającego.
8. Dodanie 100  $\mu$ l rozcieńczonej streptawidyny-peroksydazy do każdej studzienki.
9. Inkubacja przez 1 godz. w temp. pokojowej.
10. Płukanie 4-krotne studzienek 200  $\mu$ l buforu płuczającego.
11. Dodanie 100  $\mu$ l substratu TMB do każdej studzienki.
12. Inkubacja w zaciemnionym miejscu przez 30 min. w temp. pokojowej.
13. Dodanie 100  $\mu$ l roztworu Stop hamującego reakcję do każdej studzienki.
14. Pomiar absorbancji poszczególnych próbek przy długości fali  $\lambda = 450$  nm, przy zastosowaniu czytnika Elisa 250 (BioMerieux) (Rycina 14).

Do oznaczenia poziomu  $\beta$ -defensyny 1 zastosowano zestaw Human Beta-defensin 1, BD-1 ELISA Kit (EIAab) (Rycina 15). Postępowano według zaleceń producenta:

1. Przygotowanie próbek badanej śliny.
2. Umieszczenie w studzienkach płytki titracyjnej po 100  $\mu$ l standardów, próbek i kontroli.
3. Inkubacja przez 2 godz., temp. 37°C.
4. Usunięcie płynu ze studzienek. Dodanie 100  $\mu$ l roztworu Detection Reagent A do każdej studzienki.
5. Inkubacja przez 1 godz., temp. 37°C.



6. Płukanie 3-krotne studzienek 400  $\mu$ l buforu płuczającego.
7. Dodanie 100  $\mu$ l roztworu Detection Reagent B do każdej studzienki.
8. Inkubacja przez 1 godz., temp. 37°C.
9. Płukanie 3-krotne studzienek 400  $\mu$ l buforu płuczającego.
10. Dodanie 90  $\mu$ l roztworu substratu do każdej studzienki.
11. Inkubacja w zaciemnionym miejscu przez 15-30 min., temp. 37°C.
12. Dodanie 50  $\mu$ l roztworu Stop hamującego reakcję do każdej studzienki.
13. Pomiar absorbancji poszczególnych próbek przy długości fali  $\lambda = 450$  nm, przy zastosowaniu czytnika Elisa 250 (BioMerieux).

Do oznaczenia poziomu  $\beta$ -defensyny 2 zastosowano zestaw Human beta-Defensin-2 (BD-2) ELISA Kit (Alpha Diagnostic International) (Rycina 16). Postępowano według zaleceń producenta:

1. Przygotowanie próbek badanej śliny.
2. Umieszczenie w studzienkach płytki titracyjnej po 100  $\mu$ l standardów, próbek i kontroli.
3. Inkubacja przez 1 godz., temp. 25°C.
4. Płukanie 4-krotne studzienek.
5. Dodanie 100  $\mu$ l roztworu Anti-BD-2 Detecting Antibody do każdej studzienki.
6. Inkubacja przez 1 godz., temp. 25°C.
7. Płukanie 4-krotne studzienek.
8. Dodanie 100  $\mu$ l roztworu konjugatu streptawidyny-HRP do każdej studzienki.
9. Inkubacja przez 30 min., temp. 25°C.
10. Płukanie 5-krotne studzienek.
11. Dodanie 100  $\mu$ l substratu TMB do każdej studzienki.
12. Inkubacja w zaciemnionym miejscu przez 15 min., temp. 25°C.
13. Dodanie 100  $\mu$ l roztworu Stop hamującego reakcję do każdej studzienki.
14. Pomiar absorbancji poszczególnych próbek przy długości fali  $\lambda = 450$  nm, przy zastosowaniu czytnika Elisa 250 (BioMerieux).



Rycina 14. Czytnik Elisa 250 (BioMérieux).



Rycina 15. Zestaw Human Beta-defensin 1, BD-1 ELISA Kit (EIAab) do oznaczania poziomu  $\beta$ -defensyny 1.



**Rycina 16.** Zestaw Human beta-Defensin-2 (BD-2) ELISA Kit (Alpha Diagnostic International) do oznaczania poziomu  $\beta$ -defensyny 2.

### ***3.5. Analiza statystyczna***

Analizy statystyczne wykonał Pan Dr Roman Ardan z Wydziału Nauk Ekonomicznych Politechniki Koszalińskiej.

W podstawowej analizie statystycznej przedstawiono średnie wartości, odchylenia standardowe i zakres. Ponadto, zbadano stopień współzależności między wskaźnikami klinicznymi a pomiarami defensyn. Dla wszystkich pięciu wskaźników klinicznych oraz trzech pomiarów defensyn zbadano różnicę średnich poziomów między grupami. W tym celu zastosowano test ANOVA z poprawką Welcha dla nierównych wariancji oraz post-hoc test HSD Tukeya.

Badania statystyczne przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego „R”. Różnice uznawano za istotne statystycznie, przy  $p < 0,05$ .

## 4. WYNIKI

### 4.1. Wyniki badania stomatologicznego pacjentów

Uzyskane w badaniach średnie wartości, odchylenia standardowe i zakres wskaźników stomatologicznych dla każdej z grup pacjentów przedstawiono w Tabelach 5 i 6. Ze względu na specyfikę grup badawczych i ich doboru, nie analizowano pomiędzy nimi różnic wartości wskaźników stomatologicznych.

**Tabela 5.** Wartości badanych wskaźników stomatologicznych w grupie 1 (pacjenci wolni od próchnicy i chorób przyzębia), grupie 2 (pacjenci z aktywną próchnicą zębów) oraz w grupie 3 (pacjenci z umiarkowanym zapaleniem przyzębia).

	<b>Grupa 1</b> N=25	<b>Grupa 2</b> N=85	<b>Grupa 3</b> N=25
<b>PUW</b>			
Średnia (Odch.std.)	3,720 (1,061)	11,259 (4,024)	2,960 (1,207)
Zakres	1,000 - 5,000	4,000 - 22,000	0,000 - 4,000
<b>P</b>			
Średnia (Odch.std.)	0,000 (0,000)	4,647 (2,576)	2,120 (1,166)
Zakres	0,000 - 0,000	1,000 - 15,000	0,000 - 4,000
<b>CAL</b>			
Średnia (Odch.std.)	0,636 (0,291)	0,727 (0,271)	3,492 (0,233)
Zakres	0,200 - 1,200	0,200 - 1,300	3,100 - 3,900
<b>PD</b>			
Średnia (Odch.std.)	1,376 (0,638)	1,871 (0,851)	6,060 (0,545)
Zakres	0,300 - 2,600	0,500 - 3,800	5,000 - 6,900
<b>GI</b>			
Średnia (Odch.std.)	0,344 (0,092)	0,732 (0,365)	1,060 (0,284)
Zakres	0,200 - 0,500	0,200 - 1,600	0,500 - 1,600

**Tabela 6.** Wartości badanych wskaźników stomatologicznych w podgrupach grupy 2 (pacjenci z aktywną próchnicą: z niską intensywnością - podgrupa 2A, z umiarkowaną intensywnością - podgrupa 2B i z wysoką intensywnością - podgrupa 2C).

	<b>Podgrupa 2A</b> N=25	<b>Podgrupa 2B</b> N=30	<b>Podgrupa 2C</b> N=30
<b>PUW</b>			
Średnia (Odch.std.)	6,360 (1,186)	10,967 (1,245)	15,633 (1,903)
Zakres	4,000 - 8,000	9,000 - 13,000	14,000 - 22,000
<b>P</b>			
Średnia (Odch.std.)	2,680 (1,180)	5,333 (2,123)	5,600 (2,966)
Zakres	1,000 - 6,000	1,000 - 9,000	2,000 - 15,000
<b>CAL</b>			
Średnia (Odch.std.)	0,708 (0,278)	0,680 (0,309)	0,790 (0,217)
Zakres	0,300 - 1,300	0,200 - 1,300	0,400 - 1,200
<b>PD</b>			
Średnia (Odch.std.)	1,412 (0,574)	1,693 (0,759)	2,430 (0,842)
Zakres	0,500 - 2,400	0,600 - 3,600	0,600 - 3,800
<b>GI</b>			
Średnia (Odch.std.)	0,424 (0,139)	0,783 (0,322)	0,937 (0,372)
Zakres	0,200 - 0,700	0,300 - 1,500	0,400 - 1,600

#### **4.2. Wyniki badania poziomów defensyn**

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że w grupie 3 - pacjentów z umiarkowanym zapaleniem przyzębia występowały istotnie statystycznie najwyższe poziomy alfa-defensyn HNP1-3 oraz beta-defensyn HBD-1 i HBD-2, w porównaniu do wyników uzyskanych w grupie 1 - kontrolnej i grupie 2 - pacjentów z próchnicą. Poziomy HNP1-3 były około 3-krotnie wyższe w grupie 3 niż w pozostałych grupach pacjentów. Jednocześnie, stężenia HNP1-3 nie różniły się pomiędzy grupą 1 a podgrupami grupy 2. Poziomy HBD-1 były około 4-krotnie wyższe w grupie 3 niż w pozostałych

grupach pacjentów. Jednocześnie, stężenia HBD-1 nie różniły się pomiędzy grupą 1 a podgrupami grupy 2. Największe zróżnicowanie wyników stwierdzono w oznaczeniach HBD-2. Poziomy HBD-2 były około 1,5 raza wyższe w podgrupie 2B (PUW 9-13,9) i 2C (PUW > 13,9) w porównaniu do grupy 1 (kontrolna) i podgrupy 2A (PUW 5-8,9). Jednocześnie, stężenia HBD-2 były około dwukrotnie wyższe w grupie 3 (umiarkowane zapalenie przyzębia) niż w grupie 1 (kontrolna) i podgrupie 2A (PUW 5-8,9) oraz 0,5 raza wyższe w grupie 3 niż w podgrupie 2B (PUW 9-13,9) i 2C (PUW > 13,9).

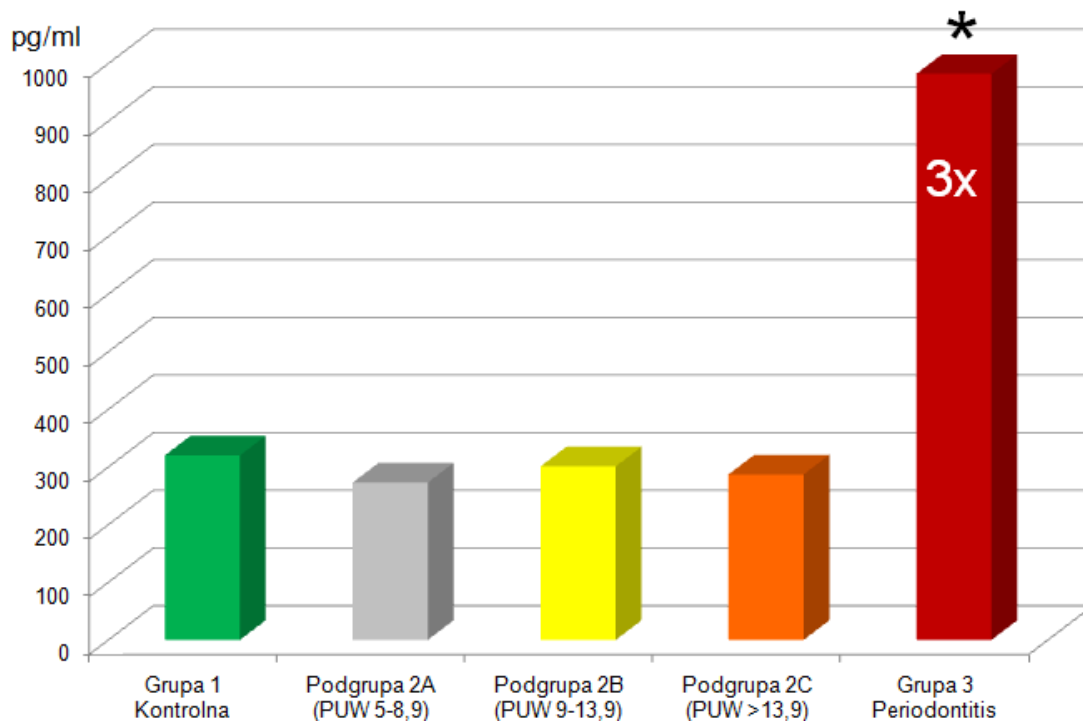
Szczegółowe dane przedstawiono w Tabeli 7 i 8 oraz na Rycinach 17-19.

**Tabela 7.** Poziomy alfa-defensyn HNP1-3 oraz beta-defensyn HBD-1 i HBD-2 w grupie 1 (pacjenci wolni od próchnicy i chorób przyzębia), grupie 2 (pacjenci z aktywną próchnicą zębów) oraz w grupie 3 (pacjenci z umiarkowanym zapaleniem przyzębia).

	<b>Grupa 1</b> N=25	<b>Grupa 2</b> N=85	<b>Grupa 3</b> N=25	<b>Różnice istotne statystycznie</b> <i>p</i>
<b>HNP1-3</b>				
Średnia	320,240	288,047	982,320	1 vs. 3
(Odch.std.)	(137,702)	(139,138)	(324,117)	2 vs. 3
Zakres	112,000 - 574,000	68,000 - 627,000	506,000 - 1674,000	$p < 0,001$
<b>HBD1</b>				
Średnia	41,760	48,588	161,400	1 vs. 3
(Odch.std.)	(18,782)	(23,983)	(42,955)	2 vs. 3
Zakres	11,000 - 76,000	6,000 - 117,000	82,000 - 241,000	$p < 0,001$
<b>HBD2</b>				
Średnia	353,880	490,776	684,400	1 vs. 2
(Odch.std.)	(98,363)	(177,113)	(197,872)	$p < 0,01$ ; 1 vs. 3
Zakres	232,000 - 564,000	176,000 - 925,000	331,000 - 1032,000	2 vs. 3 $p < 0,001$

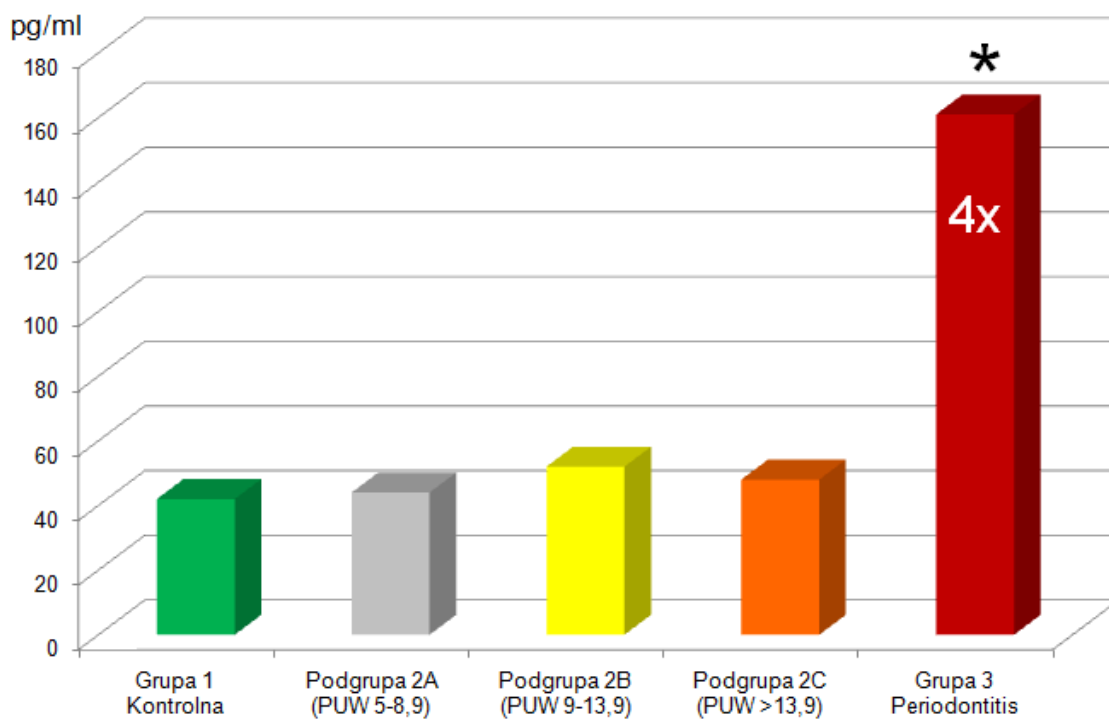
**Tabela 8.** Poziomy alfa-defensyn HNP1-3 oraz beta-defensyn HBD-1 i HBD-2 w podgrupach grupy 2 (pacjenci z aktywną próchnicą: z niską intensywnością - podgrupa 2A, z umiarkowaną intensywnością - podgrupa 2B i z wysoką intensywnością - podgrupa 2C).

	<b>Podgrupa 2A</b>	<b>Podgrupa 2B</b>	<b>Podgrupa 2C</b>	<b>Różnice istotne statystycznie</b>
	N=25	N=30	N=30	<i>p</i>
<b>HNP1-3</b>				
Średnia	273,240	301,200	287,233	
(Odch.std.)	(155,899)	(149,391)	(115,219)	-
Zakres	75,000 - 612,000	68,000 - 627,000	112,000 - 475,000	
<b>HBD1</b>				
Średnia	44,360	52,333	48,367	
(Odch.std.)	(22,847)	(26,864)	(21,965)	-
Zakres	6,000 - 87,000	16,000 - 117,000	17,000 - 88,000	
<b>HBD2</b>				
Średnia	376,240	541,033	535,967	1 vs. 2
(Odch.std.)	(117,020)	(174,065)	(182,197)	1 vs. 3
Zakres	176,000 - 541,000	248,000 - 881,000	268,000 - 925,000	$p < 0,01$



**Rycina 17.** Poziomy alfa-defensyn HNP 1-3 w badanych grupach pacjentów.

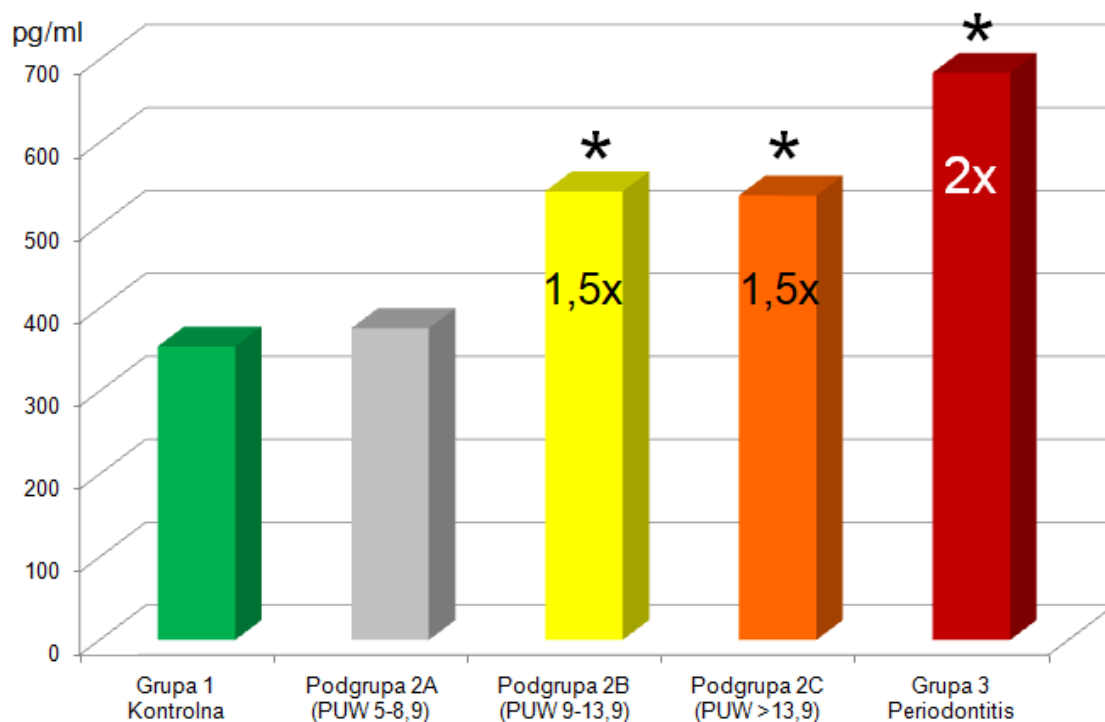
\* - różnica istotna statystycznie względem innych grup/podgrup ( $p < 0,001$ ).



**Rycina 18.** Poziomy beta-defensyny HBD-1 w badanych grupach pacjentów.

\* - różnica istotna statystycznie względem innych grup/podgrup ( $p < 0,001$ ).





**Rycina 19.** Poziomy beta-defensyny HBD-2 w badanych grupach pacjentów.

\* - różnica istotna statystycznie względem innych grup/podgrup  
(szczegółowe dane przedstawiono w Tabeli 7 i 8).

#### ***4.3. Wyniki badania korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi oraz poziomami defensyn***

Wyniki badania korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) przedstawiono w Tabelach 9-14. Oznaczenia poziomów istotności były następujące:

- $p < 0,0001$ : \*\*\*\*
- $p < 0,001$ : \*\*\*
- $p < 0,01$ : \*\*
- $p < 0,05$ : \*

Na poziomie istotności  $p < 0,01$  istotne współczynniki korelacji wykazano jedynie w Grupie 2 (pacjenci z aktywną próchnicą zębów) pomiędzy poziomem HBD-2 a PUW ( $r=0,33$ ) oraz pomiędzy stężeniem HBD-1 a GI ( $r=0,31$ ). W obu przypadkach występowała korelacja dodatnia, co oznacza, że wraz ze wzrostem wartości wskaźnika klinicznego następował wzrost stężenia badanej defensyny.

**Tabela 9.** Wyniki korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) u pacjentów Grupy 1 (osoby wolne od próchnicy i chorób przyzębia).

	<b>PUW</b>	<b>P</b>	<b>CAL</b>	<b>PD</b>	<b>GI</b>	<b>HNP1-3</b>	<b>HBD-1</b>
<b>PUW</b>							
<b>P</b>	---						
<b>CAL</b>	-0,11	---					
<b>PD</b>	-0,13	---	0,2				
<b>GI</b>	-0,08	---	0,44*	-0,22			
<b>HNP1-3</b>	0,09	---	0,01	0,01	-0,02		
<b>HBD-1</b>	0,38	---	-0,12	-0,08	-0,06	-0,24	
<b>HBD-2</b>	0,15	---	0,13	<b>-0,42*</b>	-0,06	-0,07	0,07

W grupie 1 wskaźnik P=0 (brak zmienności), wobec tego nie było możliwe, aby wyliczyć współczynnik korelacji.

**Tabela 10.** Wyniki korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) u pacjentów Grupy 2 (pacjenci z aktywną próchnicą zębów).

	<b>PUW</b>	<b>P</b>	<b>CAL</b>	<b>PD</b>	<b>GI</b>	<b>HNP1-3</b>	<b>HBD-1</b>
<b>PUW</b>							
<b>P</b>	0,51*****						
<b>CAL</b>	0,1	0,07					
<b>PD</b>	0,47*****	0,12	0,07				
<b>GI</b>	0,54*****	0,34**	-0,1	0,29**			
<b>HNP1-3</b>	0,01	-0,03	0,02	0,11	-0,02		
<b>HBD-1</b>	0,05	0,03	-0,1	0,17	0,31**	-0,04	
<b>HBD-2</b>	<b>0,33**</b>	0,18	0,04	0,19	0,18	0,17	0,05

**Tabela 11.** Wyniki korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) u pacjentów Grupy 3 (pacjenci z umiarkowanym zapaleniem przyzębia).

	<b>PUW</b>	<b>P</b>	<b>CAL</b>	<b>PD</b>	<b>GI</b>	<b>HNP1-3</b>	<b>HBD-1</b>
<b>PUW</b>							
<b>P</b>	0,68***						
<b>CAL</b>	-0,19	-0,33					
<b>PD</b>	0,19	-0,02	0,05				
<b>GI</b>	0,06	0,09	0,3	-0,21			
<b>HNP1-3</b>	0,02	0,08	-0,15	-0,2	0,07		
<b>HBD-1</b>	0,14	0,1	-0,07	0,17	0,11	-0,06	
<b>HBD-2</b>	0,27	0,09	0,23	0,19	0,24	-0,08	0,25

**Tabela 12.** Wyniki korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) u pacjentów podgrupy 2A, z niską intensywnością próchnicy.

	<b>PUW</b>	<b>P</b>	<b>CAL</b>	<b>PD</b>	<b>GI</b>	<b>HNP1-3</b>	<b>HBD-1</b>
<b>PUW</b>							
<b>P</b>	0,56**						
<b>CAL</b>	0,17	-0,07					
<b>PD</b>	-0,15	-0,44*	0,02				
<b>GI</b>	0,12	0,35	0,05	-0,08			
<b>HNP1-3</b>	-0,33	-0,24	0	0,1	-0,09		
<b>HBD-1</b>	0,05	-0,02	-0,05	0,27	0,07	0,14	
<b>HBD-2</b>	-0,09	0,14	-0,22	-0,2	-0,29	-0,01	0,2

**Tabela 13.** Wyniki korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) u pacjentów podgrupy 2B, z umiarkowaną intensywnością próchnicy.

	<b>PUW</b>	<b>P</b>	<b>CAL</b>	<b>PD</b>	<b>GI</b>	<b>HNP1-3</b>	<b>HBD-1</b>
<b>PUW</b>							
<b>P</b>	0						
<b>CAL</b>	-0,08	0,08					
<b>PD</b>	0,24	0,35	-0,03				
<b>GI</b>	-0,29	-0,23	-0,18	-0,1			
<b>HNP1-3</b>	0,14	-0,04	0	0,16	-0,24		
<b>HBD-1</b>	-0,08	-0,06	-0,13	0,24	0,36*	-0,28	
<b>HBD-2</b>	0,23	-0,23	0,16	0,09	-0,1	0,37*	-0,1

**Tabela 14.** Wyniki korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) u pacjentów podgrupy 2C, z wysoką intensywnością próchnicy.

	<b>PUW</b>	<b>P</b>	<b>CAL</b>	<b>PD</b>	<b>GI</b>	<b>HNP1-3</b>	<b>HBD-1</b>
<b>PUW</b>							
<b>P</b>	0,37*						
<b>CAL</b>	-0,21	0,07					
<b>PD</b>	0,01	-0,32	0				
<b>GI</b>	0,27	0,26	-0,34	0,19			
<b>HNP1-3</b>	-0,08	-0,04	0,12	0,08	0,14		
<b>HBD-1</b>	-0,02	-0,01	-0,09	0,06	0,40*	0,08	
<b>HBD-2</b>	-0,09	0,06	0,02	0,14	0	0,01	0,02

## 5. DYSKUSJA

Ślina jest czynnikiem ochronnym w jamie ustnej, poprzez wpływ na utrzymanie homeostazy. Składa się ona w 94-99,5% z wody. Pozostałe składniki to substancje organiczne i nieorganiczne, warunkujące jej właściwości. Są to m.in. peptydy, wśród których obecnie zidentyfikowano szeroką gamę peptydów endogennych posiadających działanie przeciwbakteryjne. Najlepiej poznanymi są alfa- i beta-defensyny, które zostały opisane w tej rozprawie doktorskiej. Oprócz defensyn ślina zawiera również laktoferyny, glikoproteiny, histatyny, stateryny, cystatyny oraz immunoglobuliny [Szydłarska i wsp., 2008].

Według niektórych autorów, "przeciwbakteryjne peptydy ślinowe są substancjami, które mogą zmienić spojrzenie na etiologię i leczenie wielu chorób w obrębie jamy ustnej" [Chroma, Ewa Iwanicka-Grzegorek, 2009]. Wciąż odkrywane są nowe białka przeciwbakteryjne, dlatego poznanie ich właściwości oraz mechanizmów działania może przyczynić się do opisanie nowego leku. Szczególne znaczenie mogą posiadać te substancje w przypadku zakażeń bakteriami opornymi na antybiotyki. Naturalne, ludzkie białka o właściwościach przeciwbakteryjnych, odgrywają ogromną rolę w homeostazie mikrobioty jamy ustnej oraz w zapobieganiu chorób przyzębia. Analiza stężeń alfa- i beta-defensyn oraz innych białek mających właściwości przeciwbakteryjne może być istotna w ocenie ryzyka i podatności pacjenta na próchnicę zębów i choroby przyzębia [Szydłarska i wsp., 2008].

Próchnica zębów i zapalenie przyzębia są najczęstszymi chorobami ogólnoustrojowymi u ludzi. Najgroźniejsze dla zdrowia ogólnego są bakterie próchnicotwórcze oraz mikroorganizmy bytujące w zmienionych chorobowo tkankach przyzębia. Jak dowodzą badania, choroby dziąseł i przyzębia mają bardzo negatywny wpływ na organizm człowieka. Mogą wpływać na rozwój chorób serca (wzrost ryzyka nawet o 25-75%) oraz miażdżycy, która jest główną przyczyną występowania ostrych zespołów wieńcowych. Dzieje się tak, ponieważ bakterie i ich toksyny bytujące w kieszonkach dziąsłowych, uszkodzają struktury tkanki łącznej i nabłonka. W ten sposób mogą dostawać się w głąb a dzięki bogatemu unaczynieniu okolicy przyzębia, rozprzestrzeniać się do odległych tkanek i narządów. Bakterie jamy ustnej mogą prowadzić też do zapalenia zatok szczękowych i przynosowych, ponieważ nieleczona głęboka próchnica górnych zębów może spowodować przenikanie bakterii do otaczających je tkanek. Ze względu na powyższe, tak istotna jest profilaktyka i częste badanie

stomatologiczne, mogące zminimalizować ilość chorób odogniskowych [Wasiluk, 2019]. Obecnie, udowodniono również, że periopatogeny takie jak *Fusobacterium nucleatum* i *Porphyromonas gingivalis*, mogą mieć działanie karcinogenne i prowadzić do rozwoju raka jamy ustnej, jelita grubego i trzustki [Karpiński, 2019].

Defensyny są białkami mającymi istotne znaczenie w zachowaniu homeostazy pomiędzy patogenami a organizmem człowieka. W przedstawionej rozprawie u dorosłych osób nie wykazano różnic w poziomie alfa-defensyn HNP1-3 pomiędzy grupą osób zdrowych ( $320 \pm 138$  pg/ml) a podgrupami pacjentów z próchnicą zębów. Podobne wyniki otrzymali Toomarian i wsp., którzy stwierdzili u dzieci brak różnic w stężeniach HNP1-3 w grupie bez próchnicy ( $84,13 \pm 17,34$  ng/ml), z próchnicą umiarkowaną ( $86,91 \pm 13,61$ ) i próchnicą ciężką ( $87,07 \pm 7,79$ ) [Toomarian i wsp., 2011]. Gürsoy i wsp. wykazali przy zastosowaniu metody ELISA, że u osób zdrowych średnie stężenia defensyn HNP1-3 w ślinie wynoszą  $43,26$  pg/ml [Gürsoy i wsp., 2016]. W innych badaniach stwierdzono natomiast, że poziom HNP1-3 były istotnie wyższe u dzieci bez próchnicy (mediana  $0,89$  µg/ml) niż u dzieci z próchnicą ( $0,5$  µg/ml) [Tao i wsp., 2005]. Oznaczenia HNP1-3 zostały wykonane tym samym zestawem, co w prezentowanej rozprawie. Autorzy wykazali również, że wysokiej intensywności próchnicy nie towarzyszy wysoka liczba bakterii *Streptococcus mutans* w ślinie. Jednocześnie, poziom HNP1-3 nie był skorelowany z obecnością *S. mutans* [Tao i wsp., 2005]. Podobnie, Dale i wsp. zaobserwowali wyższe stężenia HNP1-3 ( $1,30 \pm 0,22$  µg/ml) w grupie osób bez próchnicy, niż u badanych pacjentów z próchnicą ( $0,73 \pm 0,07$  µg/ml) [Dale i wsp., 2006].

W literaturze pojawiają się także badania defensyn, w których do ich oznaczenia zastosowano połączenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią masową. Według Gardner i wsp. poziom α-defensyn wynosił  $1-10$  µg/ml [Gardner i wsp., 2009]. W innej publikacji u osób zdrowych podane stężenie ślinowej defensyny HNP-1 wynosiło  $8,6 \pm 8,0$  µg/ml a defensyny HNP-2  $5,6 \pm 5,2$  µg/ml [Goebel i wsp., 2000]. W różnych chorobach jamy ustnej pojawiają się zmiany w poziomach defensyn alfa. W raku płaskonabłonkowym jamy ustnej poziomy HNP-1 były nieznacznie wyższe ( $12,3 \pm 8,6$  µg/ml) niż w grupie osób zdrowych. Po leczeniu dochodziło do obniżenia stężenia tej defensyny do  $6,5 \pm 5,9$  µg/ml [Mizukawa i wsp., 1998]. W innych chorobach jamy ustnej poziomy ślinowej HNP-1 wynosiły: w liszaju płaskim  $8,3 \pm 4,3$  µg/ml, w leukoplakii  $13,2 \pm 7,9$  µg/ml a w zapaleniu języka związanym z niedoborem żelaza  $11,4 \pm 4,9$  µg/ml. Stężenia te były istotnie wyższe ( $p < 0,01$ ) w porównaniu do poziomów u osób zdrowych ( $0,8$  µg/ml) [Mizukawa i wsp.,

1999]. Podwyższone poziomy HNP-1 stwierdzono również u pacjentów z chorobą Behçeta i w nawrotowym aftowym zapaleniu jamy ustnej [Kucukkolbasi i wsp., 2011].

W prezentowanej rozprawie doktorskiej poziomy HNP1-3 były około 3-krotnie wyższe w grupie pacjentów z umiarkowanym zapaleniem przyzębia ( $982 \pm 324$  pg/ml) w porównaniu do wyników uzyskanych u osób zdrowych i z próchnicą zębów. Podobne dane wykazał Hofman i wsp. W supernatantach śliny pacjentów z postacią umiarkowaną przewlekłego zapalenia przyzębia poziomy HNP1-3 wynosiły  $628 \pm 378$  pg/ml, natomiast w postaci ciężkiej  $784 \pm 640$  pg/ml. Jednocześnie, w grupie kontrolnej poziom ten wynosił  $246 \pm 148$  pg/ml [Hofman i wsp., 2008]. Głównym źródłem defensyn HNP w nabłonku dziąsłowym u ludzi są neutrofile. Wzrost liczby granulocytów obojętnochłonnych w trakcie choroby dziąseł może prowadzić do 15-krotnego zwiększenia poziomu HNP1-3 w ślinie i płynie dziąsłowym w przypadku agresywnego zapalenia przyzębia i 60-krotnego w przewlekłym zapaleniu przyzębia [Gorr i Abdolhosseini, 2011].

Defensyny HNP mogą promować migrację neutrofile w przyzębiu poprzez indukcję cytokin prozapalnych. Wykazano, że podanie HNP1-3 u myszy prowadzi do wytwarzania mediatorów zapalnych: czynnika martwicy nowotworu- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), białka chemotaktycznego dla monocytów-1 (MCP-1) i białka zapalnego makrofagów-2 (MIP-2). W monocytach stymulowanych przez *Staphylococcus aureus* i HNP1-3 dochodzi do zwiększenia produkcji prozapalnych TNF- $\alpha$  i interleukiny-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), a jednocześnie zmniejszenia syntezy przeciwwzapalnej interleukiny-10 [Chaly i wsp., 2000; Yang i wsp., 2004]. Alfa-defensyny działają również immunomodulująco, uczestniczą w gojeniu się ran i są w stanie zwiększyć produkcję kolagenu, a także hamować aktywność dopełniacza i indukować śmierć komórek [Yeung i wsp., 2011].

Wykazano, że celem dla defensyny HNP-1 są bakterie *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Porphyromonas gingivalis*, natomiast dla HNP-2 i HNP-3 są *P. gingivalis* i *A. actinomycetemcomitans* [Gorr i wsp., 2011]. HNP-1 i HNP-2 wykazują słabe działanie przeciwbakteryjne wobec *Tannerella forsythia* [Lee i wsp., 2010]. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego HNP1-3 został opisany wobec *Escherichia coli*. Polega on na zwiększeniu przepuszczalności błony komórkowej (permeabilizacja) zewnętrznej i wewnętrznej, a następnie zahamowaniu syntezy DNA, RNA i białka [Lehrer i wsp., 1989]. Niektóre bakterie jak np. *Prevotella intermedia* wykazują oporność wobec defensyn HNP1-3 [Lee i wsp., 2010]. Natomiast

*Streptococcus pyogenes* może prowadzić do zahamowania aktywności HNP-1 [Ferne-King i wsp., 2006].

Poziomy HBD-1 w niniejszej rozprawie były podobne w grupie kontrolnej i w podgrupach chorych z próchnicą i nie różniły się statystycznie. Jednocześnie, stężenia HBD-1 były najwyższe w grupie pacjentów z umiarkowanym zapaleniem przyzębia, około czterokrotnie wyższe niż w innych grupach i wynosiły  $161 \pm 43$  pg/ml. W innych badaniach przy zastosowaniu metody ELISA wykazano, że u osób zdrowych średnie stężenia defensyny HBD-1 wynosiły 1623,85 pg/ml [Gürsoy i wsp., 2016]. Były one prawie 40 razy wyższe niż w niniejszych badaniach, w których wynosiły  $42 \pm 19$  pg/ml. Ekspresja genu beta defensyny-1 była istotnie wyższa ( $p < 0.001$ ) u pacjentów z przewlekłym periodontitis niż u chorych z zapaleniem dziąseł i agresywnym zapaleniem przyzębia [Vardar-Sengul i wsp., 2007]. Defensyna HBD-1 działa słabo przeciwbakteryjnie m.in. na bakterie *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4, *Porphyromonas gingivalis* WA83 i *Prevotella intermedia* 163 [Ouhara i wsp., 2005]. Według innej publikacji *Prevotella intermedia* jest oporna na działanie HBD-1, w przeciwieństwie do *Tannerella forsythia* wrażliwej na stężenie 1,25-10  $\mu$ M HBD-1 [Lee i wsp., 2010].

W prezentowanej rozprawie poziomy HBD-2 w grupie 1 - kontrolnej wynosiły  $354 \pm 98$  pg/ml, zaś w podgrupie 2A (PUW 5-8,9) wynosiły  $376 \pm 117$  pg/ml. Wartości te różniły się istotnie statystycznie względem wyników uzyskanych dla podgrupy 2B (PUW 9-13,9) i 2C (PUW > 13,9), odpowiednio  $541 \pm 174$  i  $536 \pm 182$  pg/ml. Stężenia wykazane w grupie 3 u pacjentów z umiarkowanym zapaleniem przyzębia były najwyższe ( $684 \pm 198$  pg/ml). Wartości te były około 2 razy wyższe w grupie 3 niż w grupie 1 i podgrupie 2A oraz 0,5 razy wyższe w grupie 3 niż w podgrupie 2B i 2C.

Ghosh i wsp. przedstawili, że u zdrowych osób średnie wartości (i przedziały) HBD-2 w ślinie wynoszą 9.5 (1.2-21)  $\mu$ g/l. Oznaczenia były wykonywane metodą kanapkową ELISA projektowaną przez autorów [Ghosh i wsp., 2007]. Z kolei w innych badaniach przy zastosowaniu metody ELISA wykazano, że u osób zdrowych średnie stężenia HBD-2 wynosiły 170,95 pg/ml [Gürsoy i wsp., 2016], zaś w ślinie zdrowych periodontologicznie studentów  $242,28 \pm 144,52$  pg/ml [Forte i wsp., 2010]. U dzieci stwierdzono niewielki wzrost poziomu HBD-2 ( $2,29 \pm 0,05$  ng/ml) we wczesnej próchnicy, w porównaniu do grupy kontrolnej bez chorób jamy ustnej ( $2,15 \pm 0,07$  ng/ml) [Jurczak i wsp., 2015]. W innych badaniach wykonanych przy użyciu metody ELISA stwierdzono, że poziomy HBD-2 u dzieci bez próchnicy wynosiły około 1,4 ng/ml, u dzieci ze wczesną



próchnicą około 1,5 ng/ml, natomiast w ciężkiej próchnicy około 1,8 ng/ml. Niestety autorzy nie przedstawili dokładnych wyników stężeń, można je odczytać z ryciny jedynie w przybliżeniu [Colombo i wsp., 2016].

U pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia średnie stężenie HBD-2 w ślinie dorosłych wynosiło 266,91 pg/ml, natomiast w grupie kontrolnej 99,2 pg/ml [Yong i wsp., 2015]. Podobne wyniki przedstawili Pereira i wsp. W grupie osób ze zdrowym przyzęciem poziomy HBD-2 wynosiły pomiędzy 34,6-121,8 pg/ml a w grupie z periodontitis 141,1-155,2 pg/ml. Jednocześnie, u osób z chorobą przyzębia były bardziej rozpowszechnione bakterie *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* i *T. denticola*, jednak wg autorów ich obecność nie była związana ze zwiększonymi poziomami HBD-2 [Pereira i wsp., 2013]. W innej pracy Pereira i wsp. przedstawili, że w grupie kontrolnej poziom HBD-2 (około 0,08 µg/ml) oznaczany metodą ELISA był niższy niż w grupie chorych z przewlekłym zapaleniem przyzębia (około 0,17 µg/ml). Jednocześnie, wykazali oni, że leczenie periodontologiczne prowadziło do znaczącego ( $p < 0,001$ ) obniżenia poziomu HBD-2 u pacjentów z periodontitis [Pereira i wsp., 2012]. Jednocześnie, najwyższą ekspresję HBD-2 wykazano u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia, w porównaniu do ekspresji u osób z gingivitis i osób zdrowych [Vardar-Sengul i wsp., 2007].

Wykazano, że szczepy bakterii *Fusobacterium nucleatum* 21, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4, *Porphyromonas gingivalis* WA83 i *Prevotella intermedia* 163 są wrażliwe w niskim stopniu na działanie HBD-2 w stężeniu 1 mg/l. Natomiast, efekt bakteriobójczy HBD-2 wobec bakterii Gram-dodatnich (paciorkowce jamy ustnej i *Lactobacillus casei*) stwierdzony został w stężeniu tego białka  $> 10$  mg/l [Ouhara i wsp., 2005]. W innej pracy stwierdzono, że *Prevotella intermedia* jest oporna na działanie HBD-2, natomiast *Tannerella forsythia* była wrażliwa na 1,25-10 µM HBD-2 [Lee 2010]. Ekspresja β-defensyny-2 jest indukowana przez cytokiny prozapalne (IL-1β, IFN-γ, TNF-α) w złożonej ścieżce sygnałowej aktywowanej przez lipopolisacharyd (LPS) bakteryjny [Krisanaprakornkit i wsp., 2000; Moon i wsp., 2002].

## 6. WNIOSKI

1. Postęp intensywności próchnicy zębów nie jest związany z zaburzeniami poziomów alfa-defensyn (HNP1-3) w ślinie.
2. Postęp intensywności próchnicy zębów jest związany z istotnie podwyższonym poziomem beta-defensyny HBD-2 w ślinie, jednocześnie przy braku zmian w koncentracji HBD-1.
3. W umiarkowanym przewlekłym zapaleniu przyzębia występuje w ślinie istotnie zwiększony poziom alfa-defensyn (HNP1-3) i beta-defensyn (HBD-1 i HBD-2).
4. W przewlekłym umiarkowanym zapaleniu przyzębia wysoki poziom alfa-defensyn (HNP1-3) w ślinie może stanowić marker diagnostyczny.

## 7. STRESZCZENIE

### **Ocena występowania alfa- i beta-defensyn w ślinie osób dorosłych z aktywną próchnicą zębów lub przewlekłym zapaleniem przyzębia**

Próchnica zębów jest przewlekłą chorobą bakteryjną, w której dochodzi do demineralizacji oraz rozpadu tkanek twardej zęba. Istotną rolę w rozwoju próchnicy posiada biofilm płytki nazębnej, złożony z mikroorganizmów oraz produkowanych przez nie substancji organicznych i nieorganicznych. Wpływ na rozwój próchnicy mają również: dieta, skład śliny (m.in. zawartość defensyn), jej przepływ i zdolność buforowa, działanie substancji przeciwbakteryjnych, higiena jamy ustnej, itp.

Przewlekłe zapalenie przyzębia jest chorobą tkanek dziąsła, kości zębodołu, ozębnej i cementu korzeniowego. Choroba prowadzi z czasem do utraty tkanek przyzębia i ostatecznie do wypadania zębów. W zainicjowaniu periodontitis bierze udział biofilm płytki nazębnej, natomiast w rozwoju choroby dużą rolę odgrywa zaburzona odpowiedź immunologiczna gospodarza. Istotne znaczenie w jamie ustnej odgrywa ślina i jej składniki, w tym substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Należą do nich m.in. stateryna, histatyny, lizozym, laktoperoksydaza i defensyny.

Defensyny są krótkimi peptydami kationowymi, o małej masie cząsteczkowej (3-5 kDa). Wiele z nich cechuje się zdolnością do zabijania bakterii, grzybów oraz wirusów. Niektóre mają też działanie przeciwnowotworowe. U człowieka występuje 7 defensyn alfa (HNP1-4, HD5-6 i NP5), oraz 11 defensyn beta (w tym HBD1-4).

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena występowania defensyn w ślinie dorosłych osób. Badania prowadzono realizując następujące cele szczegółowe:

1. Ocena stężenia alfa- i beta-defensyn w ślinie zdrowych dorosłych osób.
2. Ocena stężenia alfa- i beta-defensyn w ślinie dorosłych osób w przebiegu procesu próchnicowego zębów.
3. Ocena stężenia alfa- i beta-defensyn w ślinie dorosłych osób z przewlekłym umiarkowanym zapaleniem przyzębia

Badaniami objęto 135 dorosłych pacjentów (62 kobiety i 73 mężczyzn) w wieku 20-45 lat. Grupę 1 stanowiło 25 osób wolnych od próchnicy i chorób przyzębia. Grupę 2 stanowiło 85 pacjentów z aktywną próchnicą zębów, których podzielono na trzy podgrupy: 2A

zawierającą 25 osób z niską intensywnością próchnicy, 2B - 30 osób z umiarkowaną intensywnością próchnicy, 2C - 30 osób z wysoką intensywnością próchnicy. Do grupy 3 należało 25 pacjentów z przewlekłym umiarkowanym zapaleniem przyzębia, wolnych od próchnicy lub z bardzo niską intensywnością próchnicy.

Materiał do badań stanowiły próbki pełnej śliny spoczynkowej. Kliniczne badanie stomatologiczne obejmowało badanie podmiotowe oraz przedmiotowe. Oznaczenie poziomów defensyn wykonano w ślinie spoczynkowej uzyskanej od pacjentów metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że w grupie 3 pacjentów z umiarkowanym zapaleniem przyzębia występowały istotnie statystycznie najwyższe poziomy alfa-defensyn HNP 1-3 oraz beta-defensyn HBD-1 i HBD-2. Poziomy HNP 1-3 były około 3-krotnie wyższe w grupie 3 niż w pozostałych grupach pacjentów. Poziomy HBD-2 były około 4-krotnie wyższe w grupie 3 niż w pozostałych grupach pacjentów. Natomiast, w przypadku HBD-2 ich poziomy były około 1,5 razy wyższe w podgrupie 2B i 2C w porównaniu do grupy 1 i podgrupy 2A, oraz około 2 razy wyższe w grupie 3 niż w grupie 1 i podgrupie 2A.

Wnioski:

1. Postęp intensywności próchnicy zębów nie jest związany z zaburzeniami poziomów alfa-defensyn (HNP1-3) w ślinie.
2. Postęp intensywności próchnicy zębów jest związany z istotnie podwyższonym poziomem beta-defensyny HBD-2 w ślinie, jednocześnie przy braku zmian w koncentracji HBD-1.
3. W umiarkowanym przewlekłym zapaleniu przyzębia występuje w ślinie istotnie zwiększony poziom alfa-defensyn (HNP1-3) i beta-defensyn (HBD-1 i HBD-2).
4. W przewlekłym umiarkowanym zapaleniu przyzębia wysoki poziom alfa-defensyn (HNP1-3) w ślinie może stanowić marker diagnostyczny.

## 8. SUMMARY

### **Assessment of the occurrence of alpha and beta-defensins in the saliva of adults with active tooth decay or chronic periodontitis**

Tooth decay is a chronic bacterial disease in which demineralization and breakdown of hard dental tissues occurs. An important role in the development of caries is provided by plaque biofilm, composed from microorganisms and organic and inorganic substances produced by them. The diet, saliva composition (including the content of defensins), its flow and buffering capacity, the effect of antibacterial substances, oral hygiene, etc. also have an impact on the development of caries.

Chronic periodontitis is a disease of gingival tissues, alveolar bone, periodontium and root cement. The disease leads over time to the loss of periodontal tissues and eventually to tooth loss. In the initiation of periodontitis, plaque biofilm is involved, while the disturbed immune response of the host plays a major role in the development of the disease. Saliva and its components play an important role in the oral cavity, including substances with antimicrobial activity. These include staterin, histatins, lysozyme, lactoperoxidase and defensins.

Defensins are short cationic peptides of low molecular weight (3-5 kDa). Many of them are characterized by the ability to kill bacteria, fungi and viruses. Some also have anti-cancer activity. In humans there are 7 defensins alpha (HNP1-4, HD5-6 and NP5), and 11 defensins of beta (including HBD1-4).

The aim of the present dissertation was to assess the occurrence of defensins in the saliva of adults. The research was carried out with the following specific objectives:

1. Assessment of the occurrence of alpha- and beta-defensins in the saliva of healthy adults.
2. Assessment of the occurrence of alpha- and beta-defensins in the saliva of adults in the context of the intensity of the active carious process of teeth.
3. Assessment of the occurrence of alpha- and beta-defensins in the saliva of adults with chronic moderate periodontitis.

The study included 135 adult patients (62 women and 73 men) aged 20-45 years. Group 1 consisted of 25 people free from dental caries and periodontal disease. Group 2

consisted of 85 patients with active tooth decay, divided into three subgroups: 2A containing 25 people with low intensity of caries, 2B - 30 people with moderate intensity of caries, 2C - 30 people with high intensity of caries. Group 3 included 25 patients with chronic moderate periodontitis, free from caries or with very low intensity of caries.

The material for the examinations were samples of full resting saliva. The clinical dental examination included subject and object examination. Determination of defensin levels was performed in resting saliva obtained from patients with the enzyme immunoenzymatic method (ELISA).

In the conducted studies, it was found that in the group of 3 of patients with moderate periodontitis there were statistically significant highest levels of alpha-defensins HNP 1-3 and beta-defensins HBD-1 and HBD-2. HNP 1-3 levels were approximately 3-fold higher in group 3 than in other groups of patients. HBD-2 levels were approximately 4-fold higher in group 3 than in other groups of patients. However, in the case of HBD-2 their levels were about 1.5 times higher in subgroups 2B and 2C compared to group 1 and subgroup 2A, and about 2 times higher in group 3 than in group 1 and subgroup 2A.

#### Conclusions:

1. The progress of the intensity of dental caries is not associated with disturbances of alpha-defensin levels (HNP1-3) in saliva.
2. The progress of the intensity of dental caries is associated with a significantly elevated level of HBD-2 beta-defensin in saliva, at the same time with no changes in the concentration of HBD-1.
3. In moderate chronic periodontitis, there is a significantly increased level of alpha-defensins (HNP1-3) and beta-defensins (HBD-1 and HBD-2) in saliva.
4. In chronic moderate periodontitis, high levels of alpha-defensins (HNP1-3) in saliva may be a diagnostic marker.

## 9. WYKAZ TABEL I RYCIN

### RYCINY

- Rycina 1.** Ekologiczna hipoteza płytki nazębnej (na podstawie [Marsh, 2016]).
- Rycina 2.** Schemat podstawowych czynników etiologicznych próchnicy (na podstawie [Fejerskov i Manji, 1990; Selwitz i wsp., 2007]).
- Rycina 3.** Podział próchnicy (na podstawie [Kettler, 1994; Kaczmarek, 2004; Fejerskov i Kidd, 2006]).
- Rycina 4.** Klasyfikacja bakterii poddziąsłowych w kompleksach Socransky'ego (na podstawie [Socransky i wsp., 1998a; Socransky i wsp., 1998b]).
- Rycina 5.** Dimer defensyny HNP-1. Model wykonany przy użyciu oprogramowania SWISS-MODEL [<https://swissmodel.expasy.org/>], na podstawie sekwencji aminokwasowej uzyskanej z bazy UniProt [<https://www.uniprot.org/>].
- Rycina 6.** Defensyna HBD-1. Model wykonany przy użyciu oprogramowania SWISS-MODEL [<https://swissmodel.expasy.org/>], na podstawie sekwencji aminokwasowej uzyskanej z bazy UniProt [<https://www.uniprot.org/>].
- Rycina 7.** Porównanie miejsca syntezy defensyn alfa i beta w jamie ustnej człowieka.
- Rycina 8.** Grupy pacjentów zakwalifikowanych do badań.
- Rycina 9.** Pacjent z licznymi ubytkami próchnicowymi.
- Rycina 10.** Ubytek próchnicowy na powierzchni żującej zębów 37 i 38.
- Rycina 11.** Przykładowe zdjęcia pantomograficzne pacjentów z licznymi ubytkami próchnicowymi.
- Rycina 12.** Przykładowe zdjęcia pantomograficzne pacjentów z umiarkowanym zapaleniem przyzębia.
- Rycina 13.** Przykładowe zdjęcia z tomografii komputerowej (CBCT) pacjentów z zapaleniem przyzębia.
- Rycina 14.** Czytnik Elisa 250 (BioMerieux).
- Rycina 15.** Zestaw Human Beta-defensin 1, BD-1 ELISA Kit (EIAab) do oznaczania poziomu  $\beta$ -defensyny 1.

**Rycina 16.** Zestaw Human beta-Defensin-2 (BD-2) ELISA Kit (Alpha Diagnostic International) do oznaczania poziomu  $\beta$ -defensyny 2.

**Rycina 17.** Poziomy alfa-defensyn HNP 1-3 w badanych grupach pacjentów.

**Rycina 18.** Poziomy beta-defensyny HBD-1 w badanych grupach pacjentów.

**Rycina 19.** Poziomy beta-defensyny HBD-2 w badanych grupach pacjentów.

## TABELE

**Tabela 1.** Klasyfikacja i znaczenie bakterii odpowiedzialnych za choroby przyzębia (na podstawie [Socransky i Haffajee, 2002; Lima i wsp., 2015]).

**Tabela 2.** Sekwencje aminokwasowe wybranych defensyn człowieka (na podstawie [Bowdish i wsp., 2006]).

**Tabela 3.** Charakterystyka wybranych defensyn alfa człowieka (na podstawie [Żyłowska i wsp., 2011; Jarczak i wsp., 2013; Suarez-Carmona i wsp., 2015; Niedźwiedzka-Rystwej i Deptuła, 2008; Droin i wsp., 2009]).

**Tabela 4.** Charakterystyka wybranych defensyn beta człowieka (na podstawie [Żyłowska 2011; Jarczak 2013; Suarez-Carmona 2015; Niedźwiedzka-Rystwej 2008; Droin 2009]).

**Tabela 5.** Wartości badanych wskaźników stomatologicznych w grupie 1 (pacjenci wolni od próchnicy i chorób przyzębia), grupie 2 (pacjenci z aktywną próchnicą zębów) oraz w grupie 3 (pacjenci z umiarkowanym zapaleniem przyzębia).

**Tabela 6.** Wartości badanych wskaźników stomatologicznych w podgrupach grupy 2 (pacjenci z aktywną próchnicą: z niską intensywnością - podgrupa 2A, z umiarkowaną intensywnością - podgrupa 2B i z wysoką intensywnością - podgrupa 2C).

**Tabela 7.** Poziomy alfa-defensyn HNP1-3 oraz beta-defensyn HBD-1 i HBD-2 w grupie 1 (pacjenci wolni od próchnicy i chorób przyzębia), grupie 2 (pacjenci z aktywną próchnicą zębów) oraz w grupie 3 (pacjenci z umiarkowanym zapaleniem przyzębia).

**Tabela 8.** Poziomy alfa-defensyn HNP1-3 oraz beta-defensyn HBD-1 i HBD-2 w podgrupach grupy 2 (pacjenci z aktywną próchnicą: z niską intensywnością - podgrupa 2A,



z umiarkowaną intensywnością - podgrupa 2B i z wysoką intensywnością - podgrupa 2C).

**Tabela 9.** Wyniki korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) u pacjentów Grupy 1 (osoby wolne od próchnicy i chorób przyzębia).

**Tabela 10.** Wyniki korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) u pacjentów Grupy 2 (pacjenci z aktywną próchnicą zębów).

**Tabela 11.** Wyniki korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) u pacjentów Grupy 3 (pacjenci z umiarkowanym zapaleniem przyzębia).

**Tabela 12.** Wyniki korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) u pacjentów podgrupy 2A, z niską intensywnością próchnicy.

**Tabela 13.** Wyniki korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) u pacjentów podgrupy 2B, z umiarkowaną intensywnością próchnicy.

**Tabela 14.** Wyniki korelacji pomiędzy wskaźnikami klinicznymi (PUW, P, CAL, PD i GI) oraz stężeniami defensyn (HNP1-3, HBD-1 i HBD-2) u pacjentów podgrupy 2C, z wysoką intensywnością próchnicy.

## 10. PIŚMIENNICTWO

1. Aas J.A., Griffen A.L., Dardis S.R., Lee A.M., Olsen I., i wsp. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(4): 1407-1417.
2. Aas J.A., Paster B.J., Stokes L.N., Olsen I., Dewhirst F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11): 5721-5732.
3. Abiko Y., Jinbu Y., Noguchi T., Nishimura M., Kusano K., i wsp. Upregulation of human beta-defensin 2 peptide expression in oral lichen planus, leukoplakia and candidiasis. an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract.* 2002; 198(8): 537-542.
4. Barrientos S., Rodríguez A. Production of glucosyltransferase B and glucans by *Streptococcus mutans* strains isolated from caries-free individuals. *Acta Odontol Latinoam.* 2011; 24(3): 258-264.
5. Becker M.R., Paster B.J., Leys E.J., Moeschberger M.L., Kenyon S.G., i wsp. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1001-1009.
6. Bensch K.W., Raida M., Magert H.J., Schulz-Knappe P., Forssmann W.G. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* 1995; 368: 331-335.
7. Bowdish D.M., Davidson D.J., Hancock R.E. Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; 306: 27-66.
8. Bradshaw D.J., Lynch R.J. Diet and the microbial aetiology of dental caries: new paradigms. *Int Dent J.* 2013; 63 Suppl 2: 64-72.
9. Carpenter G.H. The secretion, components, and properties of saliva. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2013; 4: 267-276.
10. Carramolino-Cuéllar E., Tomás I., Jiménez-Soriano Y. Relationship between the oral cavity and cardiovascular diseases and metabolic syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014; 19(3): e289-294.
11. Chałas R., Wójcik-Chęcińska I., Woźniak M.J., Grzonka J., Świążkowski W., Kurzydłowski K.J. Płytką bakteryjna jako biofilm – zagrożenia w jamie ustnej oraz sposoby zapobiegania. *Postepy Hig Med Dosw.* 2015; 69: 1140-1148.

12. Chaly Y.V., Paleolog E.M., Kolesnikova T.S., Tikhonov Petratchenko E.V., Voitenok N.N. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur Cytokine Netw.* 2000; 11: 257-266.
13. Chang T.L., Vargas J.Jr, DelPortillo A., Klotman M.E. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *J Clin Invest.* 2005; 115(3): 765-773.
14. Chen H., Xu Z., Peng L., Fang X., Yin X., i wsp. Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides.* 2006; 27(4): 931-940.
15. Chhour K.L., Nadkarni M.A., Byun R., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(2): 843-849.
16. Chroma S., Iwanicka-Grzegorek E. Antybakteryjne peptydy ślinowe - na podstawie piśmiennictwa. Salivary antimicrobial peptide - literature review. *Nowa Stomatol.* 2009; 4: 117-121.
17. Chukkapalli S.S., Ambadapadi S., Varkoly K., Jiron J., Aguirre J.I., i wsp. Impaired innate immune signaling due to combined Toll-like receptor 2 and 4 deficiency affects both periodontitis and atherosclerosis in response to polybacterial infection. *Pathog Dis.* 2018; 76(8): doi: 10.1093/femspd/fty076.
18. Clarke J.K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol.* 1924; 5: 141-147.
19. Colombo N.H., Ribas L.F., Pereira J.A., Kreling P.F., Kressirer C.A., i wsp. Antimicrobial peptides in saliva of children with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2016; 69: 40-46.
20. Costalonga M., Herzberg M.C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett.* 2014; 162(2 Pt A): 22-38.
21. Daher K.A., Selsted M.E., Lehrer R.I. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* 1986; 60: 1068-1074.
22. Dale B.A., Krisanaprakornkit S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med.* 2001; 30(6): 321-327.
23. Dale B.A., Tao R., Kimball J.R., Jurevic R.J. Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. *BMC Oral Health.* 2006; 6 Suppl 1: S13.

24. Dale B.A., Tao R., Kimball J.R., Jurevic R.J. Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. *BMC Oral Health*. 2006; 6 Suppl 1: S13.
25. de Almeida Pdel V., Grégio A.M., Machado M.A., de Lima A.A., Azevedo L.R. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*. 2008; 9(3): 72-80.
26. de Leeuw E., Li C., Zeng P., Diepeveen-de Buin M., Lu W.Y., i wsp. Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II. *FEBS Lett*. 2010; 584: 1543-1548.
27. Dewhirst F.E., Chen T., Izard J., Paster B.J., Tanner A.C., i wsp. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010; 192(19): 5002-5017.
28. Dietrich T., Webb I., Stenhouse L., Pattni A., Ready D., i wsp. Evidence summary: the relationship between oral and cardiovascular disease. *Br Dent J*. 2017; 222(5): 381-385.
29. Droin N., Hendra J.-B., Ducoroy P., Solary E. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules. *J Proteomics*. 2009; 72(6): 918-927.
30. Dunsche A., Açil Y., Siebert R., Harder J., Schröder J.M., Jepsen S. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med*. 2001; 30(3): 154-158.
31. Ericksen B., Wu Z., Lu W., Lehrer R.I. Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 269-275.
32. Faustova M.O., Ananieva M.M., Basarab Y.O., Dobrobolska O.V., Vovk I.M., Loban G.A. Bacterial factors of cariogenicity (literature review). *Wiad Lek*. 2018; 71(2 pt 2): 378-382.
33. Featherstone J.D. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J*. 2008; 53(3): 286-291.
34. Featherstone J.D. The caries balance: the basis for caries management by risk assessment. *Oral Health Prev Dent*. 2004; 2 Suppl 1: 259-264.
35. Fejerskov O., Kidd E. Red. wyd. pol. Kaczmarek U. Próchnica zębów. Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne. Wyd. 1. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2006.

36. Fejerskov O., Manji F. Reactor paper: risk assessment in dental caries. W: Bader J.D., red. Risk assessment in dentistry. Chapel Hill: University of North Carolina Dental Ecology, 1990: 215-217.
37. Fernie-King B.A., Seilly D.J., Lachmann P.J. Inhibition of antimicrobial peptides by group A streptococci: SIC and DRS. *Biochem Soc Trans.* 2006; 34(Pt 2): 273-275.
38. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9): 623-633.
39. Forte L.F., Cortelli S.C., Cortelli J.R., Aquino D.R., de Campos M.V., i wsp. Psychological stress has no association with salivary levels of  $\beta$ -defensin 2 and  $\beta$ -defensin 3. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39(10): 765-769.
40. Frencken J.E., Sharma P., Stenhouse L., Green D., Lavery D., Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol.* 2017; 44 Suppl 18: S94-S105.
41. Funderburg N., Lederman M.M., Feng Z., Drage M.G., Jadowsky J., i wsp. Human-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(47): 18631-18635.
42. Gardner M.S., Rowland M.D., Siu A.Y., Bundy J.L., Wagener D.K., Stephenson J.L. Comprehensive defensin assay for saliva. *Anal Chem.* 2009; 81(2): 557-566.
43. Ghosh S.K., Gerken T.A., Schneider K.M., Feng Z., McCormick T.S., Weinberg A. Quantification of human beta-defensin-2 and -3 in body fluids: application for studies of innate immunity. *Clin Chem.* 2007; 53(4): 757-765.
44. Goebel C., Mackay L.G., Vickers E.R., Mather L.E. Determination of defensin HNP-1, HNP-2, and HNP-3 in human saliva by using LC/MS. *Peptides.* 2000; 21(6): 757-765.
45. Gorr S.U., Abdolhosseini M. Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2011; 38 (Suppl 11): 126-141.
46. Górska R. Raport grupy roboczej Amerykańskiej Akademii Periodontologicznej o aktualizacji klasyfikacji chorób przyzębia. *Dent Med Probl.* 2015; 52(4): 462-465.
47. Górska R. Raport grupy roboczej Amerykańskiej Akademii Periodontologicznej o aktualizacji klasyfikacji chorób przyzębia. *Dent Med Probl.* 2015; 52(4): 462-465.
48. Greer A., Zenobia C., Darveau R.P. Defensins and LL-37: a review of function in the gingival epithelium. *Periodontol 2000.* 2013; 63(1): 67-79.

49. Szydłarska D., Grzebiuk W., Kupstas A., Bar-Andziak E. Ślina jako materiał diagnostyczny. *Forum Med Rodz.* 2008; 2(6): 454-464.
50. Gürsoy M., Gürsoy U.K., Liukkonen A., Kauko T., Penkkala S., Könönen E. Salivary antimicrobial defensins in pregnancy. *J Clin Periodontol.* 2016; 43(10): 807-815.
51. Haffajee A.D., Socransky S.S., Patel M.R., Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(3): 196-205.
52. Haffajee A.D., Teles R.P., Patel M.R., Song X., Veiga N., Socransky S.S. Factors affecting human supragingival biofilm composition. I. Plaque mass. *J Periodontal Res.* 2009; 44(4): 511-519.
53. He X.S., Shi W.Y. Oral microbiology: past, present and future. *Int J Oral Sci.* 2009; 1: 47-58.
54. Hofman J., Szkaradkiewicz A.K., Karpiński T.M. Ocena występowania defensyn (HNP 1-3) w ślinie i surowicy osób z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Evaluation of defensin (HNP 1-3) presence in saliva and serum of patients with chronic periodontitis. *Czas. Stomatol.* 2008; 61(12): 881-885.
55. Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T., Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88: 982-990.
56. <https://swissmodel.expasy.org/>
57. <https://www.uniprot.org/>
58. Huang R., Li M., Gregory R.L. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011; 2: 435-444.
59. Human Oral Microbiome Database. The Forsyth Institute. <http://www.homd.org/> (stan na dzień 13.01.2018).
60. Hyde S., Dupuis V., Mariri B.P., Darteville S. Prevention of tooth loss and dental pain for reducing the global burden of oral diseases. *Int Dent J.* 2017; 67 Suppl 2: 19-25.
61. Ismail A.I., Sohn W., Tellez M., Amaya A., Sen A., i wsp. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007; 35(3): 170-178.
62. Jańczuk Z. *Praktyczna periodontologia kliniczna.* Wyd. Kwintesencja, 2004.

63. Jarczak J., Kościuczuk E.M., Lisowski P., Strzałkowska N., Józwik A., i wsp. Defensins: Natural component of human innate immunity. *Human Immunol.* 2013; 74: 1069-1079.
64. Joly S., Maze C., McCray P.B., Jr., Guthmiller J.M. Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1024-1029.
65. Jurczak A., Kościelniak D., Papież M., Vyhouskaya P., Krzyściak W. A study on  $\beta$ -defensin-2 and histatin-5 as a diagnostic marker of early childhood caries progression. *Biol Res.* 2015; 48: 61.
66. Kaczmarek U. Przebieg kliniczny i podział próchnicy zębów. W: *Stomatologia zachowawcza. Zarys kliniczny.* Red.: Jańczuk Z., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004: 245-254.
67. Kalesinskas P., Kačergius T., Ambrozaitis A., Pečiulienė V., Ericson D. Reducing dental plaque formation and caries development. A review of current methods and implications for novel pharmaceuticals. *Stomatologija.* 2014; 16(2): 44-52.
68. Kamińska A., Szalewski L., Batkowska J., Wallner J., Wallner E., i wsp. The dependence of dental caries on oral hygiene habits in preschool children from urban and rural areas in Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2016; 23(4): 660-665.
69. Karpiński T.M. Role of oral microbiota in cancer development. *Microorganisms.* 2019; 7(1): 20.
70. Karpiński T.M., Szkaradkiewicz A.K. Human defensins. *Arch Biomed Sci.* 2013; 1(1): 1-5.
71. Karpiński T.M., Szkaradkiewicz A.K. Microbiology of dental caries. *J Biol Earth Sci.* 2013; 3(1): M21-M24.
72. Kesting M.R., Loeffelbein D.J., Hasler R.J., Wolff K.D., Rittig A., i wsp. Expression profile of human beta-defensin 3 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Invest.* 2009; 27(5): 575-581.
73. Kettler W., red. Red. wyd. pol. Potoczek S. *Stomatologia zachowawcza I.* Urban & Partner, Wrocław, 1994.

74. Kida-Takaoka S., Yamaai T., Mizukawa N., Murakami J., Iida S. Surrounding cells affect the gene expression pattern of human beta-defensins in squamous cell carcinoma in vitro. *Anticancer Res.* 2014; 34(11): 6443-6449.
75. Kim C., Gajendran N., Mittrücker H.W., Weiwad M., Song Y.H., i wsp. Human alpha-defensins neutralize anthrax lethal toxin and protect against its fatal consequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(13): 4830-4835.
76. Klotman M.E., Chang T.L. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(6): 447-456.
77. Krisanaprakornkit S., Kimball J.R., Weinberg A., Darveau R.P., Bainbridge B.W., Dale B.A. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathway and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun.* 2000; 68: 2907-2915.
78. Krisanaprakornkit S., Weinberg A., Perez C.N., Dale B.A. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun.* 1998; 66(9): 4222-4228.
79. Kucukkolbasi H., Kucukkolbasi S., Dursun R., Ayyildiz F., Kara H. Determination of defensin HNP-1 in human saliva of patients with oral mucosal diseases. *J Immunoassay Immunochem.* 2011; 32: 284-295.
80. Kudryashova E., Seveau S.M., Kudryashov D.S. Targeting and inactivation of bacterial toxins by human defensins. *Biol Chem.* 2017; 398(10): 1069-1085.
81. Lee S.H., Jun H.K., Lee H.R., Chung C.P., Choi B.K. Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS)-neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 35(2): 138-145.
82. Lehrer R.I., Barton A., Daher K.A., Harwig S.S., Ganz T., Selsted M.E. Interaction of human defensins with *Escherichia coli* mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest.* 1989; 84: 553-561.
83. Lima D.P., Moimaz S.A., Garbin C.A., Sumida D.H., Jardim E.G.Jr, Okamoto A.C. Occurrence of Socransky red complex in pregnant women with and without periodontal disease. *Oral Health Prev Dent.* 2015; 13(2): 169-176.
84. Løe H., Silness J. Periodontal disease in pregnancy. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odont Scand.* 1963a; 22: 121-134.



85. Løe H., Silness J. Periodontal disease in pregnancy. Prevalence and severity. *Acta Odont Scand.* 1963b; 21: 533.
86. Loesche W.J. Microbiology of dental decay and periodontal disease. W: Baron S, red. *Medical microbiology.* Wyd. 4. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
87. Manton D., Drummond B.K., Kilpatrick N. Próchnica zębów. W: Cameron A.C., Widmer R.P., red. *Stomatologia dziecięca.* Wyd. 2. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2013.
88. Marsch P.D., Martin M.V. *Oral microbiology.* Wyd. 5. Elsevier, 2009.
89. Marsh P.D. Dental biofilms in health and disease. W: Goldberg M., red. *Understanding dental caries: from pathogenesis to prevention and therapy.* Springer, 2016.
90. Marsh P.D., Do T., Beighton D., Devine D.A. Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000.* 2015; 70(1): 80-92.
91. Matsui R., Cvitkovitch D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans* *Future Microbiol.* 2010; 5(3): 403-417.
92. Mattar E.H., Almehdar H.A., Yacoub H.A., Uversky V.N., Redwan E.M. Antimicrobial potentials and structural disorder of human and animal defensins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016; 28: 95-111.
93. Milewska R., Łuczaj-Cepowicz E. Ocena stanu uzębienia i potrzeb leczniczych u 6- i 12-letnich dzieci w Białymstoku. *Nowa Stomatologia* 2004; 4: 153-156.
94. Miskiewicz A., Szparecki G. Zapalenie przyzębia jako czynnik ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. *Dent Med Probl.* 2010; 47(4): 472-477.
95. Mizukawa N., Sugiyama K., Fukunaga J., Ueno T., Mishima K., i wsp. Defensin-1, a peptide detected in the saliva of oral squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res.* 1998; 18(6B): 4645-4649.
96. Mizukawa N., Sugiyama K., Ueno T., Mishima K., Takagi S., Sugahara T. Defensin-1, an antimicrobial peptide present in the saliva of patients with oral diseases. *Oral Dis.* 1999; 5(2): 139-142.
97. Mombelli A. Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications. *Oral Dis.* 2003; 9(Suppl 1): 6-10.
98. Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Joucla G., Willemot R.M., Remaud-Simeon M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* 2001; 11: 675-685.

99. Moon S.K., Lee H.Y., Li J.D., Nagura M., Kang S.H., i wsp. Activation of a Src-dependent Raf-MEK 1/2-ERK signaling pathway is required for IL-1 alpha-induced up regulation of beta-defensin 2 in human middle ear epithelial cells. *Biochem Biophys Acta*. 2002; 1590: 41-51.
100. Moynihan P., Petersen P.E. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutr*. 2004; 7(1A): 201-226.
101. Munson M.A., Banerjee A., Watson T.F., Wade W.G. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(7): 3023-3029.
102. Niedźwiedzka-Rystwej P., Deptuła W. Defensyny - ważny wrodzony element układu odpornościowego u ssaków. Defensins: An important innate element of the immune system in mammals. *Postepy Hig Med Dosw*. 2008; 62: 524-529.
103. Nyvad B., Fejerskov O. Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. *Community Dent. Oral Epidemiol*. 1997; 25: 69-75.
104. Ouhara K., Komatsuzawa H., Yamada S., Shiba H., Fujiwara T., i wsp. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55(6): 888-896.
105. Park M.S., Kim J.I., Lee I., Park S., Bae J.Y., Park M.S. Towards the application of human defensins as antivirals. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018; 26(3): 242-254.
106. Pasich E., Walczewska M., Pasich A., Marcinkiewicz J. Mechanizm i czynniki ryzyka powstawania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej. *Postepy Hig Med Dosw*. 2013; 67: 736-741.
107. Paster B.J., Olsen I., Aas J.A., Dewhirst F.E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*. 2006; 42: 80-87.
108. Pawka B., Dreher P., Herda J., Szwiec I., Krasicka M. Próchnica zębów u dzieci problemem społecznym. *Probl Hig Epidemiol* 2010; 91(1): 5-7.
109. Pazgier M., Hoover D.M., Yang D., Lu W., Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63: 1294-1313.

110. Pereira A.L., Franco G.C., Cortelli S.C., Aquino D.R., Costa F.O., i wsp. Influence of periodontal status and periodontopathogens on levels of oral human  $\beta$ -defensin-2 in saliva. *J Periodontol.* 2013; 84(10): 1445-1453.
111. Pereira A.L., Holzhausen M., Franco G.C., Cortelli S.C., Cortelli J.R. Human  $\beta$ -defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(12): 1609-1614.
112. Polesello V., Segat L., Crovella S., Zupin L. *Candida* infections and human defensins. *Protein Pept Lett.* 2017; 24(8): 747-756.
113. Preshaw P.M., Alba A.L., Herrera D., Jepsen S., Konstantinidis A., i wsp. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia.* 2012; 55(1): 21-31.
114. Röhl J., Yang D., Oppenheim J.J., Hehlhans T. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *J Immunol.* 2010; 184(12): 6688-6694.
115. Rozen R., Bachrach G., Bronshteyn M., Gedalia I., Steinberg D. The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 195(2): 205-210.
116. Sansone C., Van Houte J., Joshipura K., Kent R., Margolis H.C. The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *J Dent Res.* 1993; 72: 508-516.
117. 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 Investig.* 2003; 7: 181-188.
118. Selwitz R.H., Ismail A., Pitts N.B. Dental caries. *Lancet.* 2007; 369: 51-59.
119. Shi N., Jin F., Zhang X., Clinton S.K., Pan Z., Chen T. Overexpression of human  $\beta$ -defensin 2 promotes growth and invasion during esophageal carcinogenesis. *Oncotarget.* 2014; 5(22): 11333-11344.
120. Shuyi Y., Feng W., Jing T., Hongzhang H., Haiyan W., i wsp. Human beta-defensin-3 (hBD-3) upregulated by LPS via epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways to enhance lymphatic invasion of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(5): 616-625.

121. Składnik-Jankowska J., Pregiel B., Wrzyszczyk-Kowalczyk A., Kaczmarek U. Zastosowanie ozonu w leczeniu próchnicy korzeni zębów. *Dent Med Probl.* 2005; 42(2): 273-279.
122. Socransky S.S., Haffajee A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology.* 2002; 28: 12-55.
123. Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Song X., Smith C., Kent R.L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 134-144.
124. Socransky S.S., Haffajee A.D., Dzink J.L. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *J Clin Periodontol.* 1988; 15(7): 440-444.
125. Strużycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol.* 2014; 63(2): 127-135.
126. Suarez-Carmona M., Hubert P., Delvenne P., Herfs M. Defensins: "Simple" antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26(3): 361-370.
127. Szkaradkiewicz A.K., Karpiński T.M. Microbiology of chronic periodontitis. *J Biol Earth Sci.* 2013; 3(1): M14-M20.
128. Takahashi N., Nyvad B. Ecological hypothesis of dentin and root caries. *Caries Res.* 2016; 50(4): 422-431.
129. Tao R., Jurevic R.J., Coulton K.K., Tsutsui M.T., Roberts M.C., i wsp. Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(9): 3883-3888.
130. Thomas R.Z., Zijng V., Ciçek A., de Soet J.J., Harmsen H.J., Huysmans M.C. Shifts in the microbial population in relation to in situ caries progression. *Caries Res.* 2012; 46(5): 427-431.
131. Tonetti M.S., Greenwell H., Kornman K.S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 2018; 89 Suppl 1: S159-S172.
132. Toomarian L., Sattari M., Hashemi N., Tadayon N., Akbarzadeh Baghban A. Comparison of neutrophil apoptosis,  $\alpha$ -defensins and calprotectin in children with and without severe early childhood caries. *Iran J Immunol.* 2011; 8(1): 11-19.

133. van Ruyven F.O., Lingstrom P., van Houte J., Kent R. Relationship among mutans streptococci, "low-pH" bacteria, and iodophilic polysaccharideproducing bacteria in dental plaque and early enamel caries in humans. *J Dent Res.* 2000; 79: 778-784.
134. Vardar-Sengul S., Demirci T., Sen B.H., Erkizan V., Kurulgan E., Baylas H. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodontal Res.* 2007; 42(5): 429-437.
135. Vargas Segura A.I., Ilyina A., Segura Cenicerros E.P., Silva Belmares Y., Méndez González L. Etiology and microbiology of periodontal diseases: A review. *Afr J Microbiol Res.* 2015; 9(48): 2300-2306.
136. Velsko I.M., Overmyer K.A., Speller C., Klaus L., Collins M.J., i wsp. The dental calculus metabolome in modern and historic samples. *Metabolomics.* 2017; 13(11): 134.
137. Venkatesh E., Elluru S.V. Cone beam computed tomography: basics and applications in dentistry. *J Istanb Univ Fac Dent.* 2017; 51(3 Suppl 1): S102-S121.
138. Verma D., Garg P.K., Dubey A.K. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol.* 2018; 200(4): 525-540.
139. Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules.* 2009; 14(7): 2535-2554.
140. Wade W.G. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013; 69(1): 137-143.
141. Wasiluk K. Jak stan zębów i jamy ustnej wpływa na zdrowie całego organizmu. <http://www.zdrowie.senior.pl/75,0,Jak-stan-zebow-i-jamy-ustnej-wplywa-na-zdrowie-calego-organizmu,29867.html> [dostęp 21.06.2019]
142. Wenghoefer M., Pantelis A., Dommisch H., Reich R., Martini M i wsp. Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 37(7): 660-663.
143. WHO. Oral health surveys basic methods. Wyd. 5. World Health Organization, 2013.
144. Wilczyńska-Borawska M., Zbroch E., Małyszko J., Myśliwiec M., Stokowska W. Stan uzębienia i przyzębia chorych na cukrzycę pacjentów hemodializowanych z terenu północno-wschodniej Polski. Dental and periodontal status in diabetic hemodialyzed patients in north-eastern Poland. *Postępy Nauk Med.* 2013; 26(3): 195-200.

145. Wilde C.G., Griffith J.E., Marra M.N., Snable J.L., Scott R.W. Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J Biol Chem.* 1989; 264(19): 11200-11203.
146. Wójcicka A., Zalewska M., Czerech E., Jabłoński R., Grabowska S.Z., Maciorkowska E. Próchnica wieku rozwojowego chorobą cywilizacyjną. *Przeegl Epidemiol.* 2012; 66: 705-711.
147. Wolf H.F., Rateitschak E.M., Rateitschak K.H. *Periodontologia.* Wyd. Czelej, Lublin 2006.
148. World Health Organization. 2013. Oral health surveys: basic methods - 5th edition. [https://www.who.int/oral\\_health/publications/9789241548649/en/](https://www.who.int/oral_health/publications/9789241548649/en/)
149. Wu Z., Hoover D.M., Yang D., Boulègue C., Santamaria F., i wsp. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(15): 8880-8885.
150. [www.defensins.bii.a-star.edu.sg](http://www.defensins.bii.a-star.edu.sg)
151. Yang D., Biragyn A., Hoover D.M., Lubkowski J., Oppenheim J.J. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 181-215.
152. Yeung A.T., Gellatly S.L., Hancock R.E. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68: 2161-2176.
153. Yong X., Chen Y., Tao R., Zeng Q., Liu Z., i wsp. Periodontopathogens and human  $\beta$ -defensin-2 expression in gingival crevicular fluid from patients with periodontal disease in Guangxi, China. *J Periodontal Res.* 2015; 50(3): 403-410.
154. Yoshimoto T., Yamaai T., Mizukawa N., Sawaki K., Nakano M., i wsp. Different expression patterns of beta-defensins in human squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 2003; 23(6C): 4629-4633.
155. Zaura E., Keijsers B.J., Huse S.M., Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 259.
156. Zhou X., Zhang W., Liu X., Zhang W., Li Y. Interrelationship between diabetes and periodontitis: role of hyperlipidemia. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(4): 667-674.
157. Żyłowska M., Wszyńska A., Jagusztyn-Krynicka E.K. Defensyny - peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej. *Post. Microbiol.* 2011; 50(3): 223-234.



Podpisy członków Komisji Bioetycznej - Dotyczy Uchwały nr 957/14 z dnia 04.12.2014r.

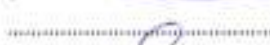
prof. dr hab. PAWEŁ CHEĆIŃSKI



prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI



prof. dr hab. ZYGMUNT ADAMSKI



dr KRYSZYNA BABIAK



dr hab. MACIEJ KRAWCZYŃSKI prof. UM



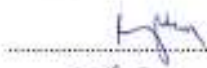
mgr JOLANTA ŁOJKO-KOŁODZIEJCZAK



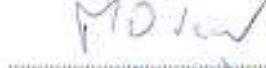
mgr KRYSZYNA MALINGER



prof. dr hab. ANDRZEJ MARSZAŁEK



prof. dr hab. MACIEJ OWECKI



prof. dr hab. WOJCIECH SŁUŻEWSKI



prof. dr hab. ROBERT SPACZYŃSKI



dr med. PIOTR TOMCZAK



prof. dr hab. JOANNA TWAROWSKA-HAUSER



ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA

prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI



**SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ**

z dnia .....04.12.2014r. ....

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1.	Przewodniczący Komisji <b>prof. dr hab. Paweł Chęciński</b>	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji <b>prof. dr hab. Janusz Wiśniewski</b>	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, Poznań
3.	<b>prof. dr hab. Zygmunt Adamski</b>	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
4.	<b>dr Krystyna Babiak</b>	prawnik	Okręgowa Izba Radców Prawnych w Poznaniu, ul. Chwałiszewo 69, Poznań
5.	<b>dr hab. Maciej Krawczyński prof. UM</b>	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
6.	<b>mgr Jolanta Lojko-Kołodziejczak</b>	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatrii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UM w Poznaniu, ul. Szpitalna 27/33, Poznań
7.	<b>mgr Krystyna Malinger</b>	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UM, ul. Polna 33, Poznań
8.	<b>prof. dr hab. Andrzej Marszałek</b>	patomorfologia	Zakład Patologii Nowotworów UM ul. Garbary 15, Poznań
9.	<b>prof. dr hab. n. med. Maciej Owecki</b>	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych UM, ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
10.	<b>prof. dr hab. Wojciech Służewski</b>	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
11.	<b>prof. dr hab. Robert Spaczyński</b>	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozroda UM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
12.	<b>dr med. Piotr Tomczak</b>	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Szamarzewskiego 82/84, Poznań
13.	<b>prof. dr hab. Joanna Twarowska- Bunzier</b>	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UM, ul. Szpitalna 27/33, Poznań
14.	<b>ks. prof. dr hab. Jerzy Troska</b>	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wierzowa 2/4, Poznań
15.	<b>prof. dr hab. Henryk Wysocki</b>	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań

## OŚWIADCZENIE BADANEGO

Nazwisko i imię osoby badanej:.....

Data urodzenia:.....

Temat badań: " Ocena występowania alfa i beta defensyn w ślinie osób dorosłych z aktywną próchnicą zębów lub przewlekłym zapaleniem przyzębia"

Niniejszym oświadczam, że zostałem/am/ poinformowany/a/ o celu zamierzonych badań i sposobie ich przeprowadzenia. Rozumiem na czym polegają badania i do czego potrzeba jest moja zgoda. Zostałem/am/ poinformowany/a/, że mogę odmówić zgody na udział w badaniach lub cofnąć ją w każdej chwili, także podczas wykonywania badań.

Wyrażam pełną i świadomą zgodę na udział w badaniu.  
Zgodę wyrażam w obecności lekarza.

.....  
Podpis badanego

.....  
Podpis przyjmującego oświadczenie

Poznań, dnia.....