

BAKTERIJSKI MORFOTIPOVI U PARODONTNIM DŽEPOVIMA BOLESNIKA SA ŠEĆERNOM BOLESTI

Miljenko Bačić

Zavod za parodontologiju, Stomatološki fakultet Zagreb

Primljeno: 9. 9. 1987.

Sažetak

Cilj ovog rada je ispitati postotak mikrobnih morfotipova u uzorcima subgingivnog plaka u bolesnika sa šećernom bolesti i to metodom mikroskopa s tamnim poljem. U tu svrhu ispitana su 31 bolesnika sa šećernom bolesti Tipa I ili Tipa II, a komparativna skupina sastojala se od 22 sistemski zdrava ispitanika s parodontnom bolesti. Ispitanici u obje grupe su imali duboke parodontne džepove na mjestima uzimanja uzoraka ($\bar{X} = 6.0$ vs 6.3), a slične kliničke vrijednosti imali su i za upalu gingive (GI) i ipak indeks (PI). Veći postotak džepova sa supuracijom imali su bolesnici sa šećernom bolesti.

Dobiveni nalazi ukazuju da je prosječni postotak spiroheta veoma sličan u obje grupe ispitanika (48,3 vs 48,1) kao i postotak štapića (30,2 vs 29,8). Prosječan postotak pokretnih štapića bio je veći u ispitanika sa šećernom bolesti (9,6 vs 5,5, $P < 0.001$), ali je postotak koka bio značajno veći u sistemski zdravih ispitanika (7,6 vs 4,0, $P < 0.001$). Unatoč određenim ograničenjima koje pruža tehnika mikroskopa s tamnim poljem može se zaključiti da u subgingivnoj flori bolesnika sa šećernom bolesti postoje patogeniji mikrobnii morfotipovi nego u sistemski zdravoj skupini.

Ključne riječi: šećerna bolest, bakterijski morfotipovi

UVOD

Za razvoj mikrobiološke flore neophodan je određeni mikro-ekomilje (1). Milje parodontnog džepa veoma je specifičan i ovisi o stupnju oralne higijene, sastavu gingivne tekućine, mogućnosti oksigenacije, dubini parodontnih džepova i dr. Ovaj eko sistem može se mijenjati djelovanjem nekih sistemskih stanja i bolesti. Tako se u šećernoj bolesti povećava količina glukoze u gingivnoj tekućini, a njezina razina ovisi o razini glukoze u krvi (2). Mikroangiopatije u gingivnom tkivu (3, 4) smanjena oksigenacija (5) te poremećena funkcija leukocita u bolesnika sa

šećernom bolesti također mogu utjecati na sastav mikrobiološke flore u parodontnim džepovima (6, 7).

Tehnika mikroskopa s tamnim poljem temelji se na ispitivanju mikroorganizama iz uzoraka bakterijskog plaka na osnovi njihove morfologije i pokretljivosti. Primjenom ove tehnike moguće je identificirati pojedine forme mikroorganizama kao što su: spirohete, koki, ravni i zavnuti štapići, filamenti, mobilne forme te odrediti njihov međusobni odnos izražen u postocima od njihova ukupnog broja.

Colyer je 1916 godine (cit. Gold) (8) prvi primijenio ovu tehniku u istraživanjima bakterijskog plaka i opisao izgled mikroorganizama uzetih parodontnog džepa. Glavni nalaz bile su spirohete, bacili i koki. U novije vrijeme Listgarten i Hellden (9) ponovno su aktualizirali mogućnost primjene ove tehnike u istraživanjima parodontnih bolesti. Rezultati njihova istraživanja ukazuju da u klinički zdravim mjestima u bakterijskom plaku predominiraju kokoidne forme, dok u mjestima s izraženom upalom gingive ili s dubljim parodontnim džepovima predominiraju štapići, spirohete i pokretne forme mikroorganizama. Njihove nalaze potvrdili su kasnije, uz neke razlike, i mnogi drugi autori (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17.). Zappa i sur. (18) istraživali su odnos između subgingivne flore i patohistološkog nalaza u eksperimentalnom parodontitisu. Njihovi nalazi ukazuju da u subgingivnom plaku prije indukcije parodontitisa dominiraju koki, ali su prisutne fuziformne forme i razni štapići. U fazi razvoja parodontitisa raste postotak spiroheta, pokretnih formi i filamenata. Histometrijska analiza ukazuje na gubitak vezivnog pričvrstka i resorpciju alveolne kosti. Nađena je i pozitivna korelacija između destrukcije parodonta i totalnog broja subgingivnih spiroheta.

Do sada postoji vrlo malo studija o mikrobiologiji subgingivnog plaka u bolesnika sa šećernom bolesti. Stoga je i svrha ovog rada istražiti da li uz veoma slične kliničke uvjete, postoji razlika u postotku određenih mikrobnih morfotipova u subgingivnom plaku bolesnika sa šećernom bolesti i sistemski zdravih ispitanika.

ISPITANICI I METODE

Ispitana su 31 bolesnika sa šećernom bolesti i 22 sistemski zdrava ispitanika s izraženom destrukcijom parodonta. Prosječna dob bolesnika sa šećernom bolesti iznosila je 42 godine, a prosječno trajanje šećerne bolesti 11 godina. Prosječan dob ispitanika komparativne skupine iznosila je 46 godina.

Kliničko ispitivanje parodonta

Dubina parodontnih džepova određivana je na šest mjesta oko svakog zuba s parodontnom sondom promjera 0.5 mm. U toku mjerenja parodontnih džepova registrirano je i krvarenje iz istih. Stupanj upale gingive i plaka određen je prema metodi Løe i Sillnesa (19). Supuracija iz

džepova određivana je pritiskom postraničnog dijela parodontne sonde ili pritiskom prsta na pričvršćenu gingivu. Vrijednost supuracije izražena je kao postotak gnojnih džepova. Za sva klinička mjerenja izračunate su srednje vrijednosti za svakog ispitanika te posebno srednje vrijednosti za mjesta gdje su uzimani uzorci.

Uzimanje i pripremanje uzoraka za mikrobiološku analizu

Nakon kliničkih mjerenja pažljivo je odstranjen supragingivni plak i sa sterilnom kiretom ili strugačem je iz najapikalnijeg dijela parodontnog džepa uzet uzorak bakterijskog plaka. Ako u jednom pokušaju nije uzeto dosta materijala postupak se ponavljao. Pripremanje uzoraka za analizu kao i klasifikacija bakterijskih morfotipova (koki, spirohete, pokretni i nepokretni štapići i ostali) obavljao sam prema metodi Listgartena i Hellena (9).

REZULTATI

Kliničko stanje parodonta

Prosječna dubina parodontnih džepova iznosila je 4.3 mm u obje skupine ispitanika. Prosječna dubina parodontnih džepova gdje su uzimani uzorci subgingivnog plaka za mikrobiološku analizu iznosila je 6.3 mm u sistemski zdravih ispitanika i 6.0 mm x u bolesnika sa šećernom bolesti. (Tablica 1).

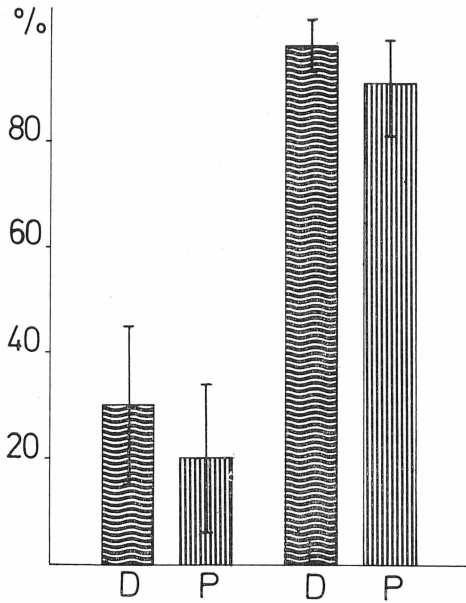
Tablica 1. Prosječne vrijednosti kliničkih parametara u mjestima ispitivanih uzoraka subgingivnog plaka

	Dubina džepova $\bar{x} \pm SD$	GI $\bar{x} \pm SD$	PI $\bar{x} \pm SD$	Sup %	Kr %
Sistemski zdravi ispitanici	6.3 \pm 0.8	1.7 \pm 0.6	1.6 \pm 0.6	35.2	100.0
Bolesnici sa šećernom bolesti	6.0 \pm 0.7	2.1 \pm 0.7	1.8 \pm 0.7	43.8	100.0

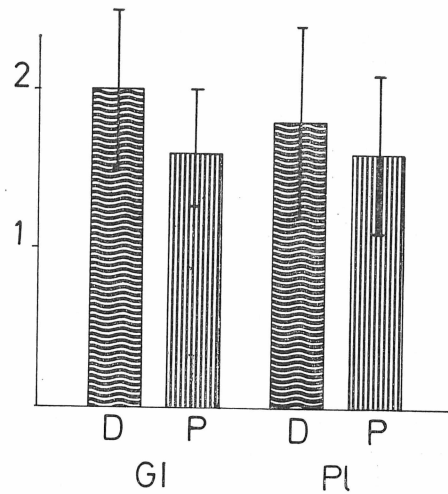
Supuracija je registrirana u prosječno 30.8 posto parodontnih džepova u bolesnika sa šećernom bolesti i u 20.3 posto džepova u ispitanika komparativne skupine. (Slika 1) U mjestima uzimanja uzoraka plaka supuracija je registrirana u 43.8 posto džepova u dijabetičara i u 35.2 posto džepova sistemski zdravih ispitanika. Krvarenje nakon sondiranja je registrirano u 98 posto džepova u dijabetičara i u 90.8 posto džepova komparativne skupine. Na mjestima uzimanja uzoraka bakterijskog plaka krvarenje je registrirano u 100 posto slučajeva.

Prosječan GI iznosio je 2.0 za dijabetičare i 1.6 za ispitanike komparativne skupine. (Slika 2). U mjestima uzimanja plaka prosječni GI iznosio

je 2.1 za dijabetičare i 1.7 za drugu grupu. (Tablica 1). Nalazi plaka bili su također komparabilni (Sl. 1).



Slika 1. Prosječan postotak parodontnih džepova sa supuracijom i krvarenjem na sniranje. Vertikalne linije označuju standardne devijacije dobivenih podataka. (D) ispitanici sa šećernom bolesti (P) sistemski zdravi ispitanici s parodontnom bolesti



Slika 2. Prosječan indeks upale gingive (GI) i plak indeks (PI) za obje grupe ispitanika. Vertikalne linije označuju standardne vrijednosti dobivenih podataka. (D) ispitanici sa šećernom bolesti (P) sistemski zdravi ispitanici s parodontnom bolesti

Tablica 2. Postotak mikrobnih morfotipova u ispitanim uzorcima

	Broj ispitanika	Broj uzoraka	Spirohete % $\bar{x} \pm SD$	Koki % $\bar{x} \pm SD$	Mikrobni morfotipovi		Ostali % $\bar{x} \pm SD$
					Štapići		
					Nepokretni % $\bar{x} \pm SD$	Pokretni % $\bar{x} \pm SD$	
Sistemski zdravi ispitanici	22	176	48,1 ± 12,5	7,6 ± 4,2	29,8 ± 10,3	5,5 ± 3,2	8,8 ± 2,7
Dijabetičari	31	196	48,3 ± 12,2	4,0 ± 1,4	30,2 ± 9,5	9,6 ± 3,6	7,7 ± 2,7

*** značajnost razlike na razini $p < 0,001$

Proporcija mikrobnih morfotipova

Spiroheta je bilo 48.3 posto od ukupnog broja izbrojenih morfotipova u uzorcima bakterijskog plaka bolesnika s šećernom bolesti odnosno 48.1 posto u komparativnoj skupini. (Tablica 2).

Koka je nađeno 4.0 posto u plaku dijabetičara i 7.6 posto u uzorcima plaka komparativne skupine, što je statistički značajna razlika ($P < 0.001$). Nepokretni štapići su nađeni u približno istom postotku u uzorcima plaka obje grupe ispitanika (29.8 vs. 30.2 posto. Međutim postotak **pokretnih štapića** je bio značajno veći u uzorcima subgingivnog plaka bolesnika s šećernom bolesti (9.6 vs. 5.5, $P < 0.001$). (Tablica 2).

Iz dobivenih rezultata je također uočljivo da nema razlike u nađenom postotku neklasificiranih morfotipova između dvije ispitivane grupe.

DISKUSIJA

Mikrobiološka istraživanja subgingivnog plaka tehnikom mikroskopa s tamnim poljem zadnjih godina imaju široku primjenu u parodontološkim istraživanjima. Prednosti ove tehnike očituju se u brznoj identifikaciji mikroorganizama, relativno je jeftina, zahtijeva malo opreme a pomoću nje se može izračunati totalni broj mikroorganizama kao i njihova međusobna proporcija (20).

Nedostaci ove tehnike su nemogućnost identifikacije pojedinih vrsta mikroorganizama, a uzorak koji se uzima ne može se sačuvati za ponovni pregled (21). Također postoje dosta velike razlike u nalazu pojedinih autora što ukazuje na često prisutnu subjektivnost pojedinih istraživača (20). Ipak tehnika je relativno visoko reproducibilna (22), a prema nalazima Wilsona i sur. (21) postoji vrlo dobra reproducibilnost podataka dobivenih s ovom tehnikom i tehnikom bojenja po Gramu i Rhodensovom metodom za flagele.

Unatoč svih nedostataka, tehnika mikroskopa s tamnim poljem pruža mogućnost istraživanja trenda pojedinih morfotipova mikroorganizama u odnosu na različita klinička stanja parodontnih tkiva. Poznato je da u bakterijskom plaku klinički zdrave gingive prevladavaju koki, prisutno je vrlo malo spiroheta ili pokretnih štapića (9, 23, 12). Povećanjem upale gingive, a posebno produbljivanjem parodontnih džepova, drastično poraste postotak spiroheta i pokretnih štapića, a smanjuje se postotak kokoidnih formi. Međutim iako postoji jaka korelacija između porasta ovih mikrobnih morfotipova i dubine parodontnih džepova, nije moguće sa sigurnošću utvrditi da li su oni uzročnici takvog stanja, da li su indikatori bolesti ili se jednostavno naseljuju u ova područja nakon destrukcije tkiva (20). Posebna pažnja u ovim istraživanjima posvećena je spirohetama, koje je zbog njihove osjetljivosti na kisik i posebnih nutritivskih zahtjeva veoma teško uzgojiti na kulturama. Spirohete su Gram-negativni obligatni anaerobi koje je zbog njihove specifične građe i kretanja moguće veoma lagano

identificirati ovom tehnikom. Loesch i Laugham (24) ukazuju na njihovu važnost u etiologiji parodontnih bolesti i ističu da njihov patološki potencijal može biti u vezi njihovih metaboličkih produkata kao što su indol, amonijak i hidrogen sulfid ili zbog njihove enzimске aktivnosti.

U ovom istraživanju uziman je uzorak nakterijskog plaka iz dubokih parodontnih džepova (≥ 6 mm). Rezultati ukazuju na visoki postotak spiriheta u ispitivanim uzorcima subgingivnog plaka u obje grupe ispitanika što je u skladu s nalazima drugih autora (9, 23, 11, 16, 17). U obje grupe ispitanika postojali su vrlo slični uvjeti tj. slična prosječna dubina parodontnih džepova, upala gingive i plak indeks, a procentualni sastav mikrobiološke flore u obje grupe ispitanika je vrlo sličan. Kako je iz epidemioloških studija poznato, bolesnici sa šećernom bolesti imaju znatno jači intenzitet parodontne bolesti, to je moguće za pretpostaviti da ili su u patogenetskim mehanizmima važniji poremećaji obrane organizma ili da kvalitativne promjene u mikrobiološkoj flori nisu uočljive s ovom tehnikom.

Poznato je da je parodontna bolest cikličke prirode tj. kratkim periodima progresije slijede kraći ili duži periodi mirovanja (25). Vjerojatno i sastav mikrobiološke flore ovisi i o periodu aktivnosti parodontne lezije što također može imati utjecaja na dobivene rezultate. Podatak da bolesnici sa šećernom bolesti imaju veći postotak parodontnih džepova sa supuracijom i da se nalazi veći postotak pokretnih štapića, a manje koka, ipak ukazuje na destruktivniju aktivnost parodontne bolesti u dijabetičara nego u komparativnoj skupini (26).

Ispitivanja subgingivne bakterijske flore metodom kultivacije i imuno fluorescencije, pokazala su da je sastav bakterijske flore specifičan tj. dominira *Bacteroides gingivalis* (27), odnosno *Wolinella recta*, *Bacteroides intermedius* i *Bacteroides gingivalis* (1). To ukazuje da za sada, tehnika mikroskopa s tamnim poljem ima ograničenu vrijednost u ispitivanju mikrobiološke flore takvih bolesnika. Vrijednost ove tehnike u daljnjim istraživanjima ovisit će vjerojatno o saznanjima u kojoj mjeri su parodontne bolesti uzrokovane pojedinim specifičnim tipovima subgingivne mikrobiološke flore ili u kojem su odnosu s pojedinim formama prisutnih mikroorganizama u bakterijskom plaku (21). Nova usavršavanja ove tehnike koja omogućuju brojenje pojedinih formi mikroorganizama i promatranje pojedinih morfotipova na njihov ukupan broj, zatim grupiranje pojedinih morfotipova vjerojatno će doprinijeti široj primjeni ove tehnike u istraživanjima subgingivne mikrobiološke flore. (28)

BACTERIAL MORPHOTYPES IN PERIODONTAL POCKETS OF DIABETIC PATIENTS

Summary

The aim of this study was to assess the percentage of microbial morphotypes in samples of subgingival plaque taken from diabetic patients, using a darkfield microscope technique. The group consisted of 31 patients

suffering from type I or type II diabetes, and a comparative group comprised of 22 systemically normal subjects with a periodontal disease. The subjects of both groups had deep periodontal pockets at the sites of sampling ($\bar{X} = 6.0$ vs. 6.3) and they were also found to have similar clinical values for both gingivitis (GI) and plaque index (PI). The percentage of pockets with suppuration was higher in patients with diabetes mellitus.

The findings obtained indicated the mean percentage of spirochaetes to be very similar in the two groups examined (48.3 vs. 48.1), and so was the percentage of rods (30.2 vs. 29.8). The mean percentage of motile rods was higher in diabetic patients (9.6 vs. 5.5; $P < 0.001$), but the percentage of cocci was significantly higher in systemically healthy subjects (7.6 vs. 4.0; $P < 0.001$). In spite of limitations posed by a technique of dark-field microscope, a conclusion is suggested that in the subgingival flora of patients suffering from diabetes mellitus some more pathogenic microbial morphotypes are present as compared to the control group of subjects.

Key words: diabetes mellitus, periodontal disease, bacterial morphotypes.

Literatura

- ZAMBON J J. i sur. Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* (u štampi)
- KJELLMAN O. SODER P. The presence of glucose in gingival exudate and resting saliva of subjects with insulin treated diabetes mellitus. *Swed Dent J* 1970; 63:11—18.
- FRANTZIS TG. REEVE CM. BROWN AL. The ultrastructure of capillary basement membranes in the attached gingiva of diabetic and non-diabetic patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1971; 42:406—411.
- CAMPBELL MJ. A light and electron microscopic study of blood vessels from the gingival tissues of nondiabetic and diabetic patients. *Aust Dent J* 1971; 16:235—241.
- CAMPBELL JJ. The oxygen utilisation and glucose oxidation rate of gingival tissue from nondiabetic and diabetic patients. *Archs Oral Biol* 1970; 15: 305—309.
- MANOUCHEHR-POUR M. SPAGNUOLO PJ. ROMDAN HM. BISSADA NF. Comparison of neutrophil chemotactic response in diabetic patients with mild and severe periodontal disease. *J Periodontol* 1981; 52:410—414.
- MCMULLEN JA. VANDYKE TE. HOROS-ZEWICZ HU. GENCO RJ. Neutrophil chemotaxis in individuals with advanced periodontal disease and a genetic predisposition to diabetes mellitus. *J Periodontol* 1981; 52:167—173.
- GOLD SI. Periodontics. The past, Microbiology. Part 111. *J Clin Periodontol* 1985; 12:257—267.
- LISTGARTEN M. HELLDEN L. Relative distribution of bacteria at clinically and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol* 1978; 5:115—132.
- ROSENBERG ES. EVIAN CI. LISTGARTEN MA. The composition of the subgingival microbiota after periodontal therapy. *J Periodontol* 1981; 52:435—441.
- EVIAN CI. ROSENBERG ES. LISTGARTEN M. Bacterial variability within diseased periodontal sites. *J Periodontol* 1982; 53:595—598.
- ARMITRAGE CG. i sur. Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *J Periodontol* 1982; 53: 550—556.
- SINGLETERY MM. CRAWFORD JJ. SIMPSON D. Dark-field microscopic monitoring of subgingival bacteria during periodontal therapy. *J Periodontol* 1982; 53:671—681.
- GREENWELL H. BAKR A. BISSADA N. DEBAUNE S. REWLAND D. The effect of Keyes method of oral hygiene on the subgingival microflora compared

- to the effect of scaling and/or surgery. *J. Periodontol Res* 1985; 20:327—333.
15. PIHLSTROM BL. i sur. The relationship of probing depth and total microscopic counts to differential subgingival plaque morphology. *J. Periodontol Res* 1985; 20:106—112.
 16. SAVITT ED. SOCRANSKY SS. Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. *J. Periodontol Res* 1984; 19: 111—123.
 17. TANNER ACR. SOCRANSKY SS. GOODSON JM. Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. *J. Periodontol Res* 1984; 19:279—291.
 18. ZAPPA UE. POLSON AM. EISENBERG AD. ESPELAND MA. Microbial populations and active tissue destruction in experimental periodontitis. *J. Clin Periodontol* 1986; 13:117—125.
 19. LÖE H. SILNESS J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 1963; 21: 533—551.
 20. GREENSTEIN G. POLSON A. Microscopic monitoring of pathogens associated with periodontal disease. *J. Periodontol* 1985; 56:740—747.
 21. WILSON RF. WOODS A. ASHLEY FP. Dark-field microscopy of dental plaque. *Brit Dent J* 1985; 159:114—120.
 22. ADDY M. NEWMAN H. LANGERROU-DI M. GHO JG. Dark-field microscopy of the microflora of plaque. *Brit Dent J* 1983; 155:269—273.
 23. LINDHE J. LJILJENBERG B. LISTAGARTEN M. Some microbiological and histopathological features of periodontal disease in man. *J. Periodontol* 1980; 51: 264—269.
 24. LOESCHE WJ. LAUGHON B. ROLE of spirochetes in periodontal disease. Iz: Host-parasite Interaction in Periodontal Disease. Wash. DC. Am Society of Microbiology 1982.
 25. HAFFAJEE AD. SOCRANSKY SS GOODSON JM. Clinical parameters as predictor of destructive periodontal disease activity. *J. Clin Periodontol* 1983; 257—265.
 26. BAČIĆ M. Parametri alternativnoog parodonta i periferne krvi bolesnika sa šećernom bolesti. Disertacija. Zagreb. 1986.
 27. MASHIMO PA. i sur. The periodontal microflora of juvenile diabetics. *J. Periodontol* 1983; 54:420—430.
 28. WOLF LF. PIHLSTROM BL. LJILJENMARK WF. SCHAFFER EM. BANDT CL. Distinct categories of microbial forms associated with periodontal disease. *J. Periodontol Res* 1985; 20:497—502.