

SCANNING ELEKTRONSKO MIKROSKOPSKO ISTRAŽIVANJE BAKTERIJSKE PENETRACIJE KOD POČETNOG KARIJESA HUMANE CAKLINE

Tonči Staničić, Marjan Tudja*

Zavod za dentalnu patologiju Stomatološkog fakulteta u Zagrebu

* Institut »Chromos-istraživanje« Zagreb

Primljeno 10. 9. 88.

Sažetak

Za istraživanje bakterijskog prodora u caklinu tokom najranijih manifestacija karijesnog procesa korištena je intaktna bukalna caklina 8 impaktiranih trećih trajnih donjih molara. Nakon čišćenja od organskih naslaga, svaka bukalna ploha je izrezana na pet segmenata od kojih je jedan korišten kao kontrolni uzorak, a četiri su fiksirana u utore na parcijalnim protezama dobrovoljaca. Uzorci su boravili u ustima 7, 14, 21 i 28 dana izloženi djelovanju karijesogenih faktora. Nakon odstranjenja organskih naslaga, uzorci su prelomljeni na pola. Na frakturnom poprečnom presjeku promatrana je scanning elektronskim mikroskopom bakterijska penetracija u caklinu. Kod četiri uzorka iz grupe koja je bila oralno eksponirana 7 dana nađene su na dubini od 5 do 10 μm pojedinačne bakterije kokoidnog ili bacilarnog oblika. Broj bakterija i dubina do koje su prodrle u caklinu su rasli s duljinom vremena koje su uzorci proveli u ustima. U uzorcima od 28 dana oralne eksponiranosti zapažene su i pojedinačne bakterije i u kolonijama i do dubine od 60 do 90 μm . Te bakterije unutar cakline preko sistema pora komuniciraju sa slinom i plakom, što im omogućuje produkciju metabolita, uključivo i mliječne kiseline, što im omogućuje da se same probijaju kroz caklinu, a time i mijenjaju tok i brzinu širenja karijesnog procesa.

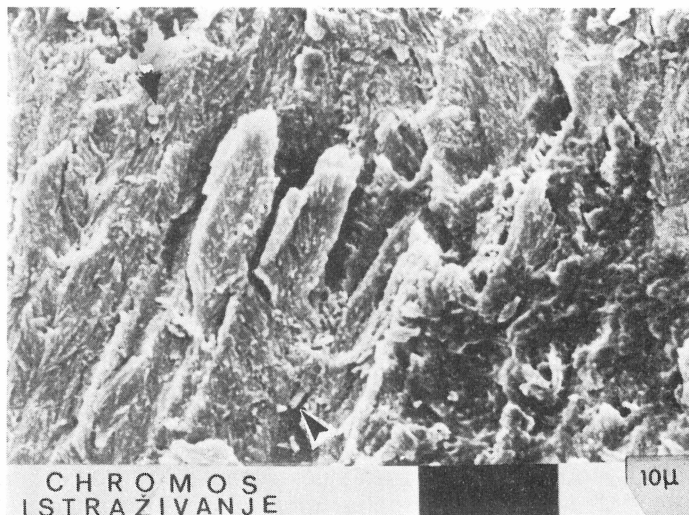
Ključne riječi: karijes, bakterije

UVOD

Općenito je vrlo rašireno mišljenje da se za cijelo vrijeme razvoja početne karijesne lezije cakline, od njenog prvog dodira s oralnim faktorima pa sve do kavitacije, bakterije nalaze na njezinoj površini. Tako smještene u organskim naslagama pelikule i plaka odašilju svoje metaboličke produkte, uključujući i mliječnu kiselinu, u dubinu cakline razarajući njezinu strukturu i mijenjajući njezin kemijski sastav. Međutim, postoje nalazi manjeg broja istraživača o postojanju bakterija i u zdravoj caklini (1) i u razvijenim početnim karijesnim lezijama (2, 3, 4, 5). Naša namjera je bila da ustanovimo bakterijsku penetraciju u caklinu u periodu samog početka karijesnog procesa, tj. prije formiranja klasične histološke slike inicijalne lezije.

MATERIJAL I METODE

Za eksperiment smo koristili bukalnu caklinu 8 impaktiranih trećih trajnih donjih molara koju smo očistili od organskih naslaga izlaganjem djelovanju 5%-tne otopine NaOCl kroz 2 sata i ultrazvučnim vibracijama 15 minuta. Nakon dezinfekcije Hibitanom i apsolutnim alkoholom, svaku bukalnu plohu smo izrezali vertikalnim rezovima na 5 segmenata širine oko 2 mm od kojih smo jedan pohranili u redestiliranu vodu kao kontrolni uzorak, a četiri fiksirali autakrilatom u utore u produžnim sedlima parcijalnih proteza dobrovoljaca. Kako bi se u in vivo okolnostima stvorili uvjeti za rano manifestiranje karijesa, dobrovoljci su zamoljeni da se pridržavaju svog uobičajenog režima prehrane, s tim da jednom dnevno pojedu ili popiju nešto slatko. Također su upozoreni da dio proteze s caklinskim uzorcima ne četkaju, nego samo isperu laganim mlazom vode kako ne bi odstranili organske naslage pelikule i plaka. Prvi uzorak je izvađen iz proteze nakon 7 dana, drugi nakon 14, treći nakon 21 i četvrti nakon 28 dana. Potom su caklinski uzorci ponovno podvrgnuti djelovanju natrijevog hipoklorita da bi se odstranile organske naslage, dehidrirani prevodenjem kroz različite koncentracije alkohola sve do apsolutnog, te zamrznuti tekućim dušikom na -173°C i poprečno prelomljeni na dva dijela. Uzorci su fiksirani na nosače u vakuum aparatu tipa S 150 Sputter Coater-Edwards slojem zlata debljine 10 do 15 nm. Uslijedilo je elektronsko mikroskopiranje lomne površine poprečnog presjeka cakline aparatom Stereoscan Cambridge 600 i fotografiranje nalaza.



Slika 1. Mikroorganizmi u uzorku 7-dnevne oralne ekspaniranosti (streljice) (2000 X)

REZULTATI

Prvi prodor bakterija u unutrašnjost cakline registrirali smo već u grupi uzoraka koji su bili 7 dana u kontaktu s oralnim karijesogenim faktorima. Na poprečnim presjecima 4 uzorka iz ove grupe mogle su se vidjeti na udaljenosti od 5 do 10 μm od vanjske površine pojedinačne bakterije tipa koka i bacila. Kod uzoraka koji su u ustima boravili 14 i 21 dan bakterije su nađene kod svih uzoraka i to do dubine od 20 do 30 μm razmještene u većim ili manjim demineralizacijskim porama, bilo pojedinačno ili u kolonijama. Najopsežniju penetraciju bakterija zapazili smo kod uzoraka 28-dnevne oralne ekspaniranosti uz dodatni nalaz i filamentoznih bakterijskih oblika.



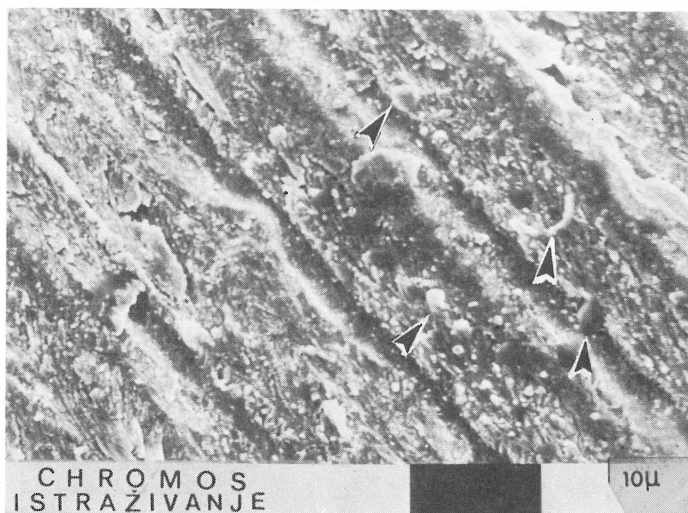
Slika 2. Uvećani detalj Sl 1. (4000 X)

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

Iako nam je bila namjera da ovim istraživanjem ustanovimo postojanje bakterijske penetracije u caklinu ipak smo bili iznenađeni dobivenim rezultatima. Naime, svi dosada zabilježeni pozitivni nalazi (2, 3, 4, 5) uglavnom su registrirani kod već dobro histološki i fizikalno-kemijski razvijenih početnih karijesnih lezija. Međutim kod ovako ranih manifestacija karijesne atake, tzv. površinskog omekšanja, dosad još nisu zabilježeni pozitivni bakterijski nalazi. Bili smo i sami iznenađeni nalazom bakterija u grupi uzoraka sedmodnevne oralne ekspaniranosti, jer smo njihovo prisustvo očekivali tek u caklinskim uzorcima koji su u ustima proveli dulji vremenski period (21 i 28 dana). Pozitivni nalaz bakterija u zdravoj caklini Newmana i Poola (1) je problematičan sa stajališta ustanovljenja zdravlja cakline, jer je njihov kriterij bio vizuelna inspekcija cakline koja je već

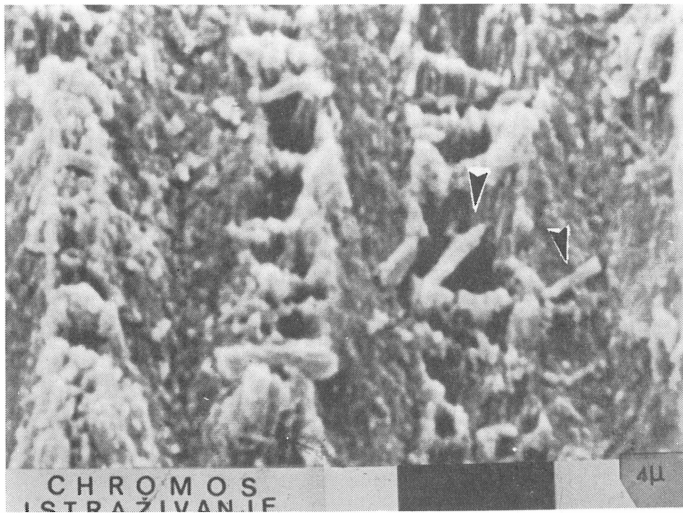


Slika 3. Male kolonije koka i bacila u caklinskom uzorku 28-dnevne ekspozicije (1000 X)

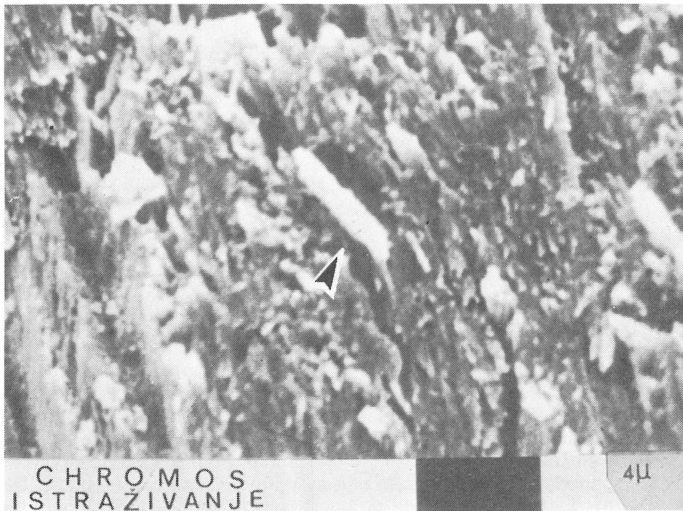


Slika 4. Uvećani detalj Sl 3. (2000 X)

dulji vremenski period boravila u ustima, a na taj način bila i izložena karijesnom djelovanju. Naprotiv, mi smo u našem istraživanju koristili caklinu impaktiranih zuba koji do početka eksperimenta nisu bili ni u kakvom dodiru s oralnim faktorima tako da sa sigurnošću možemo utvrditi da je do prodora bakterija u unutrašnjost cakline došlo u toku najranijih oblika razvoja karijesne lezije. Do takvog nalaza je moguće doći jedino kod pripravljanja uzoraka za elektronsko



Slika 5. Filamentozni oblici (strelice) mikroorganizama u caklinskim uzorcima 28-dnevne ekspozicije (4000 X).



Slika 6. Primjer filamenata u uzorku od 28 dana (4000 X).

mikroskopiranje tehnikom lomljenja uzoraka i primatranja poprečne frakturne površine. Tehnike rezanja i brušenja caklinskih uzoraka razaraju dijelove strukture i ostavljaju površinu prekrivenu strugotinama, pa je na takvim uzorcima nemoguće razaznati mikroorganizme.

Objašnjenje za ovaj rani prodor mikroorganizma u unutrašnjost relativno intaktne cakline moguće je dobiti pažljivim ispitivanjem kontrolnih uzoraka cakline. Njihove mikroanatomske specifičnosti otkrivaju brojne razvojne defekte na površini cakline u obliku malih rupica i fisura, kao i više ili manje porozno dno središnjih prizmatskih udubljenja tomesovih nastavaka. Te razvojne specifičnosti su često sasvim dovoljnog promjera za inicijalni prodor bakterija u unutrašnjost cakline. Za dublji i opsežniji prodor mikroorganizama odgovorno je demineralizacijsko stvaranje i širenje pora u interprizmatskoj i caklini, a koje je tim veće što je caklina dulje ekspanzirana karijesnim uvjetima. Prema našim nalazima, izgleda da u ovim najranijim periodima bakterijskog prodora u caklinu prevladavaju kokoidne forme, a tek kod uzoraka s dužom oralnom ekspozicijom se nešto češće nalaze bacilarne i filamentozne formacije, bilo solitarno ili u kolonijama. Ta činjenica se poklapa i s rezultatima istraživanja rane bakterijske kolonizacije caklinske površine (6, 7, 8, 9), kod koje također u početku prevladavaju različite vrste kokoidnih mikroorganizama.

Ova činjenica vrlo rane penetracije bakterija u caklinu dosta bitno mijenja naše mišljenje o bakterijskom udjelu u stvaranju i razvoju karijesa, odnosno uvriježeno mišljenje da one razaraju caklinu otpuštanjem metaboličkih produkata, uključujući i mliječnu kiselinu, a da same ostaju na površini sve do kavitacije. Naime, zbog komunikacijske povezanosti cijelog sistema pora s površinom cakline, a odatle i s plakom i slinom kao izvorima prehrane, sasvim je realna pretpostavka da i ove bakterije u dubini cakline produciraju metabolite, pa i mliječnu kiselinu. Na taj način su u stanju i same sebi stvarati prostor za daljnji i dublji prodor u caklinu, a ujedno i ubrza razvoj karijesnog procesa razaranja cakline.

SCANNING ELECTRON MICROSCOPE STUDY OF EARLY BACTERIAL PENETRATION OF HUMAN ENAMEL IN INITIAL CARIES

Summary

Bacterial penetration of enamel during initial manifestations of the carious process was studied in intact buccal enamel of 8 impacted third permanent molars. After cleaning them from organic plaque, each buccal plane was cut into five segments, one of them serving as a control specimen and the other four being fixed into slots on partial prostheses of our volunteers. The specimens were left in oral cavity for 7, 14, 21 and 28 days, where they were exposed to the action of cariogenic factors. After removal of the organic plaque, the specimens were broken in two and the bacterial penetration into enamel was observed on the fractured cross-section using scanning electron microscope. In 4 specimens from the group orally exposed during a 7-day period, individual coccoid or bacilliform bacteria were found to have penetrated 5–10 μm deep. The number of bacteria and the depth of their penetration into enamel increased with the duration of oral exposition. Among the specimens orally exposed during 28 days, bacteria were observed to be present both individually and in colonies, penetrating to the depth of 60–90 μm . These bacteria could quite easily communicate with saliva and plaque via the pore system, which allowed them to produce metabolites, including lactic acids. This, in turn, allowed them to penetrate through the enamel, thus altering both the course and rate of the carious process progression.

Key words: caries, bacteria

Literatura

1. NEWMAN HN, POOLE DFG. Observation with scanning and transmission electron microscopy on the structure of human surface enamel. *Arch Oral Biol* 1974; 19:1135-1143.
2. BRÄNNSTRÖM M, GOLA G, NORDENVALL KJ, TORSTENSON B. Invasion of microorganisms and some structural changes in incipient enamel caries. A scanning electron microscopic investigation. *Caries Res* 1980; 14:276-284.
3. HAIKEL Y, FRANK RM, VOEGEL JC. Scanning electron microscopy of surface layer of incipient carious lesions the human enamel. 1983; 17:1-13.
4. SEPPÄ L. A scanning electron microscopic study of early subsurface bacterial penetration of human molar fissure enamel. *Arch Oral Biol* 1984, 29:503-506.
5. SEPPÄ L, ALAKUIJALA P, KARVONEN I. A scanning electron microscopic study of bacterial penetration of human enamel in incipient caries. *Arch Oral Biol* 1985; 30:595-598.
6. NYVAD B, FEJERSKOV O. Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J dent Res* 1987; 95:287-296.
7. NYVAD B, FEJERSKOV O. Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J dent Res* 1987; 95:297-307.
8. NYVAD B, KILIAN M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J dent Res* 1987; 95:369-380.
9. CATE JM ten, SIMONS YM. Bacteria and mineralization. *Caries Res* 1988; 22:98 (Abs N° 29).