

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sanja PODRŽAJ

**PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST RAZLIČNIH
VRST MEDU NA PARODONTOPATOGENE
BAKTERIJE IN USTNE STREPTOKOKE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sanja PODRŽAJ

**PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST RAZLIČNIH VRST MEDU
NA PARODONTOPATOGENE BAKTERIJE IN USTNE
STREPTOKOKE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HONEY AGAINST
PERIODONTOPATHOGENIC BACTERIA AND ORAL
STREPTOCOCCI**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih okužb Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme, dr. med in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina, dipl. ing. živ. tehn.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA, dipl. ing. živ. tehn.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sanja Podržaj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.24+579.61:616.314:638.167(043)=163.6
- KG protibakterijska učinkovitost/ustne bolezni/parodontalna bolezen/
parodontopatogene bakterije/ustni streptokoki/protimikrobne snovi/med
- AV PODRŽAJ, Sanja
- SA SEME, Katja (mentorica)/SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2011
- IN PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST RAZLIČNIH VRST MEDU NA
PARODONTOPATOGENE BAKTERIJE IN USTNE STREPTOKOKE
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 70 str., 18 pregl., 24 sl., 108 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Med je v ljudski medicini poznan že dolgo časa. Zaradi velike protibakterijske učinkovitosti medu proti glavnim povzročiteljem okužb ran se med s pridom uporablja pri sodobni oskrbi odprtih ran in opeklin, ima pa tudi dokazano vrednost pri zdravljenju gastroenteritisa. Zaradi svojih lastnosti ima tudi velik potencial za uporabo v zobozdravstvu. Zaradi naraščajoče odpornosti bakterij proti različnim vrstam antibiotikov in neugodnih učinkov kemičnih protibakterijskih sredstev, ki se uporabljajo za zdravljenje parodontalne bolezni, se je pojavila potreba po alternativnih metodah zdravljenja, ki bi bile tudi cenejše. Pri tem bi lahko izkoriščali protibakterijski učinek medu, vendar je ta na parodontopatogene bakterije zaenkrat slabo raziskan. Zato smo v diplomskem delu ugotavljali protibakterijski učinek različnih vrst slovenskega (kostanjevega, hojevega, cvetličnega, lipovega, gozdnega, repičnega in akacijevega) ter medu manuka na najpogostejše parodontopatogene bakterije in ustne streptokoke. Za vrednotenje protibakterijske učinkovitosti medu smo uporabili agar difuzijsko metodo, pri kateri smo v luknjice v agarju, ki smo ga nacepili z bakterijskim sevom, dodajali različne razredčine (10, 12,5, 25, 50, 100 %) posameznega vzorca medu. Po inkubaciji smo izmerili premer inhibicijskih con in izračunali povprečje. Pri vseh vrstah medu smo ugotovili največji protibakterijski učinek proti izolatu *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Sledil je protimikrobni učinek proti izolatu *Prevotella intermedia*. Protibakterijski učinek medu proti kliničnemu in referenčnemu izolatu *Porphyromonas gingivalis* je bil znatno manjši kot pri prej naštetih vrstah. Proti izolatu *Fusobacterium nucleatum* je bil opazen minimalen protibakterijski učinek pri vseh vrstah medu, razen pri kostanjevem. Proti izolatu *Eikenella corrodens* je imel relativno dober protibakterijski učinek med manuka, medtem ko je bil učinek ostalih vrst medu minimalen. Med ustnimi streptokoki so imele vse vrste medu najboljši učinek proti izolatu *Streptococcus sanguis*, sledila je učinkovitost proti *Streptococcus oralis*. Lipov in akacijev med nista imela učinka proti izolatoma *Streptococcus mutans* in *Streptococcus salivarius*, učinek ostalih vrst medu z izjemo manuka medu pa je bil proti tem izolatom minimalen.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.24+579.61:616.314:638.167(043)=163.6
- CX antibacterial activity/oral diseases/periodontal disease/periodontopathogenic
bacteria/oral streptococci/antimicrobials/honey
- AU PODRŽAJ, Sanja
- AA SEME, Katja (advisor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
- PY 2011
- TI ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HONEY AGAINST
PERIODONTOGENIC BACTERIA AND ORAL STREPTOCOCCI
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XII, 70 p., 18 tab., 24 fig., 108 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Honey has been used as a medicine throughout the ages and in more recent times has been rediscovered by the medical profession for treatment of burns, infected wounds and skin ulcers. It has also proven value in the treatment of gastroenteritis. Because of increasing antimicrobial resistance and disadvantageous side effects of systemic antibiotic treatment a need for alternative and cheaper agents for treatment of periodontitis emerged. The therapeutic properties of honey evident in its well-established usage in wound care clearly give it the potential for therapeutic use in various areas of dentistry. The antibacterial activity of honey on the periodontopathogenic bacteria is poorly studied. Therefore, the aim of our study was to examine and evaluate the antibacterial activity of different Slovenian (chestnut, fir, pasture, lime, forest and acacia) and New Zealand manuka honey against the main periodontopathogenic bacteria and oral streptococci. Agar diffusion method was used and bacterial isolates were exposed to different concentrations (10, 12,5, 25, 50, 100 %) of particular honey sample. After incubation time we measured the diameters of inhibition zones. All honey samples showed the largest antibacterial activity against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* followed by the antibacterial activity against *P. intermedia*. Honey showed poorer antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis*. There was a minimal antimicrobial activity of all honey samples against *Fusobacterium nucleatum* (except chestnut honey) and *Eikenella corrodens*, against which only manuka honey had significant efficiency. *Capnocytophaga* spp. was not inhibited by any of the tested types of honey. Among oral streptococci we observed the highest antibacterial activity against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus oralis*. Only manuka honey showed significant antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius*. Lime and acacia honey had no effect on those isolates.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MED KOT ZDRAVILO	3
2.2 NASTANEK IN VRSTE MEDU	3
2.3 SESTAVA MEDU	4
2.3.1 Ogljikovi hidrati	4
2.3.2 Kisline	4
2.3.3 Encimi	5
2.4 PROTIMIKROBNE SNOVI V MEDU	6
2.4.1 Peroksidni sistem inhibinov	7
2.4.2 Neperoksidni sistem inhibinov	8
2.5 PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST MEDU	9
2.6 NORMALNA MIKROBNA FLORA USTNE VOTLINE	11

2.6.1	Ustni streptokoki	12
2.7	PARODONTALNA BOLEZEN	13
2.7.1	Oblike parodontitisa	15
2.7.2	Epidemiologija parodontalnih bolezni	16
2.8	PARODONTOPATOGENE BAKTERIJE	16
2.8.1	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	18
2.8.2	Bakterije rodu <i>Porphyromonas</i>	19
2.8.3	Bakterije rodu <i>Prevotella</i>	19
2.8.4	<i>Tannerella forsythensis (Bacteroides forsythus)</i>	20
2.8.5	Ustne treponeme	20
2.8.6	Mikrobni kompleksi v zobni oblogi	21
2.9	ZDRAVLJENJE PARODONTALNE BOLEZNI	22
2.9.1	Tradicionalno mehansko zdravljenje	22
2.9.2	Antibiotično zdravljenje	24
3	MATERIAL IN METODE	27
3.1	MATERIAL	27
3.2	METODE	28
3.2.1	Določanje koncentracije mikrobne suspenzije	28
3.2.2	Agar difuzijska metoda	28
3.2.3	Statistična analiza	29
4	REZULTATI	31
4.1	PROTIBAKTERIJSKI UČINEK RAZLIČNIH VRST MEDU NA PARODONTOPATOGENE BAKTERIJE	31
4.2	PROTIBAKTERIJSKI UČINEK RAZLIČNIH VRST MEDU NA NEKATERE USTNE STREPTOKOKE	42

4.3	PRIMERJAVA PROTIMIKROBNEGA UČINKA MEDU NA PARODONTOPATOGENE BAKTERIJE IN USTNE STREPTOKOKE	48
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	51
5.1	RAZPRAVA	51
5.2	SKLEPI	56
6	POVZETEK	57
7	VIRI	59
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Klasifikacija najpomembnejših streptokokov v ustih (Dragaš, 1996: 38)	13
Preglednica 2: Stopenjski razvoj okvare zob in obzobnih tkiv (Dragaš, 1996: 56)	17
Preglednica 3: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri <i>P. intermedia</i> pri nerazredčenih vrstah medu	32
Preglednica 4: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri <i>P. oris</i> pri nerazredčenih vrstah medu	32
Preglednica 5: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri <i>P. veroralis</i> pri nerazredčenih vrstah medu	33
Preglednica 6: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri <i>P. buccalis</i> pri nerazredčenih vrstah medu	34
Preglednica 7: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 pri nerazredčenih vrstah medu	35
Preglednica 8: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri <i>P. gingivalis</i> pri nerazredčenih vrstah medu	36
Preglednica 9: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri izolatu iz rodu <i>Bacteroides</i> pri nerazredčenih vrstah medu	37
Preglednica 10: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri <i>F. nucleatum</i> pri nerazredčenih vrstah medu	38
Preglednica 11: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri <i>E. corrodens</i> ATCC 23834 pri nerazredčenih vrstah medu	39
Preglednica 12: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri izolatu rodu <i>Capnocytophaga</i> pri nerazredčenih vrstah medu	40

- Preglednica 13:** Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *A. actinomycetemcomitans* pri nerazredčenih vrstah medu 41
- Preglednica 14:** Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *S. sanguis* pri nerazredčenih vrstah medu 43
- Preglednica 15:** Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *S. oralis* pri nerazredčenih vrstah medu 44
- Preglednica 16:** Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *S. salivarius* pri nerazredčenih vrstah medu 45
- Preglednica 17:** Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *S. mutans* ATCC 25175 pri nerazredčenih vrstah medu 46
- Preglednica 18:** Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *S. mutans* ATCC 35668 pri nerazredčenih vrstah medu 47

KAZALO SLIK

Slika 1:	Referenčni izolat <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277, agar po Schaedler-ju	19
Slika 2:	Klinični izolat vrste rodu <i>Capnocytophaga</i> spp., osamljen iz vzorca iz parodontalnega žepa, agar po Schaedler-ju	21
Slika 3:	Klinični izolat <i>F. nucleatum</i> , osamljen iz vzorca iz parodontalnega žepa, agar po Schaedler-ju	22
Slika 4:	Testiranje protibakterijske učinkovitosti medu manuka na klinični izolat <i>P. intermedia</i>	31
Slika 5:	Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>P. intermedia</i> v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	32
Slika 6:	Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>P. oris</i> v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	33
Slika 7:	Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>P. veroralis</i> v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	34
Slika 8:	Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>P. buccalis</i> v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	35
Slika 9:	Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	36
Slika 10:	Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>P. gingivalis</i> v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	37
Slika 11:	Povprečni premer inhibicijskih con pri izolatu rodu <i>Bacteroides</i> v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	38
Slika 12:	Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>F. nucleatum</i> v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	39
Slika 13:	Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>E. corrodens</i> ATCC 23834 v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	40
Slika 14:	Povprečni premer inhibicijskih con pri izolatu rodu <i>Capnocytophaga</i> v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	41
Slika 15:	Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>A. actinomycetemcomitans</i> v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	42

Slika 16: Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>S. sanguis</i> v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	43
Slika 17: Testiranje protibakterijske učinkovitosti lipovega medu na klinični izolat <i>S. sanguis</i>	44
Slika 18: Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>S. oralis</i> v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	44
Slika 19: Testiranje protibakterijske učinkovitosti kostanjevega medu na klinični izolat <i>S.oralis</i>	45
Slika 20: Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>S. salivarius</i> v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	46
Slika 21: Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>S. mutans</i> ATCC 25175 v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	47
Slika 22: Povprečni premer inhibicijskih con pri <i>S. mutans</i> ATCC 35668 v odvisnosti od vrste in koncentracije medu	48
Slika 23: Povprečni premer inhibicijskih con pri najpomembnejših izolatih parodontopatogenih bakterij pri različnih vrstah nerazredčenega medu	49
Slika 24: Povprečni premer inhibicijskih con izolatov ustnih streptokokov pri različnih vrstah medu	50

SEZNAM OKRAJŠAV

<i>A. actino.</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ATCC	oznaka sevov iz zbirke American Type Culture Collection (angl. The American Type Culture Collection)
CFU	kolonijska enota (angl. Colony Forming Units)
<i>E. corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FR	fiziološka raztopina
KA	krvni agar
KVLB	krvni agar z dodanim kanamicinom in vankomicinom (angl. Kanamycin-vankomycin laked blood agar)
LPS	lipopolisaharid
McF	McFarland
MGO	metilglioksal
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
<i>P. buccalis</i>	<i>Prevotella buccalis</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. oris</i>	<i>Prevotella oris</i>
<i>P. veroralis</i>	<i>Prevotella veroralis</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
UMF	unikatni manuka faktor (angl. »Unique manuka factor«)
VRE	proti vankomicinu odporni enterokoki (angl. Vancomycin-Resistant Enterococci)

1 UVOD

Parodontalna bolezen je vnetje obzobnih tkiv, ki vodi v apikalni pomik stičnega epitelija in napredovalo razgradnjo pozobnice in čeljustne kosti. Prvotni vzrok za njen nastanek so bakterije v subgingivalnem biofilmu, obseg razgradnje obzobnih tkiv pa uravnava imunski odziv gostitelja (Cvetko in Skalerič, 2008). Bakterije, ki so vpletene v razvoj parodontalnih bolezni so večinoma anaerobne po Gramu negativne bakterije, ki med seboj delujejo sinergistično. Med njimi so najpomembnejše *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythus*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* in *Peptostreptococcus micros* (Nishihara in Koseki, 2004; Feng in Weinberg, 2006).

Poleg zobne gnilobe so vnetja obzobnih tkiv ene najpogostejših okužb pri ljudeh in so pomemben zdravstveni problem po vsem svetu. Parodontitis z nastankom globokih obzobnih žepov, umikom dlesni in majavostjo zob se ponavadi izrazi med 40. in 50. letom starosti (Cvetko in Skalerič, 2008; Skalerič in Kovač-Kavčič, 1989). Ker prevalenca parodontalnih bolezni s starostjo narašča, naj bi se število obolelih še povečalo. Če parodontalnih bolezni ne zdravimo, so najpogostejši vzrok za izgubo zob v odrasli dobi, poleg tega pa je parodontitis značilen dejavnik tveganja za nastanek sistemskih bolezni, kot so ateroskleroza, aspiracijska pljučnica, prezgodnji porod ter druge (Loesche in Grossman, 2001; Paquette, 2002).

Obstoječe zdravljenje parodontitisa lahko razdelimo na tradicionalno mehansko zdravljenje, antibiotično zdravljenje in kombinacijo obeh zdravljenj. Mehansko zdravljenje je sicer z ustrezno ustno higieno in rednimi obiski pri zobozdravniku sicer relativno učinkovito, vendar tudi drago (Loesche in Grossman, 2001). Antibiotik metronidazol se je v kombinaciji z mehanskim luščenjem in glajenjem koreninske površine izkazal za učinkovito dopolnilno zdravljenje (Loesche in sod., 1992a). Zaradi naraščajoče odpornosti bakterij proti različnim vrstam antibiotikov in neugodnih učinkov kemičnih protibakterijskih sredstev, ki se uporabljajo za zdravljenje bolezni, se je pojavila potreba po alternativnih metodah zdravljenja, ki bi bile tudi cenejše. Pri tem se vse več pozornosti v

medicini namenja medu kot naravni učinkovini, saj zaradi svojih lastnosti, kot so visoka vsebnost sladkorjev, osmolarnost, kisel pH, sproščanje vodikovega peroksida in zaradi protimikrobnih substanc, ki jih vsebuje, lahko deluje protibakterijsko (Molan, 1992a; Molan 1992b). Zaradi svojih lastnosti se med s pridom uporablja pri antiseptičnem zdravljenju ran, opeklin, razjed in nekaterih drugih bolezenskih stanj (Molan, 1998; Molan 2001a), velik potencial pa kaže tudi za uporabo v zobozdravstvu in pri zagotavljanju zdravja ustne votline (Basson in sod., 1994; Steinberg in sod., 1996; Molan, 2001b). Pri pacientih s parodontalno boleznijo so s pomočjo medu manuka že dosegli redukcijo zobnega plaka in gingivitisa (English in sod., 2004).

1.1 NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen diplomske naloge je bil *in vitro* določiti protibakterijsko učinkovitost različnih vrst slovenskega ter medu manuka na najpogostejše parodontopatogene bakterije in nekatere ustne streptokoke.

Pričakovali smo, da bo naravni med zaviral rast parodontopatogenih bakterij in ustnih streptokokov. Predpostavljali smo, da bo protibakterijski učinek medu večji pri višjih koncentracijah medu in bo odvisen od vrste medu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MED KOT ZDRAVILO

Ljudje so že pred deset tisoč leti ugotovili, da je med dragocen produkt. Sprva so ga uporabljali le kot sladilo v prehrani, vendar so kmalu uvideli, da je še mnogo več kot le prehransko dopolnilo. Prvi zapisi o uporabi medu v medicinske namene segajo v obdobje Starega Egipta, kjer so ga uporabljali za celjenje ureznin, opeklin, kožnih razjed in drugih odprtih ran. Med je bil tudi najljubše zdravilo najslovitejšega zdravnika antike Hipokrata, prav tako pa je bil največkrat omenjeno zdravilo v rimskih farmakopejah. Že v 17. stoletju je Charles Butler v pomembni razpravi o čebelah in medu med opisal kot čistilno in dezinfekcijsko sredstvo, zdravilo proti kašlju in vnetem grlu, zdravilo za ustne razjede, kačje ugrize, balzam za oči, pomirjevalo pri želodčnih težavah, odvajalo, afrodisiak ter kot krepčilno in obnovitveno sredstvo. Kljub pozitivnim učinkom pri zdravljenju številnih bolezni in dolgi zgodovini uporabe medu v medicinske namene je med izgubil svoj pomen z odkritjem antibiotikov v 20. stoletju. V zadnjem času ponovno odkrivajo njegovo terapevtsko moč, kar potrjujejo tudi številna klinična testiranja (Jones, 2009; Kapš, 1998).

2.2 NASTANEK IN VRSTE MEDU

Med je gosto tekoče ali kristalizirano živilo, ki ga proizvajajo čebele *Apis mellifera* iz nektarja cvetov, izločkov iz živih delov rastlin ali pa iz različnih vrst mane, to je izločkov žuželk, ki so na živih delih rastlin. Osnovni material čebele zberejo, predelajo, mu dodajo izločke svojih žlez (encime), ga shranijo, posušijo in pustijo dozoreti v pokritih celicah satja (Pravilnik o medu, 2004).

Različne vrste medu so dobile ime po rastlinah, na katerih čebele nabirajo nektar oziroma mano (Plestenjak, 1999). Med se loči po geografskem in botaničnem izvoru, po načinu pridobivanja in letnem času, v katerem je bil pridobljen. V Sloveniji je sedem vrst medu, ki se pojavljajo najpogosteje. To so: akacijev, cvetlični, lipov, kostanjev, gozdni, smrekov in hojev med. Ti medovi so različno obarvani, od svetlo rumene do rumenkastorjave, različne viskoznosti, vonja, okusa in arome. Akacijev in cvetlični med spadata med medove iz nektarja. Lipov in kostanjev med sta po izvoru mešana, saj sta tako iz nektarja omenjenih

rastlin kot tudi iz mane. Gozdni, smrekov in hojev med so iz mane (Božnar in Senegačnik, 1998).

2.3 SESTAVA MEDU

Sestava medu je splet vplivov okolja, klime, botaničnega izvora in sposobnosti čebelarja, medtem ko so fizikalno-kemijske lastnosti odvisne od nektarja ali mane rastline. Po navedbah nekaterih naj bi med vseboval več kot 200 različnih komponent (White, 1975). Glavne sestavine medu so ogljikovi hidrati (75-80 %), voda (17 %), organske kisline (0,1-1 %), mineralne snovi (0,1-1,5 %) in aminokisline (0,2-2 %). Poleg teh so v medu prisotni še encimi, aromatične snovi, vitamini, minerali, pelod, vosek, flavonoidi, fenolne komponente, lipidi, terpeni, pigmenti in proteini (Božnar, 2003).

2.3.1 Ogljikovi hidrati

Sladkorji, ki jih vsebuje med, spadajo med enostavno zgrajene ogljikove hidrate. V medu je od 33 do 42 % fruktoze (v povprečju okrog 40 %), 27 do 36 % glukoze (v povprečju okrog 34 %) in 1 do 4 % saharoze. Mešanica glukoze in fruktoze se imenuje invertni ali reducirajoči sladkor in skupaj predstavlja 85-95 % vseh ogljikovih hidratov v medu. Razmerje med fruktozo in glukozo je karakteristično za posamezno sorto medu. Količina saharoze v medu je majhna zaradi prisotnosti encima invertaze, povečane koncentracije saharoze pa nakazujejo na potvorbo medu. Ker sta glukoza in fruktoza od vseh sestavin medu najmočnejše zastopani, dajeta medu njegove najznačilnejše lastnosti. Druge sestavine, ki jih vsebuje med v precej manjših količinah, povzročajo individualne razlike v senzoričnih lastnostih (barva, vonj in okus) med posameznimi vrstami medu (Božnar in Senegačnik, 1998).

2.3.2 Kisline

Med je kislo živilo s pH vrednostjo med 3,2 in 6,5. Kisline dajejo medu značilen okus in aromo, prispevajo k njegovi obstojnosti proti mikroorganizmom, povečajo število kemijskih reakcij ter protibakterijsko in antioksidativno aktivnost (White, 1975). V medu so poleg anorganskih kislin, od katerih je najpomembnejša fosforjeva, določili precejšnje

število organskih kislin, katerih količina je manjša od 0,5 %. Organske kisline v medu so: očetna, maslena, citronska, mravljična, glukonska, mlečna, maleinska, jabolčna, oksalna, piroglutaminska, jantarjeva, glikolna, piruvična in vinska. Med organskimi kislinami prispeva največjo kislost glukonska kislina, ki je produkt encimske reakcije, ki v medu poteka med glukoza oksidazo in glukozo. Glede na kislost medu lahko z veliko zanesljivostjo sklepamo o pristnosti medu (Božnar in Senegačnik, 1998).

2.3.3 Encimi

Encimi so med najpomembnejšimi in zanimivejšimi spojinami v medu, predvsem zaradi vloge, ki jo imajo pri nastajanju medu iz raznih vrst medičine. Izvirajo iz nektarja in mane, čebelje slinice ter izločkov krmilnih ali goltnih žlez čebel (Božnar in Senegačnik, 1998). Kljub temu, da so prisotni le v sledovih, imajo velik vpliv na naravo in značilnosti medu, saj prav vsebnost encimov loči med od ostalih sladil (Huidobro in sod., 1995). Glavni encimi v medu so invertaza (glukozidaza), diastaza (amilaza) in glukoza oksidaza. Encima katalaza in kislina fosfataza sta prisotna v manjših količinah (Božnar in Senegačnik, 1998).

Encim invertaza ali saharaza lahko delno izvira iz nektarja samega, večinoma pa iz izločkov čebeljih krmilnih žlez. Njegovo delovanje se začne v medičini in se močno okrepi v čebelji medeni golši. Ta encim spreminja dvojni sladkor saharozo v dva enojna sladkorja, glukozo in fruktozo in ima pomembno vlogo pri dozorevanju medu. Svež med vsebuje 8 % saharoze, star več kot dve leti pa samo še 2 do 3 %. Encimsko delovanje medu lahko popolnoma preneha, če ga nepravilno shranjujemo ali preveč segrevamo zaradi preprečevanja kristalizacije in vrenja, saj invertaza oslabi že pri daljšem segrevanju pri 45 °C, povsem pa se razkroji po krajšem segrevanju pri 70 °C (Božnar in Senegačnik, 1998).

Encim amilaza izvira deloma iz nektarja, deloma iz peloda, povečini pa iz čebeljih žlez. Amilaza pretvarja molekule škroba v dekstrine, oligo- in disaharide. Med zorenjem medu se amilaza primeša medičini iz izločkov čebeljih slinskih žlez. Ker med škroba ne vsebuje, amilaza v medu nima posebne vloge. Glede na količino amilaze v medu lahko precej zanesljivo sklepamo o pristnosti medu (Božnar in Senegačnik, 1998).

Glukoza oksidaza izvira iz krmilnih žlez čebel in je odgovorna za protibakterijsko delovanje medu. Encim je aktiven samo v razredčenem ali nezrelem medu. Njegova aktivnost je največja pri koncentraciji sladkorja 25 do 30 %. Glukoza oksidaza oksidira glukozo, pri čemer nastane glukonska kislina, vzporedni produkt te reakcije pa je vodikov peroksid. Nastanek in razpad vodikovega peroksida potekata ves čas, ko se medičina spreminja v med. V določenih okoliščinah (temperatura, koncentracija sladkorja) se določena osnovna količina vodikovega peroksida ne razkroji in je dovolj velika, da med deluje baktericidno. Ob naraščajočih količinah sladkorja v medičini, ki jo čebele zgoščujejo v med, se delovanje glukozne oksidaze zmanjšuje in se v dozorelem medu ustavi. Encim postane spet aktiven, ko med razredčimo z vodo. Dodatek vode najverjetneje pripomore tudi k dvigu pH vrednosti za optimalno delovanje encima (Božnar in Senegačnik, 1998). Ob izpostavljenosti medu visokim temperaturam in svetlobi se glukoza oksidaza inaktivira. Občutljivost medu na svetlobo je odvisna predvsem od izvora medičine in vrednosti pH v medu. Tako se v kislih nektarnih medovih glukoza oksidaza pod vplivom vidne svetlobe hitreje inaktivira kot v medovih iz mane (Dustmann, 1972).

Razpad vodikovega peroksida v kisik in vodo omogoča encim katalaza, ki je prisoten tako v medičini kot v cvetnem prahu. Medovi z nizko katalazno aktivnostjo imajo zaradi večjih količin nerazgrajenega vodikovega peroksida večji protibakterijski učinek (Božnar in Senegačnik, 1998; Weston, 2000).

2.4 PROTIMIKROBNE SNOVI V MEDU

Med zavira rast in razvoj velikega števila mikroorganizmov. Vzroki za to so (Božnar, 2003):

- velika vsebnost sladkorjev (več kot 95 % suhe snovi), ki določa visok osmotski pritisk in viskoznost,
- majhna vsebnost vode (14-21 %),
- nizek pH,
- prisotnost snovi s protimikrobnim delovanjem,
- majhna vsebnost dušika.

Visoka vsebnost sladkorjev v medu pripomore k temu, da se zmanjša delež biološko dostopne vode, s tem pa se ustvari okolje, ki je neugodno za rast mikroorganizmov. Povprečne vrednosti za vodno aktivnost v medu (a_w) se gibljejo od 0,56 do 0,62, pri teh vrednostih pa večina bakterij ne raste. Med zavira rast bakterijskih vrst, ki so občutljive na nizko a_w vrednost v okolju že pri relativno nizkih koncentracijah, predvsem zaradi učinka osmolarnosti. Rast bakterijskih vrst, ki so manj občutljive na nizko vsebnost vode v okolju lahko med prav tako zavira že pri nizkih koncentracijah, če vsebuje dovolj veliko količino drugih protibakterijskih faktorjev (Molan, 1992a).

Za protibakterijsko delovanje medu je pomembna tudi njegova kislost. Med je kislo živilo, s pH vrednostjo med 3,2 in 4,5. Nizek pH medu deluje inhibitorno na številne živalske patogene, katerih optimalni pH za rast je med 7,2 in 7,4. Med zavira tudi rast glavnih bakterijskih vrst, ki okužujejo rane in katerih minimalni pH za rast znaša 4,3 (*Escherichia coli*), 4,0 (*Salmonella* sp.), 4,4 (*Pseudomonas aeruginosa*) in 4,5 (*Streptococcus pyogenes*) (Molan, 1992a).

Substance s protimikrobnim delovanjem, tako imenovane inhibine, lahko razdelimo v dve skupini oziroma na dva inhibinska sistema (Bogdanov, 1997):

- toplotno in svetlobno labilni peroksidni sistem ter
- toplotno in svetlobno stabilni neperoksidni sistem inhibinov.

2.4.1 Peroksidni sistem inhibinov

Peroksidni sistem inhibinov predstavlja v medu nastali H_2O_2 skupaj z encimoma glukoza oksidazo in katalazo. Količina nastalega H_2O_2 je odvisna od sinteze pod vplivom delovanja glukoza oksidaze in razgradnje s pomočjo katalaze. Količina H_2O_2 je torej sorazmerna koncentraciji glukoza oksidaze in obratno sorazmerna koncentraciji katalaze (Weston, 2000).

Količina glukoza oksidaze, ki jo primešajo čebele med zorenjem medu, v posameznih vrstah medu ne variira toliko kot količina katalaze, ki je v veliki meri odvisna od količine cvetnega prahu v medu in njegovega biološkega porekla. Zaradi različnega izvora glukoza

oksidaze in katalaze količina nastalega H_2O_2 med vrstami, kot tudi znotraj posamezne vrste medu, zelo variira. Zreli medovi ne vsebujejo značilnih količin H_2O_2 ($< 0,3$ ppm), saj je aktivnost glukoza oksidaze odvisna od vsebnosti vode v medu (White in sod., 1963). Z redčenjem medu se aktivnost encima poveča za 2500-50000 krat. V zrelem medu aktivnost glukoza oksidaze zavira neugoden pH medu. Glukoza oksidaza ima pH optimum pri 6,1 in je dobro aktivna, če je pH vrednost med 5,5 in 8. Pod pH 5,5 njena aktivnost močno pade in se izniči pri pH 4 (Molan, 1992a). Encim glukozna oksidaza je občutljiv na toploto in svetlobo, tako da predelovanje medu in njegovo skladiščenje močno vplivata na stopnjo protibakterijske učinkovitosti medu. Nepredelan (nepasteriziran in nefiltriran) med ima največjo protibakterijsko aktivnost, čeprav se tudi v nepredelanem medu pojavljajo velike razlike v njegovi protibakterijski učinkovitosti, kar je povezano predvsem z rastlinskim izvorom medu (Basualdo in sod., 2007). Peroksidni sistem je toplotno manj stabilen od diastaze in invertaze. V različnih vzorcih medu se pri 10 minutnem segrevanju pri 70 °C povprečno izgubi 82 % količine nastalega H_2O_2 (White in Subers, 1964a). White in Subers (1964b) sta dokazala tudi, da glukoza oksidazo inaktivira svetloba, in sicer je sistem najbolj občutljiv na vidno svetlobo pri valovni dolžini 425-525 nm.

2.4.2 Neperoksidni sistem inhibinov

V medu najdemo tudi koncentrirane rastlinske izločke in fenolne spojine, ki izvirajo iz rastlin, na katerih čebele nabirajo med. Bogdanov (1984) je s tankoplastno kromatografijo dokazal prisotnost pinocembrina in drugih protimikrobnih snovi, ki spadajo v skupino flavonoidov. Flavonoidi so polifenolni flavonski derivati, ki jih najdemo v vseh rastlinskih strukturah kar v precejšnjih količinah (od 0,5 do 1,5 %). Flavonoidi imajo številne biološke učinke. So antioksidanti in odstranjevalci prostih radikalov, delujejo protivnetno in imajo protimikrobno aktivnost (Kapš, 1998). Flavonoidi so prisotni tudi v propolisu, to je v smolnatih substancah, ki jih čebele prinašajo v panj z različnih rastlinskih virov, da z njimi prevlečejo satje zaradi zaščite pred mikroorganizmi. Flavonoidi so prisotni v medu zaradi čebeljega vnosa smolnatih substanc v med ali sekundarne difuzije iz celic satja, v katerih je med med zorenjem skladiščen (Bogdanov, 1984). Vsebnost neperoksidnih faktorjev predstavlja glavni del protibakterijske učinkovitosti predvsem pri novozelandskem medu manuka (Molan, 1992a).

2.5 PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST MEDU

Protibakterijsko učinkovitost medu proti različnim patogenim bakterijam so dokazovali že številni znanstveniki. Dokazali so pomembno protibakterijsko delovanje lokalno pridobljenih ter komercialno dostopnih terapevtskih vrst medu proti širokemu spektru človeških patogenov: *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium phlei*, *Salmonella californica*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* in *Staphylococcus epidermidis* (Lusby in sod., 2005).

Tudi French in sodelavci (2005) so dokazali, da med s srednjo protibakterijsko učinkovitostjo zavira rast koagulazno negativnih stafilokokov. Rast vseh 18 kliničnih izolatov je bila inhibirana že pri 2,7–5 % (v/v) koncentraciji medu, medtem ko je njihovo rast zavrla šele 27,5–31,7 % (v/v) sladkorna raztopina. S tem so dokazali, da protibakterijsko učinkovitost medu ne gre pripisovati samo njegovi osmolarnosti, temveč predvsem protibakterijskim komponentam, ki jih vsebuje. Koagulazno negativne stafilokoke danes uvrščamo med pet najpogostejših povzročiteljev bolnišničnih okužb. Nevarne okužbe povzročajo zlasti pri starejših ljudeh in bolnikih z zmanjšano imunsko odpornostjo, posebej kadar so ti izpostavljeni invazivnim posegom ali imajo uvedene različne žilne in urinske katetre ter druge vsadke (Seme, 2002a). Med v obliki prožnega gela oziroma z medom impregnirane prevleke na izhodnih mestih medicinskih naprav imajo tako velik potencial pri preprečevanju in nadzoru okužb s koagulazno negativnimi stafilokoki v bolnišnicah (French in sod., 2005).

Med je prav tako učinkovit pri zaviranju rasti bakterijske vrste *P. aeruginosa* (Cooper in sod., 2002a; Sherlock in sod., 2010), ki pri nas med povzročitelji okužb ran in opeklin zaseda drugo mesto, takoj za stafilokoki (Müller-Premru, 2002). Vseh 17 izolatov *P. aeruginosa*, izoliranih iz opeklin, je izkazovalo podobno občutljivost na cvetlični med ter med manuka z minimalno inhibitorno koncentracijo pod 10 % (v/v), kar nakazuje, da bi z medom lahko zdravili tudi opeklino, okuženo s to bakterijsko vrsto (Cooper in sod., 2002a). Ker *P. aeruginosa* v kroničnih ranah tvori bakterijski biofilm, so določali tudi protibakterijsko delovanje medu manuka na biofilm, ki ga je tvorila vrsta *P. aeruginosa*.

Tvorba biofilma v kroničnih ranah dodatno otežuje celjenje ran, saj so bakterije v biofilmu 500 krat manj občutljive na delovanje antibiotikov in gostiteljev imunski odziv. Pri izpostavitvi bakterijskega biofilma 40 % medu manuka so ugotovili bistveno zmanjšanje biomase v biofilmu, največji učinek pa so opazili po 9-11 urah (Okhiria in sod., 2009). Tudi Alandejani in sodelavci (2009) so dokazali, da med ubije bakterijske celice *P. aeruginosa* in *S. aureus* v biofilmu.

Med deluje baktericidno tudi na proti antibiotikom odporne seve bakterij MRSA (proti meticilinu odporen *S. aureus*) (Sherlock in sod., 2010) in VRE (proti vankomicinu odporen *Enterococcus faecalis*) (Cooper in sod., 2002b). Minimalna inhibitorna koncentracija za 18 izolatov MRSA, testiranih v raziskavi, je bila za med manuka in cvetlični med 2,7-4 %, pri VRE pa 4,61 % za med manuka in 8,25 % za cvetlični med. Inhibicijo rasti omenjenih izolatov so torej dosegli že z manj kot 10 % raztopino medu, za isti učinek pa je bil potreben vsaj trikrat bolj koncentriran sladkorni sirup (Cooper in sod., 2002b). Odkrivanje, zdravljenje in preprečevanje širjenja okužb z rezistentnimi bakterijskimi vrstami je danes eden ključnih problemov na področju infekcijskih bolezni in mikrobiologije (Seme, 2002a). Med je učinkovit tudi pri zdravljenju ran, koloniziranih z rezistentnimi bakterijskimi vrstami in tako predstavlja novo rešitev v boju proti odpornim mikroorganizmom, ki otežujejo zdravljenje v bolnišnicah in s tem posredno povečujejo stroške zaradi daljše hospitalizacije (Cooper in sod., 2002b; Sherlock in sod., 2010).

Naravni med deluje protibakterijsko na številne patogene bakterije, podoben učinek pa ima tudi na ustne streptokoke. Rast *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sobrinus* je zavrla 25 % razredčina evkaliptusovega medu, minimalna inhibitorna koncentracija za *Streptococcus anginosus* in *Streptococcus oralis* pa je bila 17 % in 12 % (Basson in sod., 1994). Badet in Quero (2011) sta dokazala tudi, da med manuka v koncentraciji 200 µg/ml inhibira ustne patogene znotraj dentalnega plaka ter v koncentraciji 500 µg/ml ustavi tvorbo biofilma ustnih bakterij.

2.6 NORMALNA MIKROBNA FLORA USTNE VOTLINE

Ustna votlina človeka je okolje, ki ga naseljuje kompleksna in heterogena mikrobná združba. Zobje in usta so nenehno v stiku z mikrobi iz okolice. Bakterije se v ustih naseljujejo postopoma. Ustna votlina otroka je ob porodu sterilna, vendar jo že po nekaj urah (4-12 ur po porodu) poselijo bakterije, ki jim kisik ne škoduje. To so predvsem streptokoki (*S. salivarius*) in laktobacili. V prvem letu življenja prevladujejo vrste iz rodov *Streptococcus* (*S. salivarius*), *Staphylococcus* (*S. epidermidis*), *Neisseria* spp. in *Veillonella* spp. Po izrastu prvih zob se v ustih naselijo bakterije, ki so prilagojene na rast na zobni površini in gingivalnem sulkusu. To so *S. sanguis*, *S. mutans*, *Actinomyces* spp., *Lactobacillus* spp., *Rothia dentocariosa* in *Capnocytophaga* spp. Pri prenosu bakterij igra pomembno vlogo slina. Sčasoma, ko otrok uživa vse bolj raznoliko hrano, začno v ustih prevladovati mikroaerofilne in aerobne paličaste bakterije, tako da se normalna ustna flora med 2. in 4. letom starosti že dokončno oblikuje. Pri zdravih otrocih do pubertete najdemo naslednje bakterije: vrste *Streptococcus* (*S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mutans*), *Actinomyces* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leptotrichia buccalis*, *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp. S poglobljanjem gingivalnih žepov po izrastu stalnih zob se ustvari niša za anaerobne bakterije. V zdravih ustih odraslih ljudi je delež anaerobnih bakterij vedno manjši od 1 % vse mikrobne flore. Pri odraslih mikrobno floro sestavljajo *Streptococcus* spp., *Neisseria* spp., *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Rothia* spp., *Capnocytophaga* spp. V ustih odraslih lahko najdemo tudi treponeme (*Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, *Treponema vincentii*, *Treponema pectinovorum*). V velikih količinah jih najdemo v subgingivalni mikroflori pri vnetnih spremembah, medtem ko jih je na zdravi sluznici zelo malo. Ustna votlina starostnikov je podobna dojenčkovi, in sicer v brezzobih ustih ni možnosti za razrast anaerobnih bakterij. Prevladujejo *S. salivarius*, *S. epidermidis*, *Neisseria* spp., *Corynebacterium* spp. in *Veillonella* spp. *S. mutans* in *S. sanguis* se izgubita, ponovno pa se pojavita, če oseba nosi zobno protezo (Dragaš, 1996; Seme, 2002b).

2.6.1 Ustni streptokoki

Streptokoki so najpogostejše bakterije, ki sodelujejo pri razvoju zobne gnilobe. Sicer prevladujejo v normalni ustni flori in predstavljajo vsaj 80 % od vseh obstoječih bakterijskih vrst, ki jih najdemo v zdravi ustni votlini. Zaradi spremenjenih okoliščin (slaba ustna higiena, neprimerna prehrana, zmanjšan imunski odziv) pride do količinskih sprememb in povečanja števila bakterij, ki se prilepljajo na zobe v številnih plasteh, tvorijo debele polisaharidne zobne obloge in povzročajo oportunistične okužbe. Zobna gniloba je endogena kronična bakterijska bolezen, ki nastane zaradi bakterijskega biofilma na zobni površini in lahko spremeni ali popolnoma uniči kalcificirane dele zob (Dragaš, 1996).

Ustni streptokoki so po Gramu pozitivni koki v verižicah, negibljivi, nesporogeni fakultativni anaerobi. Za rast in pridobivanje energije izkoriščajo ogljikove hidrate, predvsem saharozo oziroma glukozo in laktozo, iz katerih tvorijo mlečno kislino. To omogoča izstopanje kalcija in demineralizacijo sklenine in dentina ter tako okvaro zobne površine, ki pri zdravih osebah uspešno varuje zob pred vdorom bakterij (Dragaš, 1996). Klasifikacija ustnih streptokokov je prikazana v preglednici 1.

Preglednica 1: Klasifikacija najpomembnejših streptokokov v ustih (Dragaš, 1996: 38)

Ustni streptokoki	<i>S. salivarius</i> <i>S. sanguis</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. crista</i> <i>S. oralis</i> <i>S. pneumoniae</i> (<i>S. mitis</i>) <i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. intermedius</i>	Skupina <i>S. oralis</i>
	<i>S. mutans</i> <i>S. rattus</i> <i>S. cricetus</i> <i>S. sobrinus</i> <i>S. ferus</i> <i>S. macacae</i>	Skupina <i>S. mutans</i>

2.7 PARODONTALNA BOLEZEN

Človek lahko sam močno vpliva na funkcionalne lastnosti in s tem tudi na videz svojih zob, obzobnega tkiva in čeljustnih grebenov. Od mnogih okoliščin, zlasti pa od prehranjevalnih navad in ustne higijene je odvisno, kateri mikrobi bodo na katerih delih ust prevladovali in na njih tudi povzročali bolezenske spremembe. Vnetja obzobnih tkiv ali parodontalne bolezni obsegajo različna bolezenska stanja, ki ogrožajo oporna ali obzobna tkiva. Gre za kronična, počasi napredujoča vnetja, ki se najprej kažejo kot začetni gingivitis. Gingivitis je nespecifični vnetni odgovor dlesni na prisotnost bakterijske obloge ob zobnem vratu. Kadar gingivitis napreduje, vnetje zajame pozobnico in alveolarno kost, kar imenujemo parodontitis (Grošelj in Gubina, 2002).

Parodontitis se torej v odvisnosti od imunskega sistema posameznika razvije v tkivu okoli zoba kot odgovor na bakterijsko akumulacijo (zobno oblogo) na zobu. Bakterije redko povzročijo očitno okužbo, toda imunski odgovor, ki ga sprožijo, je brez dvoma vzrok za napredujočo izgubo kolagenske povezave zoba s spodaj ležečo čeljustnico. Za parodontitis

je značilno, da se gingivalno prirastišče premika apikalno, kar se klinično vidi kot poglobljanje parodontalnih žepov. Parodontalni žepi so nastale špranje med zobno površino in bližnjim tkivom dlesni, njihova globina pa je lahko od 4 do 12 mm. Taki žepi, odvisno od njihove globine in obsega, nudijo nišo kar od 10^7 do skoraj 10^9 bakterijskim celicam. Krvavenje iz dlesni in izguba kolagenske povezave, ki spremljata parodontalno bolezen, sta ponavadi neboleča, zato ju posameznik zlahka spregleda. Bolnik se pogosto prvič sooči s problemom, ko ga zobozdravnik opozori na prisotnost parodontalnih žepov, ki so globlji od 4 mm. Če simptomov ne zdravimo, je parodontalna bolezen najpogostejši vzrok za izgubo zob v zreli dobi (Loesche in Grossman, 2001).

Parodontitis je v primerjavi z gingivitisom nepovratno stanje. Pri zdravljenju ne pride do popolne obnove. Če ne vzpostavimo pravilne ustne higijene in ne naredimo mehanskega luščenja in glajenja koreninske površine, se lahko globina parodontalnih žepov na vnetnem predelu še poveča. S tem se razširi mikroekološka niša za bakterije, ki tako niso več izpostavljene naravnemu izpiranju s slino in mehanskim vplivom žvečenja in krtačenja. Zaradi vnetja se resorbira alveolarna kost, hkrati pa se prirastišče dlesni pomakne iz vnetno prizadetega okolja v apikalni smeri proti zdravi koreninski površini. Ob prizadetih zobeh nastajajo globoki parodontalni in kostni žepi. Razgalijo se lahko tudi medkoreninska razcepišča (Grošelj in Gubina, 2002).

Parodontalna bolezen je oportunistična okužba, za katero morajo biti izpolnjeni trije pogoji, in sicer:

- Prisotnost primerne števila izbranih bakterij, ki so sicer normalno prisotne
- Primerna ekološka niša, ki omogoča nemoten razvoj anaerobnih bakterij in
- Oslabljen gostiteljev imunski odziv zaradi dejavnikov, kot so genetska predispozicija in različna kronična obolenja (Grošelj in Gubina, 2002).

V razvoj parodontitisa so vpletene predvsem parodontopatogene bakterije (Socransky in Haffajee, 1992), poleg teh pa na bolezen vpliva še genetska predispozicija, ki se odraža v imunskem odzivu (Kornman, 2001), slaba ustna higiena (Loesche in Grossman, 2001), kajenje (Bergstrom in sod., 2000) in stres (Loesche in Grossman, 2001). Možnost za razvoj

parodontitisa povečajo tudi sistemske bolezni oziroma kakršno koli zdravstveno stanje, ki vpliva na človekov obrambni sistem. Sem spadajo sladkorna bolezen, okužba z virusom HIV in nevtrofilne nepravilnosti (Loesche in Grossman, 2001).

2.7.1 Oblike parodontitisa

Sodobna razvrstitev bolezni obzobnih tkiv temelji na raznolikosti vzročnih dejavnikov, patogeneze, klinične slike, izida in odziva na zdravljenje. Parodontalno bolezen razvršča v naslednje bolezenske skupine: bolezen dlesni, kronični parodontitis (razširjen, omejen), agresivni parodontitis (razširjen, omejen), parodontitis v sklopu sistemske bolezni, nekrotizirajoče parodontalne bolezni, parodontalni absces, parodontitis v povezavi z endodontsko spremembo, razvojne in pridobljene nepravilnosti obzobnih tkiv (Armitage, 1999; Gašperšič in Skalerič 2006).

Pri omejeni (lokalizirani) obliki parodontitisa je prizadetih manj kot 30 % površin zob, pri razširjeni (generalizirani) obliki pa več kot 30 % površin zob. Stopnja bolezni je opredeljena kot začetna ob izgubi kliničnega prirastišča 1-2 mm, zmerna ob izgubi kliničnega prirastišča 3-4 mm in napredovana ob izgubi kliničnega prirastišča enaki ali večji od 5 mm (Gašperšič in Skalerič, 2006).

Agresivne oblike parodontitisa se pojavljajo pri osebah, ki so stare od 14 do 35 let. Sem spada tudi lokalni juvenilni parodontitis, vendar je pri agresivnih oblikah bolezni količina zobne obloge in zobnega kamna mnogo večja, to pa se konča z izgubo zob že pred 20. letom starosti. Glavne parodontopatogene bakterije, ki sprožijo razvoj agresivnih oblik so *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* in *T. forsythus* (Kamma in sod., 1994; Kuru in sod., 1999; Loesche in Grossman, 2001). Lokalni juvenilni parodontitis se razvije pri najstnikih in je v klasični obliki omejen na zobe, ki izpadejo okoli 6. leta starosti (kočniki in sekalci). Globoki parodontalni žepi nastanejo ponavadi šele po puberteti in vsebujejo majhno količino zobne obloge. V razvoj lokalnega juvenilnega parodontitisa je vpletena bakterija *A. actinomycetemcomitans*, saj je prevalenca te bakterije višja pri bolnikih z lokalnim juvenilnim parodontitisom kot pri bolnikih s kroničnim parodontitisom ali pri

zdravih posameznikov (Loesche in Grossman, 2001; Mandell in Socransky, 1981; Slots, 1982).

Najpogostejša oblika parodontitisa je kronični parodontitis, ki se razvije pri posameznikih nad 35. letom starosti. Najpogostejše bakterijske vrste, ki jih osamimo iz vzorcev bolnikov s kroničnim parodontitisom so *P. gingivalis*, *T. forsythus*, *P. intermedia*, *T. denticola* in ostale spirohete, saj jih najdemo v 80 do 100 % vzorcev (Loesche in sod., 1992b; Loesche in Grossman, 2001).

2.7.2 Epidemiologija parodontalnih bolezni

Parodontitis postaja vse pogostejši vzrok za izgubo zob pri odraslih po 35. letu starosti. Ker prevalenca parodontalnih bolezni s starostjo narašča, naj bi se zaradi staranja populacije število obolelih še povečalo. Približno 50 % odrasle populacije ima razvit gingivitis (vnetje dlesni brez izgube kosti in parodontalnih žepov, globljih od 3 mm) okoli treh ali štirih zob, 30 % populacije pa ima razvit parodontitis (trije ali več zob s parodontalnimi žepi, ki so globlji od 4 mm). Približno 5 do 15 % bolnikov s parodontitisom razvije napredujočo obliko bolezni s parodontalnimi žepi, globljimi od 6 mm. Agresivne oblike parodontitisa prizadenejo le 3 do 4 % populacije (Loesche in Grossman, 2001). Najnovejša epidemiološka raziskava v Sloveniji je pokazala, da 98,3 % prebivalcev Ljubljane potrebuje luščenje in glajenje korenin, kar 47,1 % preiskovancev pa poleg luščenja in glajenja korenin potrebuje kompleksno parodontalno kirurško zdravljenje (Skalerič in sod., 2008).

2.8 PARODONTOPATOGENE BAKTERIJE

Bakterije, ki lahko sprožijo razvoj parodontalne bolezni sodijo v skupino močno patogenih, striktno anaerobnih ali mikroaerofilnih bakterij. Morfološko so to po Gramu negativni bacili ter nitaste in spiralne bakterije (Grošelj in Gubina, 2002). Med najpomembnejše parodontopatogene bakterije štejemo vrste *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* in *T. denticola* (Loesche in Grossman, 2001). V manjših količinah jih lahko dokažemo tudi pri nižjem deležu zdravih posameznikov, zato so za razvoj parodontitisa pomembne le velike količine parodontopatogenih bakterij. Številne med

njimi tvorijo virulenčne dejavnike, ki sami po sebi ali preko imunskega odziva prispevajo k razvoju progresivne parodontalne bolezni (Sorsa in sod., 1992). Preglednica 2 prikazuje posamezne stopnje razvoja okvare zob in obzobnih tkiv z glavnimi povzročitelji.

Preglednica 2: Stopenjski razvoj okvare zob in obzobnih tkiv (Dragaš, 1996: 56)

Stopnja okvare	Povzročitelji
Zobne obloge	Streptokoki (<i>S.mutans</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. sobrinus</i>) Anaerobni streptokoki
Zobne obloge in zobna gniloba	Streptokoki (<i>S.mutans</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. sobrinus</i>) Anaerobni streptokoki Laktobacili <i>Actinomyces ondolyticus</i> , <i>A.viscosus</i> , <i>A.naeslundii</i>
Obzobna tkiva: gingiva, cement, periodontalni ligament	<i>P. gingivalis</i> <i>F. nucleatum</i> <i>P. intermedia</i> <i>E. corrodens</i> <i>Capnocytophaga</i> sp. <i>A. actinomycetemcomitans</i>
Obzobna tkiva, vključno z alveolarno kostjo	<i>P. gingivalis</i> <i>F. nucleatum</i> <i>P. intermedia</i> <i>E. corrodens</i> <i>Capnocytophaga</i> sp. <i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>Campylobacter</i> sp. <i>Selenomonas</i> sp. <i>T. pectinovorum</i> <i>T. denticola</i>

2.8.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

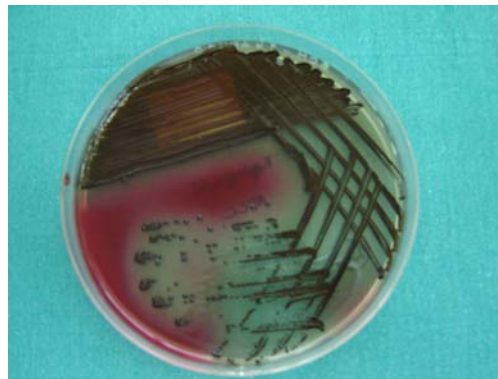
Bakterija je bila premeščena iz rodu *Actinobacillus* v rod *Aggregatibacter*, kamor uvrščamo fakultativno anaerobne, negibljive, po Gramu negativne bacile. Na rutinskih trdnih gojiščih so celice majhne, kokoidne oblike, v tekočih gojiščih s serumom in na gojiščih, ki vsebujejo sladkorje, pa so celice daljše, paličaste oblike. Rast *A. actinomycetemcomitans* zahteva obogatena gojišča in je izboljšana v atmosferi s 5 do 10 % ogljikovim dioksidom (CO₂). Kolonije imajo prvotno temnejši center, ki se med nadaljnjo inkubacijo razvije v zvezdasto strukturo, kar daje kolonijam videz prekrižanih cigar (Dragaš, 1996). Sveži klinični izolati rastejo v tekočih gojiščih s serumom v obliki zrn, ki so pritrjena na steno ali dno epruvete. Zrna predstavljajo lepljiv, težko odstranljiv biofilm, ki ga tvori bakterija, kadar raste na trdnih površinah. Za močno povezavo biofilma s površino so odgovorni dolgi, v šop zaviti pili, ki se tvorijo na celični površini. V primerjavi s prostimi celicami biofilm izkazuje povečano odpornost na antibiotike in ga je težko odstraniti z detergenti, proteazami, vročino, ultrazvokom ali vorteksiranjem (Kaplan in sod., 2003; Schreiner in sod., 2003).

Glede na površinske ogljikove hidrate ločimo pet serotipov. S parodontalno boleznijo, tvorbo β -laktamaz, bakteremijo in endokarditisom je povezan serotip b. Za seve serotipa b je značilna tudi tvorba virulenčnih dejavnikov levkotoksinov. Levkotoksini omogočajo bakteriji, da ostane v tkivu dlesni in iz ustne votline celo vstopi v krvni obtok ter povzroči okužbe izven ustne votline. Njena navzočnost sproži povečanje titra protiteles proti antigenu LPS, proti ogljikovim hidratom, ki so specifični za serotip in proti levkotoksinom (Loesche in Grossman, 2001), kar poškoduje obzobno tkivo (Brondz in Olsen, 1989).

A. actinomycetemcomitans najdemo pri lokalnem juvenilnem parodontitisu in drugih agresivnih oblikah parodontitisa. Bakterijo pridobimo v zgodnjem otroštvu, verjetno od družinskih članov (Loesche in Grossman, 2001). Povečini je občutljiva na cefalosporine, tetracikline in fluorokinolone, odpornost na penicilin, amikacin in makrolide je redka (von Graevenitz in sod., 1995).

2.8.2 Bakterije rodu *Porphyromonas*

Sem sodijo pigmentirani, nesaharolitični, po Gramu negativni, nesporogeni, obligatno anaerobni drobni bacili in kokobacili. Kolonije na krvnem agarju so drobne, svetleče, konveksne, gladke ali hrapave, 1-2 mm premera, ki temnije od roba proti sredini praviloma po 4-8 dneh. Zaradi tvorjenja protohema ter majhnih količin protoporfirina lahko počrni vsa kolonija. Včasih se razvije pigment šele po 21 dneh, izjemoma ga ni (Dragaš, 1996). *P. gingivalis* pri parodontalni bolezni prevladuje v parodontalnih žepih, saj so ga odkrili v 79 % vzorcev iz parodontalnih žepov, medtem ko je bil v skupini z zdravimi posamezniki prisoten v manjšem številu (Griffen in sod., 1998). Povezan je z agresivnimi oblikami parodontitisa pri odraslih in je skupaj z vrsto *P. endodontalis* pogosto vpleten v okužbe zobne korenine (Matto in sod., 1997). Slika 1 prikazuje referenčni izolat *P. gingivalis* ATCC 33277.



Slika 1: Referenčni izolat *P. gingivalis* ATCC 33277, agar po Schaedler-ju

2.8.3 Bakterije rodu *Prevotella*

V rod *Prevotella* uvrščamo po Gramu negativne, negibljive, nesporogene, saharolitične pigmentirane anaerobne bacile. Od pigmentiranih vrst *Prevotella* v vzorcih iz ustne votline najpogosteje najdemo vrsti *P. intermedia* in *P. nigrescens*. Prvotno sta bili to ena vrsta, pred približno desetimi leti pa so ju ločili na podlagi homologije DNK, seroloških testov, raziskav izoencimov in celokupnih celičnih beljakovin. *P. intermedia* je pogostejša v vzorcih iz parodontalnih žepov, medtem ko je *P. nigrescens* pogostejša v vzorcih, odvzetih z zdravih mest. Klinični izolati *P. intermedia* so odporni na določene antibiotike. *P.*

intermedia tako predstavlja pomemben vir genov, ki posredujejo odpornost na antibiotike in se lahko prenašajo na druge bakterije v ustni votlini (Duncan, 2003).

V skupino *Prevotella oralis* prištevamo saharolitične nepigmentirane anaerobne bacile, kamor sodijo *Prevotella oralis*, *P. veroralis*, *P. buccalis* in *P. oulorum*. Bakterije *P. oralis* povzročajo vnetja v področju periapiksa. Osamili so jih pri nekrotičnih vnetjih v koreninskih kanalih (Dragaš, 1996).

2.8.4 *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*)

T. forsythensis je vretenasta, po Gramu negativna paličasta bakterija in jo pogosto osamijo skupaj z vrstami *Campylobacter rectus*, *F. nucleatum* in *P. gingivalis*. Na krvnem agarju tvori zelo drobne kolonije, ki kažejo v bližini bakterij *S. aureus* ali *F. nucleatum* satelitski fenomen. *T. forsythensis* potrebuje zunanji vir N-acetilmuraminske kisline za pomnoževanje in vzdrževanje celične stene in je zato odvisna od ostalih bakterij, ki so prisotne v parodontalnih žepih. Med najpomembnejše virulenčne dejavnike sodita tripsinu podoben encim in sialidaza (Dragaš, 1996).

T. forsythensis je pomemben parodontopatogen v napredujočih oblikah parodontitisa in oblikah parodontitisa, ki se ne odzivajo na zdravljenje. Kamma in sod. (1994) so s pomočjo klasične bakteriološke diagnostike pri bolnikih z agresivnim parodontitisom dokazali omenjeno bakterijsko vrsto v 53 % parodontalnih vzorcev.

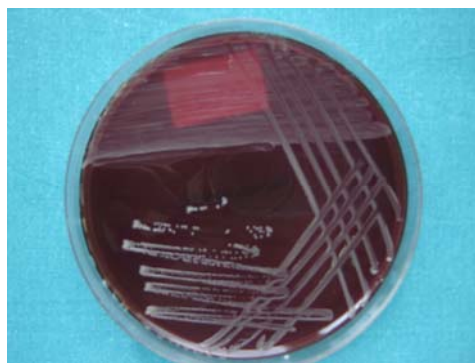
2.8.5 Ustne treponeme

V zobni oblogi lahko najdemo različne spirohete, med njimi pa je le nekaj takih, ki so jih uspeli kultivirati na umetnih gojiščih. Tiste, ki so bile kultivirane in identificirane do vrste, spadajo v rod *Treponema* (Choi in sod., 1994). Treponeme so spiralno oblikovani mikroorganizmi, ki v premer merijo od 0,15 do 0,30 μm , v dolžino pa od 5 do 16 μm . Dokazali so jih v subgingivalni mikroflori pri vnetnih spremembah, predvsem v globokih parodontalnih žepih, v zdravem tkivu pa so redke (Dragaš, 1996). Pri bolnikih s parodontitisom so prisotne kar v 88 do 97 % (Loesche in Grossman, 2001). Najpogosteje

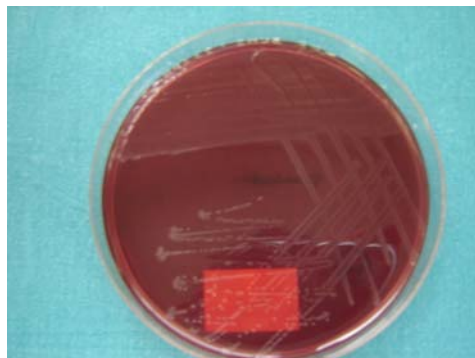
osamljena vrsta je *T. socranskii*, sledijo *T. denticola*, *T. pectinovorum* in *T. vincentii* (Norris in Larsen, 1995).

2.8.6 Mikrobni kompleksi v zobni oblogi

Med parodontalno patogenimi bakterijami obstajajo specifične povezave, tako da so določili pet glavnih mikrobni kompleksov oziroma skupin, ki soobstajajo v zobni oblogi. Prvi ali t.i. rdeči kompleks tvorijo vrste *P. gingivalis*, *T. denticola* in *T. forsythensis* in je močno povezan z aktivno fazo razgradnje zobnih tkiv pri kroničnem parodontitisu, saj izkazuje močno povezavo z globino parodontalnega žepa in krvavitvijo iz dlesni. Osrednja skupina drugega ali oranžnega kompleksa predstavlja bakterije *F. nucleatum/periodonticum* ssp., *P. intermedia*, *P. nigrescens* in *P. micros*. Temu kompleksu so pridružene še druge bakterijske vrste (*Eubacterium nodatum*, *C. rectus*). V tretji kompleks so uvrščene številne vrste iz rodu *Streptococcus*, četrti kompleks vključuje bakterije *Capnocytophaga* spp., *Campylobacter concisus*, *E. corrodens* in *A. actinomycetemcomitans* serotip a. V peti kompleks se uvrščata vrsti *Veillonella parvula* in *Actinomyces odontolyticus*. *A. actinomycetemcomitans* serotip b glede na rezultate raziskave ni bil povezan z nobenim od naštetih kompleksov (Socransky in sod., 1998). Pri agresivnem parodontitisu je ugotovljena močna povezava med bakterijama *T. forsythensis* in *C. rectus* (Kamma in sod., 2004). Slika 2 prikazuje klinični izolat vrste rodu *Capnocytophaga*, slika 3 pa klinični izolat *F. nucleatum*, ki smo ju osamili iz vzorcev iz parodontalnih žepov.



Slika 2: Klinični izolat vrste rodu *Capnocytophaga* spp., osamljen iz vzorca iz parodontalnega žepa, agar po Schaedler-ju



Slika 3: Klinični izolat *F. nucleatum*, osamljen iz vzorca iz parodontalnega žepa, agar po Schaedler-ju

2.9 ZDRAVLJENJE PARODONTALNE BOLEZNI

Zdravljenje parodontitisa lahko razdelimo na tradicionalno mehansko zdravljenje, antibiotično zdravljenje in kombinacijo obeh zdravljenj (Loesche in Grossman, 2001). Dovajanje antibiotikov ob mehanskem zdravljenju izboljša klinični izid parodontalnega zdravljenja v primerjavi z mehanskim zdravljenjem (Herrera in sod., 2002; Haffajee in sod., 2003).

2.9.1 Tradicionalno mehansko zdravljenje

Parodontalno zdravljenje v ožjem pomenu poteka v sledečem vrstnem redu (Skalerič in Gašperšič, 2005):

- higienska faza (vzročno zdravljenje, osnovno zdravljenje),
- kirurška (korektivna) faza ter
- podporno zdravljenje (vzdrževanje).

Osnova higienske faze parodontalnega zdravljenja je odstranitev bakterijskega biofilma in lokalnih vzročnih dejavnikov, kar dosežemo s profesionalnim čiščenjem zob, odstranitvijo zobnega kamna, luščenjem in glajenjem korenin in dezinfekcijo ustne sluznice. S kirurškimi postopki v naslednji fazi poskušamo doseči obnovo obzobnih tkiv in dodatno zmanjšati obzobne žepe. Zmanjšanje obzobnega žepa lahko dosežemo z odstranitvijo mehkih tkiv, ki obdajajo obzobne žepe, ali s spodbujanjem nastanka novega prirastišča

(regenerativni postopki) (Skalerič in Gašperčič, 2005). Uspeh korektivne faze je močno odvisen od učinkovitosti higienske faze. Parodontalni-kirurški posegi omogočijo obnovo obzobnih tkiv le pri bolnikih z visoko stopnjo ustne higiene, pri bolnikih s slabo ustno higieno in prisotnostjo plaka pa kirurški posegi povzročijo še dodaten razkroj pozobnice in kosti. Po vzročnem in korektivnem zdravljenju parodontitisa ob posameznih zobeh še vedno ostanejo plitvi obzobni žepi, zato se po končanem zdravljenju (ponovno) izmeri globina sondiranja in oceni prisotnost krvavitve ob sondiranju. Cilj podpornega zdravljenja je na mestih s povečano globino sondiranja in prizadetimi koreninskimi razcepišči z ustrezno pogostim odstranjevanjem bakterijskega biofilma preprečiti ponovitev vnetnega procesa in s tem nadaljnjo razgradnjo obzobnih tkiv, kar je ključno za uspešno parodontalno zdravljenje (Kaldahl in sod., 1996; Cvetko in Skalerič, 2008). Zobozdravniški standard priporoča, da naj bi se bolniki vračali na mehansko zdravljenje na vsake 3 do 6 mesecev do konca življenja (Loesche in Grossman, 2001).

Medtem ko luščenje in glajenje korenin iz subgingivalnega predela odstrani oziroma značilno zmanjša količino bakterij *C. rectus* (Slots, 2004), *P. gingivalis*, *P. intermedia* in *T. forsythensis* (Shiloah in sod., 1998), nima značilnega vpliva na količino *A. actinomycetemcomitans* (Slots, 2004) in *P. micros* (Rams in sod., 1992). Kljub temu, da z luščenjem in glajenjem iz subgingivalnega predela ne odstranimo vseh za obzobna tkiva patogenih bakterij, je standardni protokol zdravljenja parodontitisa (Skalerič in Gašperčič, 2005) uspešen pri večini pacientov (Cvetko in Skalerič, 2008).

Pri nekaterih pacientih standardni protokol zdravljenja ne prepreči nadaljnje razgradnje obzobnih tkiv. Odziv posameznika na luščenje in glajenje korenin je poleg bakterijske sestave biofilma in gostiteljevega imunskega odgovora odvisen tudi od oblike parodontitisa, obsega razgradnje obzobnih tkiv in lokalnih anatomskih dejavnikov (Mombelli, 2008). Vzrok za neuspešen izid mehanskega zdravljenja je lahko tudi prisotnost parodontopatogenih bakterij na ustni sluznici, hrbtišču jezika in nebnicah, od koder lahko ponovno naselijo predhodno ozdravljena mesta (Mombelli in sod., 1994; Quirynen in sod., 2001). Omejitve mehanskega zdravljenja in neustrezen imunski odziv gostitelja so vzrok, da pri nekaterih pacientih s parodontitisom kljub standardnemu protokolu zdravljenja in rednim kontrolnim pregledom razgradnja obzobnih tkiv napreduje

(Haffajee in sod., 1997; Rosling in sod., 2001). Dejstvo, da je parodontitis okužba s specifičnimi bakterijami, pri teh pacientih utemeljuje vključitev sistemskega antibiotičnega zdravljenja v standardni protokol zdravljenja (Cvetko in Skalerič, 2008).

2.9.2 Antibiotično zdravljenje

Antibiotično zdravljenje ni rutinski del parodontalnega zdravljenja in je glede na sodobna spoznanja utemeljeno (Slots, 2004):

- pri pacientih z agresivnim parodontitisom
- pri pacientih z akutno okužbo obzobnih tkiv (nekrotizirajoča parodontalna bolezen, parodontalni absces)
- pri nekaterih pacientih z oslABLjenim imunskim odzivom
- pri pacientih s kroničnim parodontitisom samo v primeru, če so izčrpane vse možnosti začetnega in kirurškega zdravljenja.

Antibiotike lahko dovajamo lokalno ali po sistemski poti. Z lokalnim dovajanjem antibiotikov uspešno odstranimo mikroorganizme, ki so prisotni na omejenem številu mest (pri lokalizirani oblika parodontitisa), vendar z njimi ni mogoče odstraniti parodontopatogenih bakterij, ki so prisotne na ustni sluznici (Slots, 2004; Bidault in sod., 2007). Pri razširjeni obliki parodontitisa je ustrežnejši način zdravljenja sistemsko dovajanje antibiotikov. Ti prodirajo v obzobna tkiva in obzobne žepe iz seruma in lahko dosežejo mikroorganizme na mestih, ki so nedostopna za luščenje in glajenje kot tudi za lokalno dovajanje antibiotikov. Sistemski antibiotiki odstranijo oziroma zmanjšajo število parodontopatogenih bakterij s hrbtišča jezika, nebnic in preostale ustne sluznice, kar zmanjša tveganje za ponovno okužbo obzobnih tkiv (Slots, 2004). Pomanjkljivost sistemskih antibiotikov je možnost pojava neželenih stranskih učinkov, razvoj odpornih vrst mikroorganizmov, pojav oportunističnih glivičnih okužb in preobčutljivostni odzivi (Walker, 1996). S sistemskim vnosom antibiotikov ni mogoče odstraniti bakterij v subgingivalnem biofilmu, zato niso nadomestilo za natančno luščenje in glajenje zobnih korenin (Haffajee, 2006; Momelli, 2006).

Antibiotično zdravljenje se je izkazalo za uspešno in je priporočeno pri pacientih, pri katerih je v bakterijskem biofilmu povečana količina bakterije *A. actinomycetemcomitans* (Mombelli, 2008), ki je prisotna na površini sluznice ustne votline (Mombelli in sod., 1994), prodira v mehka tkiva (Meyer in sod., 1996), po mehanskem zdravljenju pa lahko ponovno hitro naseli obzobne žepe (van Winkelhoff in sod., 1992).

Antibiotiki, ki so trenutno priporočeni za zdravljenje parodontitisa, so β -laktamski antibiotiki (amoksicilin s klavulansko kislino ali brez nje), metronidazol, tetraciklini, klindamicin, cefuroksimaksetil in ciprofloksacin. β -laktamski antibiotiki so širokospektralni in dobro prodirajo v tkiva. V gingivalni tekočini dosežejo relativno nizke koncentracije (Bidault in sod., 2007). Metronidazol ima ozek spekter aktivnosti in je usmerjen predvsem proti izključno anaerobnim bakterijam. Dobro prodira v dlesen in dosega relativno visoke koncentracije v gingivalni tekočini. Učinkuje na naslednje bakterijske vrste: *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *P. intermedia*, treponeme, spirohete in druge izključno anaerobne bakterije. Tetraciklini učinkovito odstranijo *A. actinomycetemcomitans* (Sakellari in sod., 2000). S svojo protikolagenazno aktivnostjo zmanjšajo tkivno poškodbo in razgradnjo kosti (Sapadin in Fleischmajer, 2006). Klindamicin učinkovito odstrani peptostreptokoke, β -hemolitične streptokoke in mnoge gramnegativne anaerobne bacile, ne pa *A. actinomycetemcomitans* (Walker in Gordon, 1990). Zaradi tveganja za razmnožitev *Clostridium difficile*, ki povzroči psevdomembranozni kolitis, svetujejo previdno uporabo klindamicina (Slots, 2004). Ciprofloksacin je učinkovit proti mnogim za obzobna tkiva patogenim bakterijam, vključno z *A. actinomycetemcomitans*. Dobro prodira v obzobna tkiva in gingivalno tekočino, v kateri lahko doseže višje koncentracije kot v serumu (Slots in Rams, 1990; Slots, 2004).

Ker so v obzobnih žepih prisotne raznovrstne parodontopatogene bakterije, se je pri zdravljenju parodontitisa izkazala za najuspešnejšo kombinacija dveh antibiotikov (Slots, 2002; Slots in Ting, 2002). Prednost je v širšem spektru aktivnosti in sinergističnem delovanju (Pavčić in sod., 1992). Prvi izbor je kombinacija metronidazola in amoksicilina, saj najuspešneje prepreči razmnoževanje *A. actinomycetemcomitans* (Berglundh in sod., 1998; Herrera in sod., 2002; Haffajee in sod., 2003; Guerrero in sod., 2005). Pri

preobčutljivosti na amoksicilin zamenjamo amoksicilin s ciprofloksacinom ali cefuroksimaksetilom (Cvetko in Skalerič, 2008).

V primeru, da antibiotično zdravljenje ni uspešno, izberemo antibiotik glede na mikrobiološko analizo vzorca, odvzetega s prizadetih mest, in pacientu predpišemo specifično prilagojeno zdravljenje na osnovi antibiograma (Mombelli in sod., 1994; Slots, 2004).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Za ugotavljanje protimikrobnega učinka smo v okviru diplomskega dela uporabili 7 različnih vrst slovenskega medu: kostanjev (*Castanea sativa*), hojev (*Abies alba*), cvetlični (mešanega izvora), lipov (*Tilia platyphyllos*), gozdni (mešanega izvora), repični (*Brassica napus*), akacijev (*Robinia pseudoacacia*) ter novozelandski med manuka UMF 10 (*Leptospermum scoparium*). Slovenske vrste medu smo pridobili od Čebelarstva Božnar, med pa je bil nabran eno sezono preden smo začeli z raziskavo (leta 2009). Zaradi lažjega točenja in filtriranja je bil segret do 35 °C in skladiščen pri sobni temperaturi. Bakterijske izolate, ki smo jih testirali, smo pridobili iz zbirke Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. V raziskavo smo vključili naslednje bakterijske izolate:

- 7 kliničnih izolatov parodontopatogenih bakterij (*P. intermedia*, *P. oris*, *P. veroralis*, *P. buccalis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*)
- referenčni izolat *P. gingivalis* ATCC 33277
- referenčni izolat *E. corrodens* ATCC 23834
- klinični izolat vrste rodu *Capnocytophaga*
- klinični izolat vrste rodu *Bacteroides*
- 3 klinične izolate ustnih streptokokov (*S. salivarius*, *S. oralis* in *S. sanguis*)
- ter 2 referenčna izolata *S. mutans* (*S. mutans* ATCC 35668, *S. mutans* ATCC 25175).

V diplomski nalogi smo uporabili naslednja gojišča:

- transportno gojišče za anaerobe
- obogateno tioglikolatno gojišče
- agar po Schaedlerju za izolacijo anaerobnih bakterij
- KVLB z zmanjšano koncentracijo vankomicina za izolacijo bakterijskih vrst iz rodov *Prevotella* in *Porphyromonas*
- Denta-1 za izolacijo bakterije *A. actinomycetemcomitans*
- krvni agar (KA).

3.2 METODE

3.2.1 Določanje koncentracije mikrobne suspenzije

Iz kulture bakterijskega seva *P. intermedia* smo pripravili 10-kratne serijske razredčine v fiziološki raztopini. V epruveto z 2 ml 0,85 % raztopine NaCl (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija) smo z 10 µl bakteriološko zanko dodali 48 urno kulturo *P. intermedia*, da smo dosegli gostoto 0,5 McFarland (McF). Gostoto smo izmerili z nefelometrom (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija). Vsebino epruvete smo dobro premešali in s pipeto odpipetirali 200 µl suspenzije v epruveto z 1,8 ml fiziološke raztopine. Novo suspenzijo smo ponovno dobro premešali, zgoraj opisani postopek smo ponavljali, dokler nismo dosegli zelenih razredčitev. Nato smo iz vsake epruvete z razredčinami od 10^{-1} do 10^{-8} odpipetirali 200 µl in jih inokulirali na plošče z gojiščem po Schaedlerju. Inokulum smo s sterilno hokejko razmazali enakomerno po površini gojišča in plošče inkubirali anaerobno 48 ur pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo prešteli porasle kolonije na števni ploščah (plošče, na katerih je zraslo 30 – 300 kolonij). Vsaka porasla kolonija na trdem gojišču je predstavljala 1 CFU (ang. colony forming units). Z redčenjem mikrobne suspenzije smo dosegli koncentracijo 1×10^5 CFU/ml.

3.2.2 Agar difuzijska metoda

Protibakterijsko učinkovitost kostanjevega, hojevega, cvetličnega, lipovega, gozdnega, repičnega, akacijevega in medu manuka smo ugotavljali z agar difuzijsko metodo. Za vsako vrsto medu smo ločeno pripravili serijske razredčine v fiziološki raztopini od 100 do 10 % (v/v). V epruveto z 2 ml 0,85 % raztopine NaCl (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija) smo odpipetirali 2 ml nerazredčenega medu, da smo dobili 50 % razredčino medu. Vsebino epruvete smo dobro premešali in s pipeto odpipetirali 2 ml 50 % medu v epruveto z 2 ml fiziološke raztopine, da smo dobili 25 % razredčino medu. Novo suspenzijo smo ponovno dobro premešali in zgoraj opisani postopek ponovili, da smo dosegli 12,5 % razredčino medu. Nazadnje smo v epruveto z 0,4 ml fiziološke raztopine odpipetirali 1,6 ml 12,5 % medu, da smo dobili 10 % razredčino medu.

Iz kultur bakterijskih sevov gostote 0,5 McFarland (McF) smo pripravili 10-kratne razredčine v fiziološki raztopini. Iz epruvtok z 10-kratnimi razredčinami smo odpipetirali 100 μL in jih inokulirali na agar po Schaedlerju oziroma krvni agar (KA). Na plošče smo nanašali 10^5 CFU/ml. Inokulum smo s sterilno hokejko razmazali enakomerno po površini gojišča. Potem smo v agar s pomočjo steriliziranega plutovrta izvrtali luknje premera 8 mm. V posamezno luknjico smo dodali 100 μL posamezne razredčine ustreznega vzorca medu, kot negativno kontrolo pa smo uporabili fiziološko raztopino. Po inkubaciji smo izmerili premer inhibicijskih con. Ustne streptokoke smo inkubirali pri 37°C v atmosferi z dodanim 5 % CO_2 , premer inhibicijskih con smo odčitavali po 24 urah. Vse ostale bakterijske vrste smo inkubirali v anaerobnih razmerah pri 37°C . Premer inhibicijskih con smo odčitavali po 48 urah, pri *P. gingivalis* pa po 92 urah. Vse meritve smo opravili v štirih ponovitvah.

3.2.3 Statistična analiza

Za posamezen bakterijski izolat smo pri določeni vrsti medu izračunali najpomembnejši vzorčni statistiki, in sicer vzorčno aritmetično sredino in vzorčni standardni odklon. Za nadaljnje statistično sklepanje smo izvedli statistično analizo s t-testom za dva neodvisna vzorca. Na podlagi grafikonov za posamezne bakterijske izolate smo analizirali razliko povprečnih premerov inhibicijskih con pri po dveh različnih vrstah nerazredčenega medu. Opredelili smo dve statistični domnevi, in sicer ničelno domnevo H_0 ter dvostransko alternativno domnevo H_1 . Ničelna domneva pravi, da je povprečni premer inhibicijskih con pri dveh izbranih vrstah medu enak oziroma da je razlika povprečij inhibicijskih con pri dveh različnih vrstah medu enaka nič pri istem bakterijskem izolatu. Alternativna domneva H_1 pravi, da je povprečni premer inhibicijskih con določenega izolata pri dveh različnih vrstah medu različen oziroma da razlika povprečij inhibicijskih con pri dveh različnih vrstah medu ni enaka nič pri istem bakterijskem izolatu.

$H_0: \delta = \mu_1 - \mu_2 = \delta_0 = 0$ Razlika povprečij je 0.

$H_1: \delta = \mu_1 - \mu_2 \neq \delta_0 \neq 0$ Razlika povprečij ni 0.

Pred izvedbo testa smo za posamezni vrsti medu izračunali še obe vzorčni varianci s_1^2 in s_2^2 .

Če velja:

$$\frac{\max(s_1^2, s_2^2)}{\min(s_1^2, s_2^2)} < 2, \quad \dots(1)$$

smo privzeli, da je varianca pri obeh vrstah medu enaka. V tem primeru je pripadajoča t-statistika

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{s_{sk}^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}, \quad \dots(2)$$

pri čemer je s_{sk}^2 skupna varianca, ki je aritmetična sredina obeh vzorčnih varianc. Če se je izkazalo, da predpostavka o enakih variancah ni sprejemljiva, smo uporabili posplošeno t-statistiko

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}, \quad \dots(3)$$

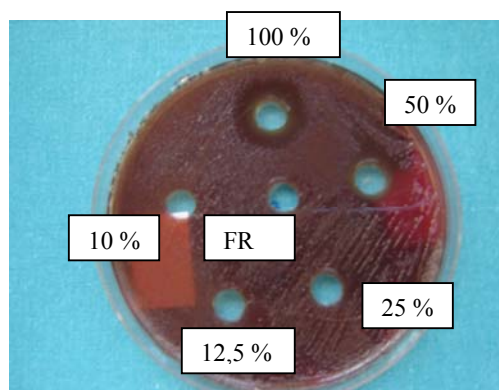
ki upošteva obe vzorčni varianci. Za stopnjo značilnosti α smo izbrali vrednost 0,05 ter za kombinacije po dveh različnih vrst medu nato izračunali testno statistiko ter pripadajočo p-vrednost (Košmelj, 2007).

4 REZULTATI

4.1 PROTIBAKTERIJSKI UČINEK RAZLIČNIH VRST MEDU NA PARODONTOPATOGENE BAKTERIJE

V raziskavi smo testirali protibakterijsko učinkovitost kostanjevega, hojevega, cvetličnega, lipovega, gozdnega, repičnega, akacijevega in medu manuka na parodontopatogene bakterije pri koncentracijah medu 100, 50, 25, 12,5 in 10 %. Preglednice 3 - 17 prikazujejo razpon inhibicijskih con v milimetrih, ki smo ga izmerili pri posameznih izolatih parodontopatogenih bakterij pri določeni vrsti in koncentraciji medu, izračunano povprečje premera inhibicijskih con ter standardni odklon za vse meritve. Pri izolatih *P. oris*, izolatu rodu *Bacteroides* in *F. nucleatum* smo opazili inhibicijske cone le pri inkubaciji z nerazredčenim (100 %) medom. Pri izolatih *P. intermedia* (Slika 4), *P. veroralis*, *P. buccalis*, *P. gingivalis*, *P. gingivalis* ATCC 33277, *E. corrodens* ATCC 23834 in izolatu rodu *Capnocytophaga* smo opazili inhibicijske cone pri 100 % medu in pri nekaterih vrstah medu v 50 % koncentraciji. Pri izolatu *A. actinomycetemcomitans* so bile učinkovite vse vrste medu v 50 % koncentraciji in tudi nekatere vrste medu v 25 % koncentraciji. Pri nižjih koncentracijah medu (12,5 in 10 %) inhibitornega učinka na rast parodontopatogenih bakterij nismo več opazili.

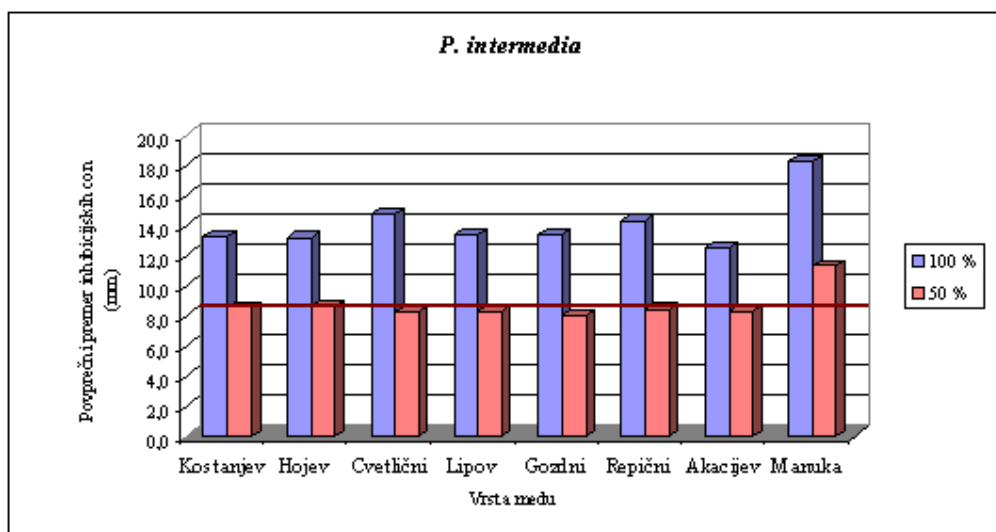
Za vsak posamezen bakterijski izolat smo izrisali grafikone, ki prikazujejo povprečni premer inhibicijskih con v odvisnosti od vrste in koncentracije medu.



Slika 4: Testiranje protibakterijske učinkovitosti medu manuka na klinični izolat *P. intermedia*
FR...Fiziološka raztopina

Preglednica 3: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *P. intermedia* pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>P. intermedia</i>	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje±Sd (mm)	13,3±1,15	13,2±0,90	14,8±1,39	13,4±0,84	13,4±1,79	14,3±1,54	12,5±1,37	18,3±1,17
Razpon (mm)	11,6-14,1	12,2-14,3	13,3-16,3	12,5-14,5	12,0-16,0	12,5-16,1	11,0-14,2	17,0-19,8

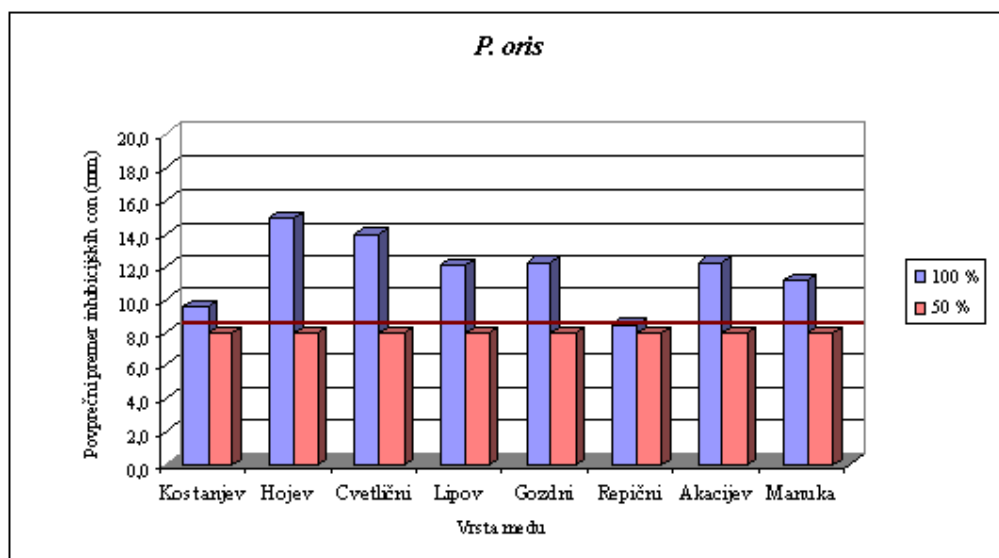


Slika 5: Povprečni premer inhibicijskih con pri *P. intermedia* v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Iz slike 5 je razvidno, da smo pri vseh nerazredčenih vrstah medu z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost proti izolat *P. intermedia*, s tem da je bila najboljša učinkovitost medu manuka. Med medom manuka in ostalimi vrstami medu obstaja statistično pomembna razlika v učinkovitosti ($t = 3,849$, $p < 0,05$). Najslabšo učinkovitost je imel akacijev med. Edino med vrste manuka je imel opazno protibakterijsko učinkovitost proti temu izolat *P. intermedia* tudi v 50 % koncentraciji.

Preglednica 4: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *P. oris* pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>P. oris</i>	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje ± Sd (mm)	9,6±0,50	14,9±1,18	14,0±1,41	12,1±2,21	12,2±2,04	8,5±0,90	12,2±1,53	11,2±1,05
Razpon (mm)	9,0-10,2	13,2-15,7	12,3-15,6	10,0-14,2	9,9-14,0	8,0-9,8	10,1-13,6	10,3-12,6

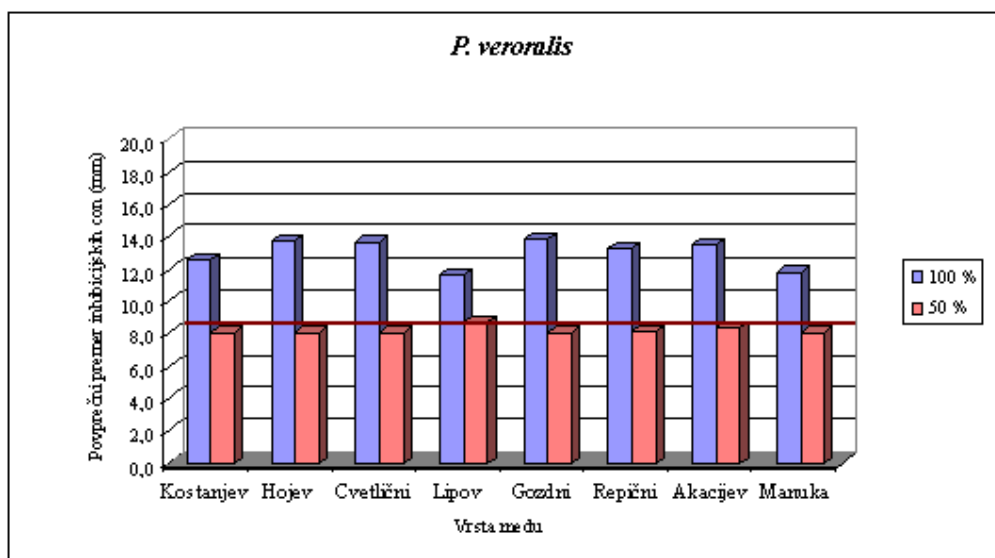


Slika 6: Povprečni premer inhibicijskih con pri *P. oris* v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Iz slike 6 je razvidno, da smo pri vseh vrstah nerazredčenega medu razen pri repičnem medu z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost proti izolatu *P. oris*, s tem da je bila najboljša učinkovitost hojevega medu. Med hojevim in kostanjevim, ter repičnim in medom manuka obstaja statistično pomembna razlika v protibakterijski učinkovitosti ($t = 4,686$, $p < 0,05$). Pri repičnem medu ni bilo opaziti protibakterijske učinkovitosti proti izolatu *P. oris*, kot tudi ne pri vseh ostalih vrstah medu v 50 % koncentraciji.

Preglednica 5: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *P. veroralis* pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>P. veroralis</i>	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje ± Sd (mm)	12,6±1,06	13,7±1,62	13,7±1,80	11,6±1,16	13,9±1,56	13,3±1,35	13,4±1,40	11,8±0,13
Razpon (mm)	11,6-14,0	12,2-16,0	12,1-16,0	10,6-13,1	12,2-15,4	12,0-15,0	11,6-15,0	11,6-11,9

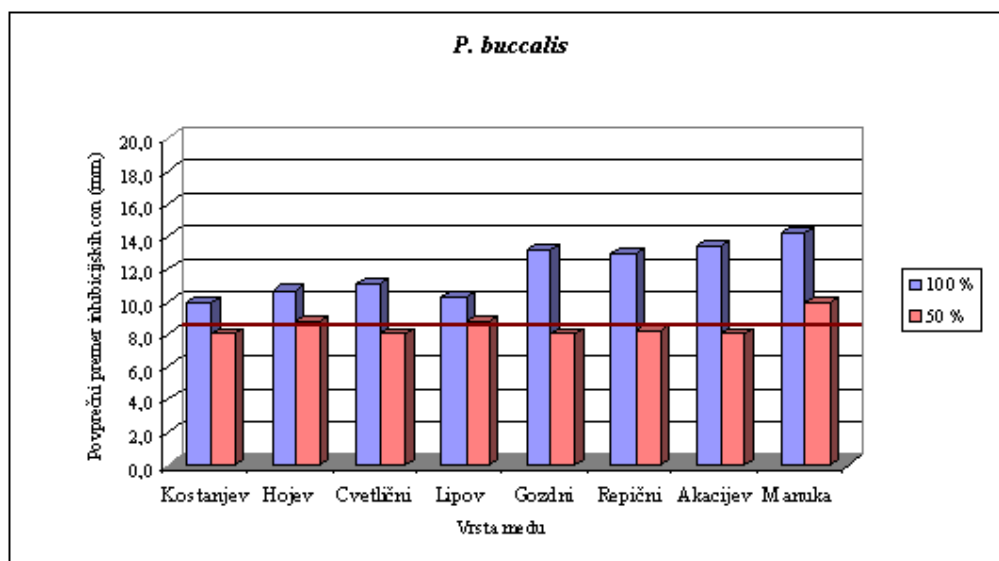


Slika 7: Povprečni premer inhibicijskih con pri *P. veroralis* v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Iz slike 7 je razvidno, da smo pri vseh vrstah nerazredčenega medu z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost proti izolat *P. veroralis*, s tem da je bila najboljša učinkovitost gozdnega medu. Med gozdnim medom in ostalimi vrstami medu sicer ni statistično pomembnih razlik v protibakterijski učinkovitosti ($t = 2,309$, $p > 0,05$). Najslabšo učinkovitost je imel lipov med. Razredčen med v 50 % koncentraciji ni več zavrnil rasti omenjenega izolata.

Preglednica 6: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *P. buccalis* pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>P. buccalis</i>	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje ± Sd (mm)	9,9 ± 0,43	10,7 ± 1,23	11,1 ± 0,79	10,3 ± 0,99	13,1 ± 1,63	12,9 ± 1,38	13,5 ± 1,68	14,2 ± 1,32
Razpon (mm)	9,4-10,4	9,6-12,0	10,4-12,2	9,4-11,7	11,4-15,0	11,7-14,9	11,9-15,0	13,2-16,1

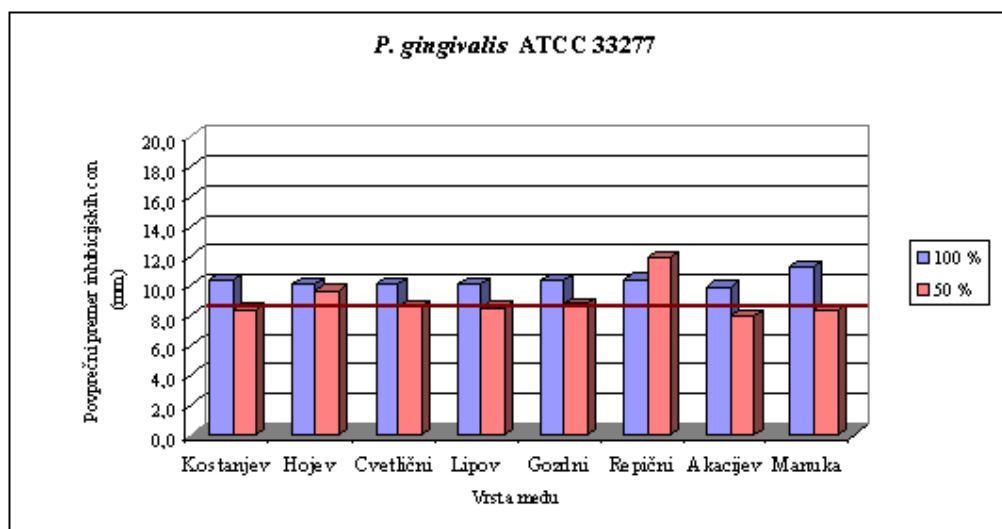


Slika 8: Povprečni premer inhibicijskih con pri *P. buccalis* v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Iz slike 8 je razvidno, da smo pri vseh vrstah nerazredčenega medu z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost proti izolatu *P. buccalis*, s tem da je bila najboljša učinkovitost medu manuka. Med medom manuka ter kostanjevim, hojevim, cvetličnim in lipovim medom obstaja statistično pomembna razlika v protibakterijski učinkovitosti ($t = 4,117$, $p < 0,05$). Najslabše učinkovit je bil kostanjev med. Edino med vrste manuka je imel opazno protibakterijsko učinkovitost proti temu izolatu tudi v 50 % koncentraciji.

Preglednica 7: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *P. gingivalis* ATCC 33277 pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje±Sd (mm)	10,3±0,61	10,1±0,73	10,1±1,16	10,1±0,79	10,4±0,96	10,4±1,33	9,9±0,38	11,3±2,19
Razpon (mm)	9,6-11,0	9,6-11,2	9,0-11,7	9,3-10,9	9,3-11,5	9,5-12,4	9,5-10,4	9,3-14,4

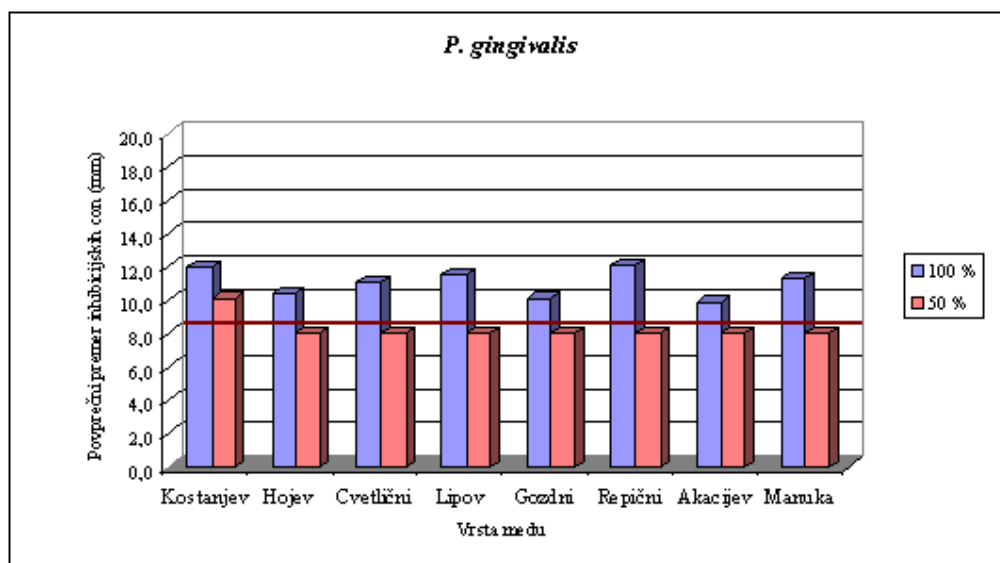


Slika 9: Povprečni premer inhibicijskih con pri *P. gingivalis* ATCC 33277 v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Iz slike 9 je razvidno, da smo pri vseh vrstah nerazredčenega medu z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost proti referenčnemu izolatu *P. gingivalis* ATCC 33277, s tem da je bila najboljša učinkovitost medu manuka. Ostale vrste medu so imele približno enako protibakterijsko učinkovitost in med njimi ni statistično pomembnih razlik ($t = 0,643$, $p > 0,05$). Opazno sicer majhno protibakterijsko učinkovitost proti omenjenemu izolatu sta imela tudi hojev in repični med v 50 % koncentraciji. Ugotovili smo celo, da je imela 50 % razredčina repičnega medu večjo protibakterijsko učinkovitost kot nerazredčen repični med ali med manuka, in sicer zaradi učinka vodikovega peroksida.

Preglednica 8: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *P. gingivalis* pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>P. gingivalis</i>	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje \pm Sd (mm)	12,1 \pm 1,13	10,4 \pm 0,68	11,1 \pm 0,39	11,5 \pm 1,34	10,1 \pm 0,56	12,1 \pm 1,96	9,9 \pm 1,63	11,4 \pm 1,26
Razpon (mm)	11,2-13,7	9,8-11,3	10,7-11,6	10,3-13,1	9,7-10,9	10,2-14,8	8,0-11,8	10,3-13,1

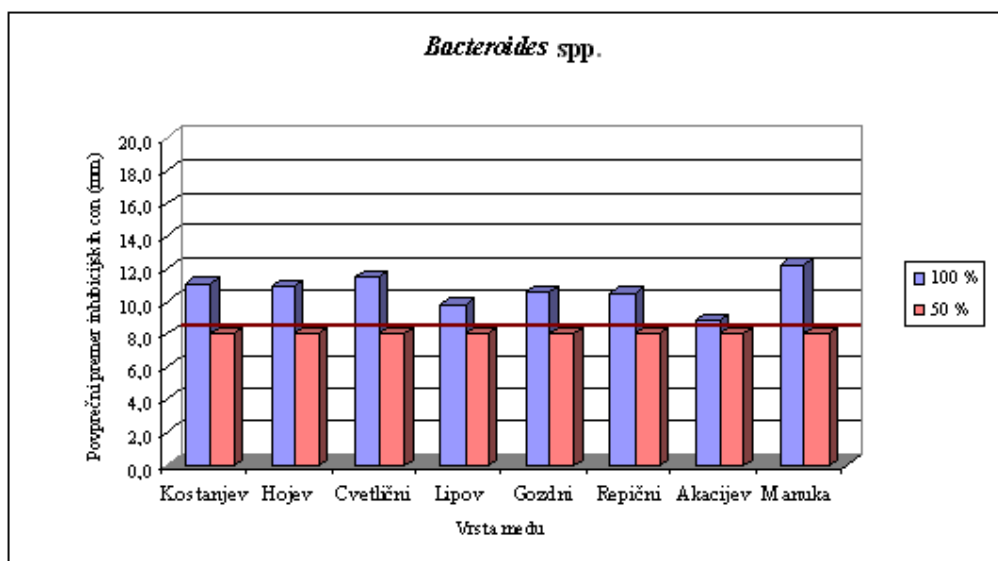


Slika 10: Povprečni premer inhibicijskih con pri *P. gingivalis* v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Iz slike 10 je razvidno, da smo pri vseh vrstah nerazredčenega medu z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost proti izolatu *P. gingivalis*, s tem da je bila najboljša učinkovitost kostanjevega in repičnega medu. Med posameznimi vrstami medu sicer ni statistično pomembnih razlik v protibakterijski učinkovitosti ($t = 2,173$, $p > 0,05$). Edino kostanjev med je imel opazno protibakterijsko učinkovitost proti *P. gingivalis* tudi v 50 % koncentraciji.

Preglednica 9: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri izolatu iz rodu *Bacteroides* pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>Bacteroides</i> spp.	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje ± Sd (mm)	11,1 ± 1,32	10,9 ± 0,40	11,4 ± 1,55	9,8 ± 1,01	10,6 ± 0,62	10,5 ± 0,47	8,9 ± 1,06	12,2 ± 1,09
Razpon (mm)	9,3-12,5	10,5-11,2	10,2-13,7	8,9-10,8	9,9-11,3	10,0-10,9	8,0-10,2	10,9-13,4

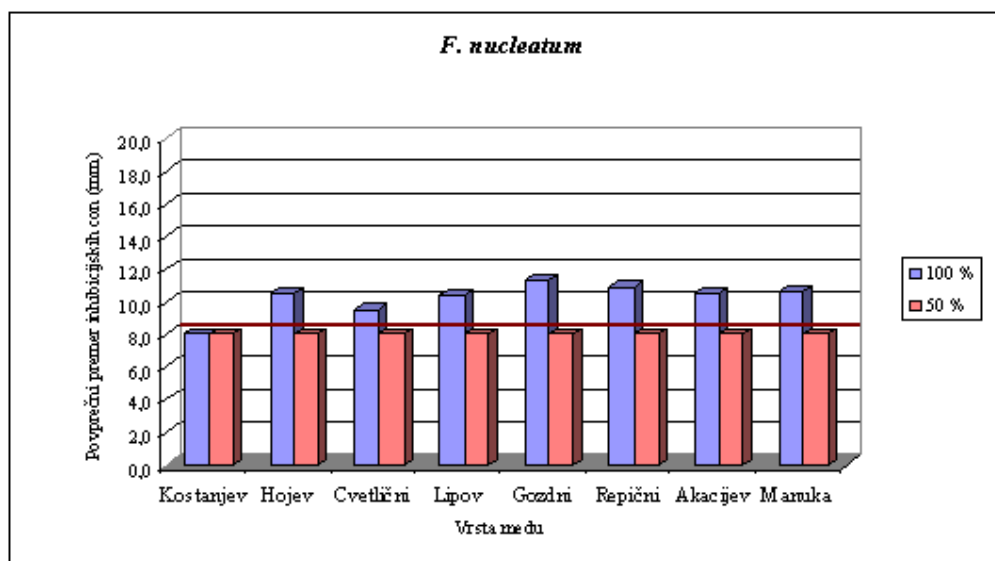


Slika 11: Povprečni premer inhibicijskih con pri izolatih rodu *Bacteroides* v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Iz slike 11 je razvidno, da smo pri vseh vrstah nerazredčenega medu razen pri akacijevem medu z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost proti izolat iz rodu *Bacteroides*, s tem da je bila najboljša učinkovitost medu manuka. Med medom manuka ter lipovim, gozdnim, repičnim in akacijevim medom obstaja statistično pomembna razlika v protibakterijski učinkovitosti ($t = 2,634$, $p < 0,05$). Pri akacijevem medu ni bilo opaziti protibakterijske učinkovitosti proti temu izolat, prav tako ne pri posameznih vrstah medu v 50 % koncentraciji.

Preglednica 10: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *F. nucleatum* pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>F. nucleatum</i>	Vrsta medu						
	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje ± Sd (mm)	10,5 ± 0,71	9,5 ± 0,32	10,4 ± 0,79	11,3 ± 1,29	10,9 ± 1,47	10,5 ± 1,32	10,6 ± 0,13
Razpon (mm)	9,5-11,0	9,3-10,0	9,5-11,3	10,2-13,0	9,8-13,0	9,1-11,9	10,4-10,7

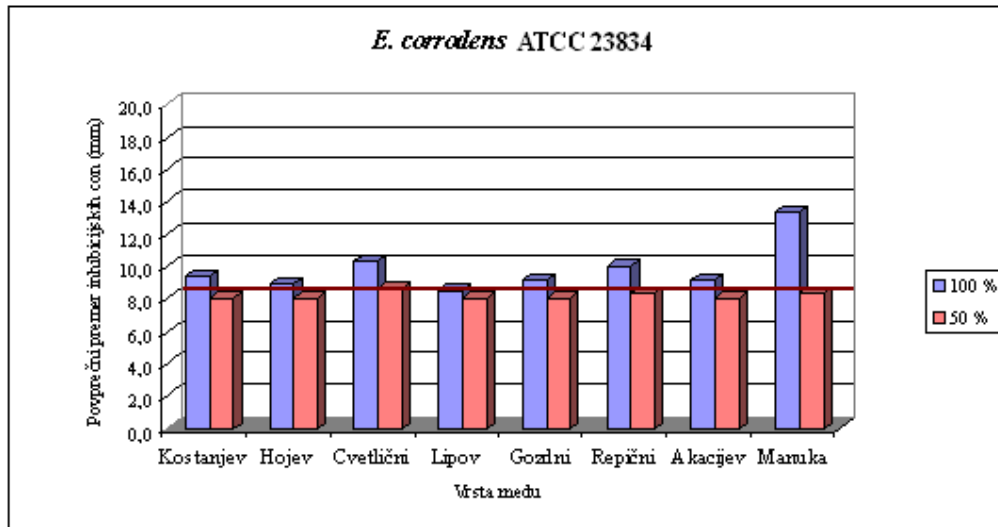


Slika 12: Povprečni premer inhibicijskih con pri *F. nucleatum* v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Slika 12 prikazuje, da so bile pri nerazredčenih vrstah medu inhibicijske cone pri izolatu *F. nucleatum* v primerjavi z učinkovitostjo medu pri predhodno omenjenih bakterijskih izolatih relativno majhne. Protibakterijsko najbolj učinkovit je bil gozdni med. Statistično pomembna razlika v protibakterijski učinkovitosti obstaja med gozdnim in kostanjevim medom ($t = 5,112$, $p < 0,05$). Pri kostanjevem medu namreč sploh ni bilo opaziti protibakterijske učinkovitosti proti izolatu *F. nucleatum*, kot tudi ne pri ostalih vrstah medu v 50 % koncentraciji.

Preglednica 11: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *E. corrodens* ATCC 23834 pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>E. corrodens</i> ATCC 23834	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje ± Sd (mm)	9,4±1,02	8,9±0,62	10,3±0,86	8,5±0,58	9,2±0,85	10,0±0,71	9,2±0,79	13,3±0,56
Razpon (mm)	8,0-10,3	8,0-9,4	9,7-11,6	8,0-9,0	8,0-10,0	9,0-10,6	8,0-9,7	12,5-13,7

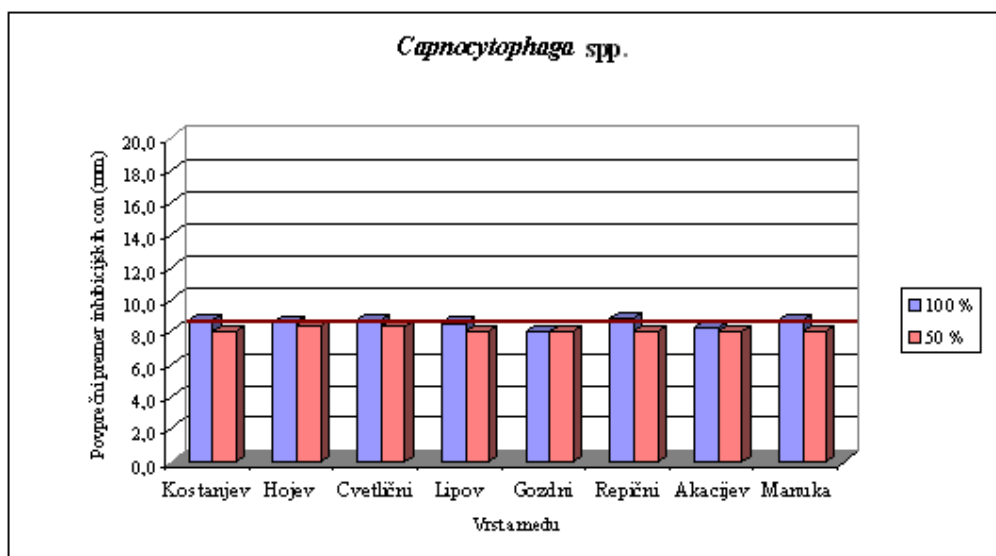


Slika 13: Povprečni premer inhibicijskih con pri *E. corrodens* ATCC 23834 v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Iz slike 13 je razvidno, da smo samo pri nerazredčenem medu manuka z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost proti izolatu *E. corrodens* ATCC 23834. Med medom manuka in ostalimi vrstami medu obstaja statistično pomembna razlika v protibakterijski učinkovitosti ($t = 5,851$, $p < 0,05$). Pri lipovem medu protibakterijske učinkovitosti nismo opazili, kot tudi ne pri posameznih vrstah medu v 50 % koncentraciji.

Preglednica 12: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri izolatu rodu *Capnocytophaga* pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>Capnocytophaga</i> spp.	Vrsta medu						
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje± Sd (mm)	8,7±0,79	8,6±0,80	8,7±0,91	8,6±0,64	8,8±0,98	8,3±0,50	8,8±0,90
Razpon (mm)	8,0-9,5	8,0-9,7	8,0-9,9	8,0-9,1	8,0-10,0	8,0-9,0	8,0-9,8

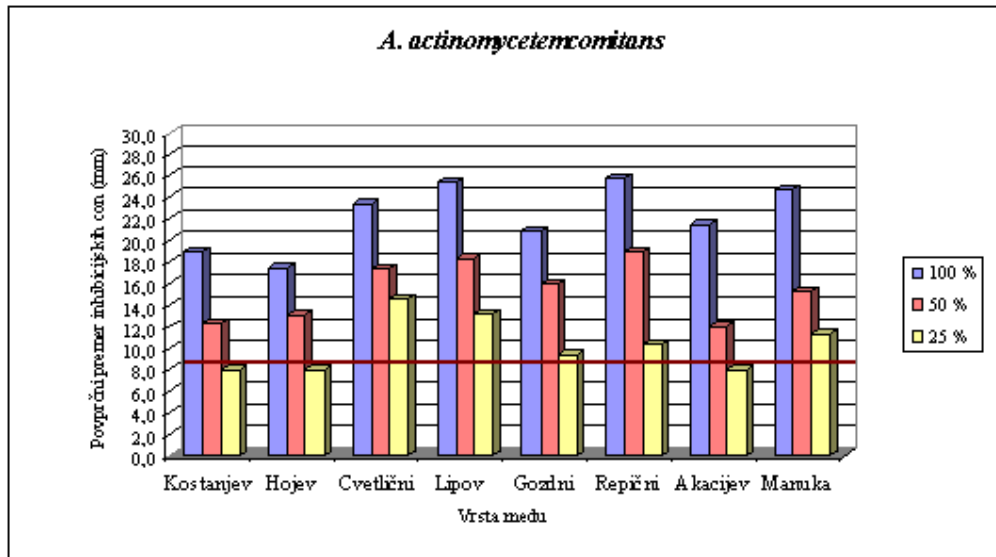


Slika 14: Povprečni premer inhibicijskih con pri izolatu rodu *Capnocytophaga* v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Iz slike 14 je razvidno, da nobena vrsta nerazredčenega medu ni imela protibakterijskega učinka proti kliničnemu izolatu iz rodu *Capnocytophaga*.

Preglednica 13: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *A. actinomycetemcomitans* pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>A. actino.</i>	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje± Sd (mm)	18,9±2,03	17,4±1,86	23,4±1,41	25,4±1,64	20,8±1,94	25,8±2,27	21,5±3,03	24,6±1,74
Razpon (mm)	17,1-21,6	15,9-19,8	21,3-24,3	23,3-27,1	18,1-22,7	23,6-28,6	18,0-25,0	22,3-26,5



Slika 15: Povprečni premer inhibicijskih con pri *A. actinomycetemcomitans* v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Slika 15 prikazuje, da so imele vse vrste nerazredčenega medu veliko protibakterijsko učinkovitost proti bakterijski vrsti *A. actinomycetemcomitans*. Z agar difuzijsko metodo smo ugotovili najboljšo učinkovitost repičnega medu. Med repičnim ter kostanjevim, hojevim in gozdnim medom obstaja statistično pomembna razlika v protibakterijski učinkovitosti ($t = 3,322$, $p < 0,05$). Najslabše učinkovit proti *A. actinomycetemcomitans* je bil hojev med. Protibakterijsko učinkovitost proti *A. actinomycetemcomitans* so imele tudi vse vrste medu v 50 % koncentraciji in celo cvetlični, lipov ter med manuka v 25 % koncentraciji.

4.2 PROTIBAKTERIJSKI UČINEK RAZLIČNIH VRST MEDU NA NEKATERE USTNE STREPTOKOKE

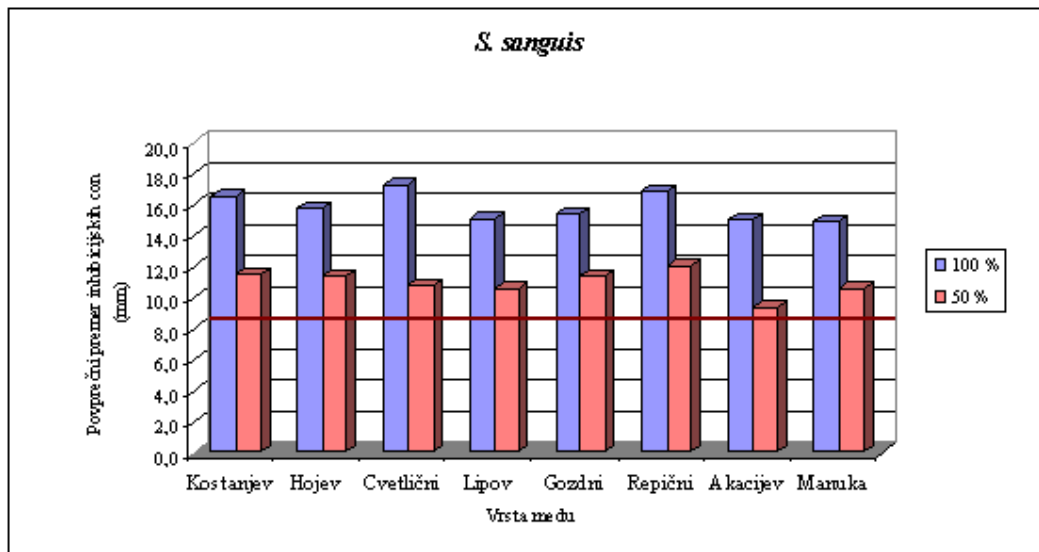
V raziskavi smo ugotavljali tudi protibakterijsko učinkovitost kostanjevega, hojevega, cvetličnega, lipovega, gozdnega, repičnega, akacijevega in medu manuka na ustne streptokoke pri koncentracijah medu 100, 50, 25, 12,5 in 10 %. Preglednice 14 - 17 prikazujejo razpon inhibicijskih con v milimetrih, ki smo jih izmerili pri posameznih izolatih ustnih streptokokov pri določeni vrsti in koncentraciji medu, izračunano povprečje premera inhibicijskih con ter standardni odklon za vse meritve. Inhibicijske cone smo

izmerili pri 100 in 50 % koncentraciji medu. Pri nižjih koncentracijah medu (25, 12,5 in 10 %) inhibitornega učinka na rast ustnih streptokokov nismo več opazili.

Za vsak posamezen izolat ustnih streptokokov smo izrisali grafikone, ki prikazujejo povprečni premer inhibicijskih con v odvisnosti od vrste in koncentracije medu.

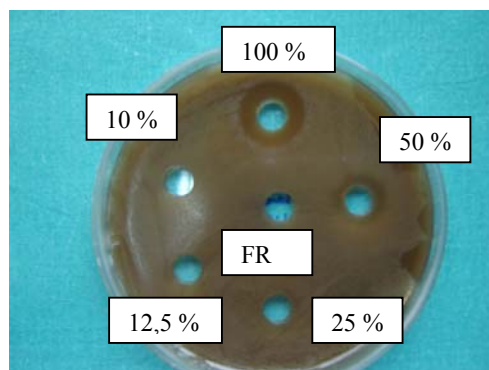
Preglednica 14: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *S. sanguis* pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>S. sanguis</i>	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje±Sd (mm)	16,6±1,65	15,7±0,98	17,3±1,21	15,2±0,82	15,5±0,56	16,9±0,80	15,1±0,45	14,9±0,59
Razpon (mm)	15,0-18,9	14,6-16,9	15,8-18,5	14,0-15,9	14,9-16,0	16,3-18,0	14,5-15,6	14,4-15,7



Slika 16: Povprečni premer inhibicijskih con pri *S. sanguis* v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

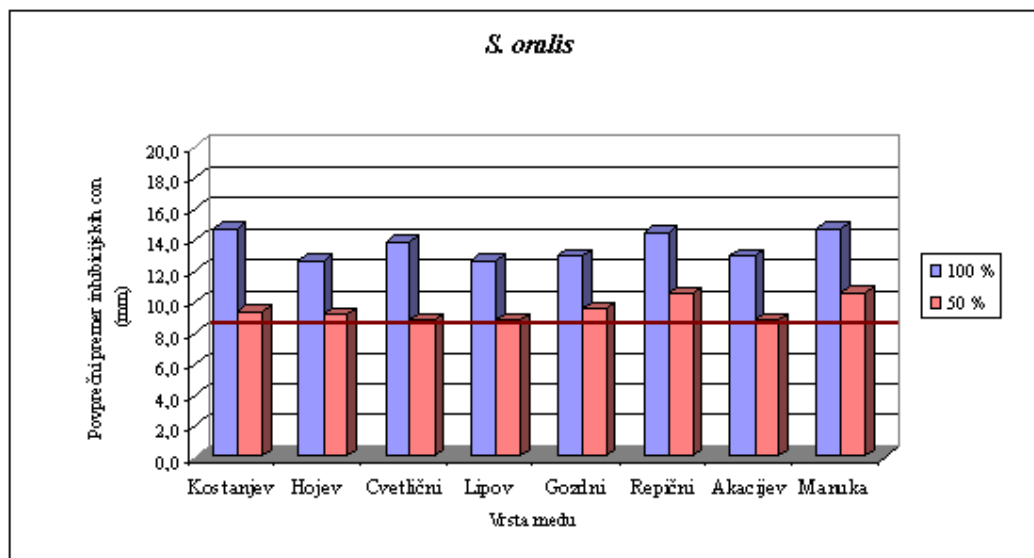
Iz slike 16 je razvidno, da smo pri vseh vrstah nerazredčenega medu z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost proti izolat *S. sanguis*, s tem da je bila najboljša učinkovitost cvetličnega medu. Kostanjev, hojev, cvetlični, gozdni in repični med so po učinkovitosti sicer precej izenačeni, tako da obstajajo statistično pomembne razlike samo med cvetličnim ter lipovim, akacijevim in medom manuka ($t = 2,863$, $p < 0,05$). Protibakterijsko učinkovitost proti *S. sanguis* so imele tudi vse vrste medu v 50 % koncentraciji (Slika 17), pri čemer je bil najslabše učinkovit akacijev med.



Slika 17: Testiranje protibakterijske učinkovitosti lipovega medu na klinični izolat *S. sanguis*
FR...Fiziološka raztopina

Preglednica 15: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *S. oralis* pri nerazredčenih vrstah medu

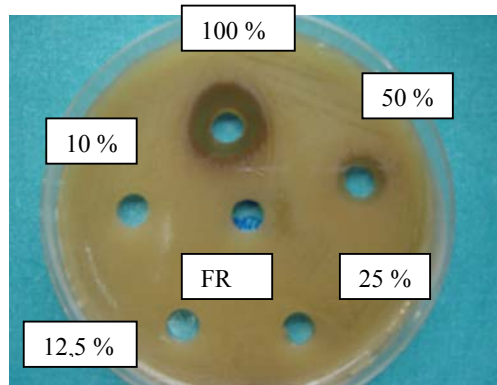
Inhibicijske cone pri <i>S. oralis</i>	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje± Sd (mm)	14,8±0,62	12,7±1,08	13,9±0,38	12,7±1,16	13,0±0,74	14,5±0,69	13,0±0,68	14,7±0,59
Razpon (mm)	14,1-15,5	11,5-13,8	13,5-14,4	11,0-13,6	12,0-13,7	13,5-15,0	12,3-13,9	13,9-15,2



Slika 18: Povprečni premer inhibicijskih con pri *S. oralis* v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Slika 18 prikazuje, da smo pri vseh vrstah nerazredčenega medu z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost proti izolat *S. oralis*, s tem da je bila najboljša učinkovitost kostanjevega medu (Slika 19). Po protibakterijski učinkovitosti sta izenačena

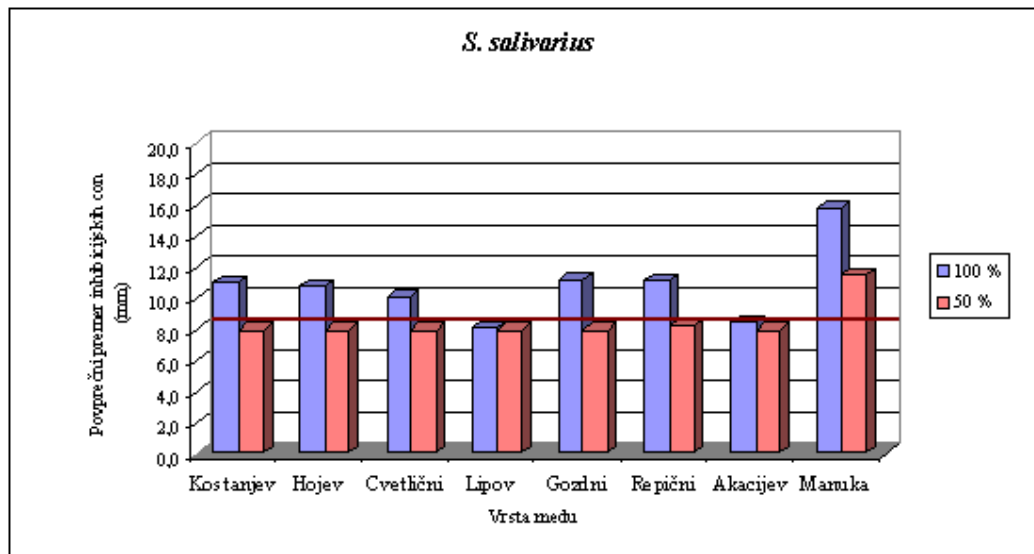
hojev in lipov med ter gozdni in akacijev med. Med kostanjevim in hojevim, lipovim, gozdnim in akacijevim medom obstaja statistično pomembna razlika v protibakterijski učinkovitosti ($t = 3,845$, $p < 0,05$). Opazno protibakterijsko učinkovitost proti *S. oralis* sta imela tudi repični in manuka med v 50 % koncentraciji.



Slika 19: Testiranje protibakterijske učinkovitosti kostanjevega medu na klinični izolat *S.oralis*
 FR...Fiziološka raztopina

Preglednica 16: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *S. salivarius* pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>S. salivarius</i>	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje± Sd (mm)	11,1±0,81	10,9±0,31	10,1±0,50	8,2±0,40	11,3±0,45	11,2±0,69	8,4±0,85	15,9±0,70
Razpon (mm)	10,0-11,8	10,4-11,1	9,6-10,8	8,0-8,8	10,9-11,9	10,6-12,0	8,0-9,7	15,2-16,5

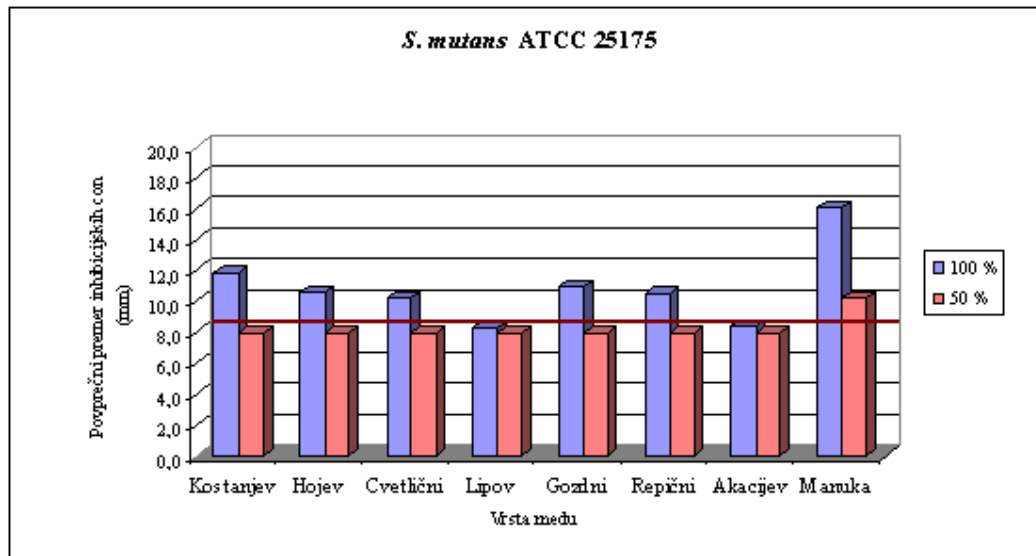


Slika 20: Povprečni premer inhibicijskih con pri *S. salivarius* v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Iz slike 20 je razvidno, da smo z agar difuzijsko metodo proti izolatu *S. salivarius* ugotovili protibakterijsko učinkovitost pri kostanjevem, hojevem, cvetličnem, gozdnem, repičnem in medu manuka, s tem da je bila najboljša učinkovitost medu manuka. Med medom manuka in ostalimi vrstami medu obstaja statistično pomembna razlika v protibakterijski učinkovitosti ($t = 11,049$, $p < 0,05$). Akacijev in lipov med sploh nista imela protibakterijskega učinka proti omenjenemu izolatu. Edino med manuka je imel opazno protibakterijsko učinkovitost proti *S. salivarius* tudi v 50 % koncentraciji.

Preglednica 17: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *S. mutans* ATCC 25175 pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>S. mutans</i> ATCC 25175	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje ± Sd (mm)	11,8±0,49	10,6±1,03	10,2±1,13	8,3±0,50	10,9±0,76	10,5±1,02	8,3±0,65	16,0±0,68
Razpon (mm)	11,4-12,4	9,7-12,0	9,0-11,7	8,0-9,0	10,0-11,6	9,9-12,0	8,0-9,3	15,3-16,6

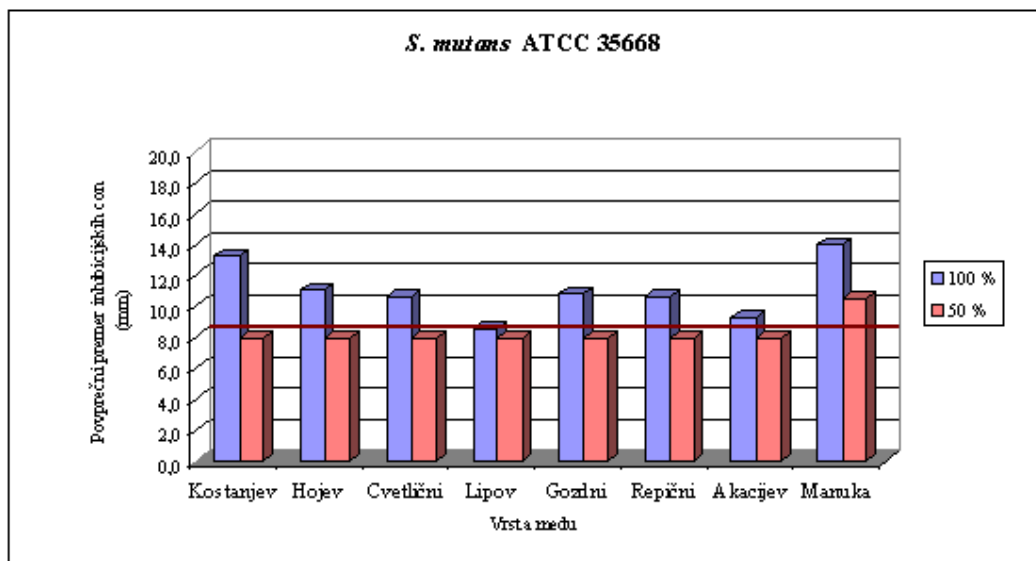


Slika 21: Povprečni premer inhibicijskih con pri *S. mutans* ATCC 25175 v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Iz slike 21 je razvidno, da smo proti referenčnemu izolatu *S. mutans* ATCC 25175 z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost pri kostanjevem, hojevem, cvetličnem, gozdnem, repičnem in medu manuka, s tem da je bila najboljša učinkovitost medu manuka. Med medom manuka in ostalimi vrstami medu obstaja statistično pomembna razlika v protibakterijski učinkovitosti ($t = 10,130$, $p < 0,05$). Akacijev in lipov med sploh nista imela protibakterijskega učinka proti omenjenemu izolatu. Edino med manuka je imel opazno protibakterijsko učinkovitost proti *S. mutans* ATCC 25175 tudi v 50 % koncentraciji.

Preglednica 18: Razpon inhibicijskih con (mm), povprečni premer inhibicijskih con (mm) ter standardni odklon za meritve pri *S. mutans* ATCC 35668 pri nerazredčenih vrstah medu

Inhibicijske cone pri <i>S. mutans</i> ATCC 35668	Vrsta medu							
	Kostanjev	Hojev	Cvetlični	Lipov	Gozdni	Repični	Akacijev	Med manuka
Povprečje± Sd (mm)	13,3±0,87	11,0±1,34	10,7±0,58	8,6±0,64	10,8±0,36	10,7±1,07	9,3±0,90	14,0±0,98
Razpon (mm)	12,0-13,9	9,7-12,3	10,0-11,4	8,0-9,1	10,4-11,3	9,4-12,0	8,0-10,1	13,2-15,4



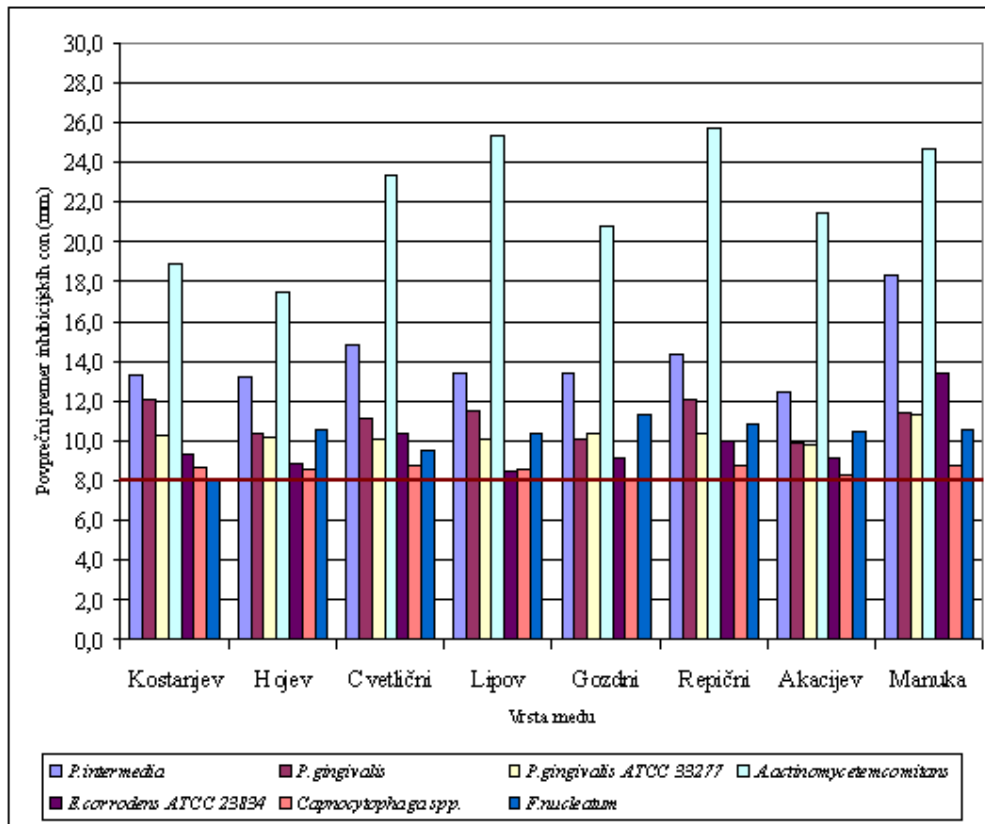
Slika 22: Povprečni premer inhibicijskih con pri *S. mutans* ATCC 35668 v odvisnosti od vrste in koncentracije medu

Slika 22 prikazuje, da smo pri vseh nerazredčenih vrstah medu razen pri lipovem medu z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost proti referenčnemu izolatu *S. mutans* ATCC 35668, s tem da je bila najboljša učinkovitost medu manuka. Med medom manuka in kostanjevim medom sicer ni statistično pomembne razlike v protibakterijski učinkovitosti, ta pa obstaja med medom manuka in vsemi ostalimi vrstami medu ($t = 3,620$, $p < 0,05$). Pri lipovem medu protibakterijske učinkovitosti proti *S. mutans* ATCC 35668 nismo opazili. Edino med manuka je imel opazno protibakterijsko učinkovitost proti omenjenemu izolatu tudi v 50 % koncentraciji.

4.3 PRIMERJAVA PROTIMIKROBNEGA UČINKA MEDU NA PARODONTOPATOGENE BAKTERIJE IN USTNE STREPTOKOKE

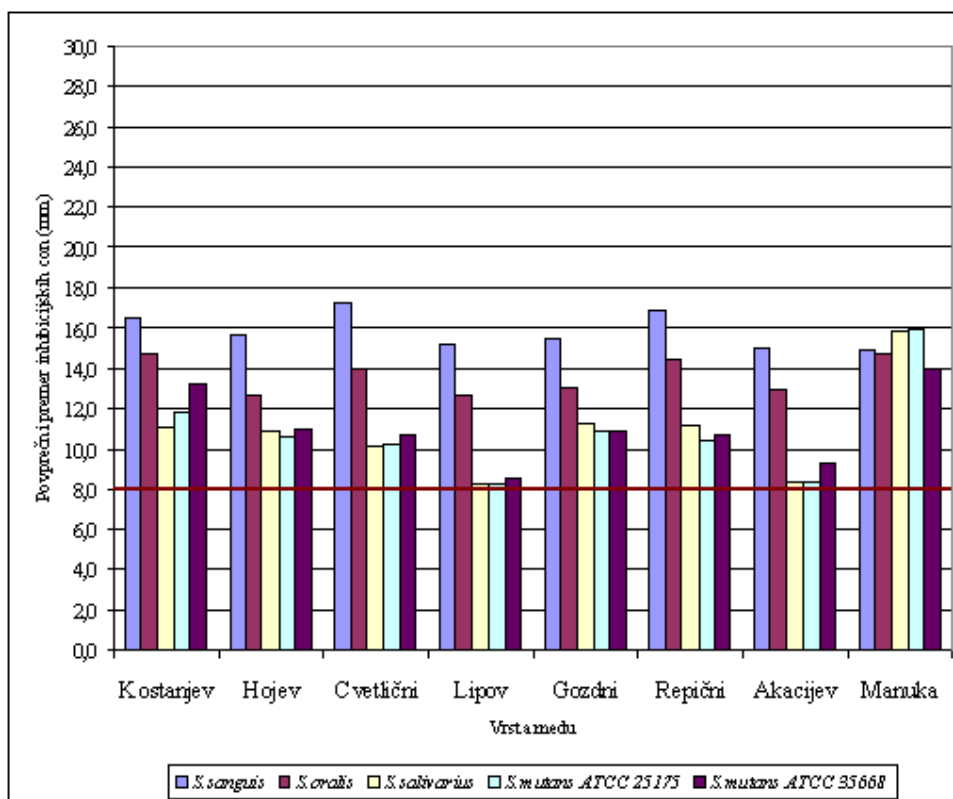
Sliki 23 in 24 prikazujeta primerjavo protimikrobnega učinka medu na parodontopatogene bakterije (Slika 23) in ustne streptokoke (Slika 24). Pri različnih vrstah medu smo opazili različno stopnjo protibakterijske učinkovitosti, ki pa ni odvisna samo od vrste medu, temveč predvsem od bakterijskega izolata, ki smo ga testirali. V primerjavi z ostalimi testiranimi izolati je med statistično značilno bolj učinkovito zaviral rast bakterijske vrste *A. actinomycetemcomitans*. Sledila je učinkovitost medu proti izolatu *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *P. gingivalis* ATCC 33277, *F. nucleatum* (z izjemo kostanjevega medu), *E.*

corrodens ATCC 23834 in *Capnocytophaga*, kjer je bila protibakterijska učinkovitost medu najslabša oziroma je ni bilo.



Slika 23: Povprečni premer inhibicijskih con pri najpomembnejših izolatih parodontopatogenih bakterij pri različnih vrstah nerazredčenega medu

Med ustnimi streptokoki so imele vse vrste medu najboljši učinek proti *S. sanguis*, sledila je učinkovitost medu proti izolatju *S. oralis*. Proti izolatju *S. salivarius*, *S. mutans* ATCC 25175 in *S. mutans* ATCC 35668 je imel najboljši učinek med manuka, učinek ostalih vrst medu pa je bil minimalen. Pri lipovem in akacijevem medu proti obema izolatoma *S. mutans* sploh nismo opazili protibakterijske učinkovitosti.



Slika 24: Povprečni premer inhibicijskih con izolatov ustnih streptokokov pri različnih vrstah medu

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Med je v ljudski medicini poznan že dolgo časa. Zaradi njegove velike energijske vrednosti in zdravilnih lastnosti so ga cenili in uporabljali že v davnih časih. Naši predniki so z opazovanjem in izkušnjami odkrili antiseptične, dietetične, krepčilne, pomirjevalne, odvajalne in diuretične lastnosti medu ter jih izkoriščali pri zdravljenju številnih bolezni (Mihelič, 1984). Uporaba medu je bila tako raznovrstna, da je vzbudila strokovnjake, da so rezultate ljudske medicine preverili tudi znanstveno. Sodobna medicina na novo odkriva in potrjuje učinek zdravljenja (apiterapije) in preprečevanja bolezni (apipreventive) s pomočjo čebeljih pridelkov, oživljeno zanimanje zanje med uporabniki vseh starosti in tudi v strokovnih zdravniških krogih pa dokazuje njihovo resnično uporabnost in vrednost.

V znanstveni literaturi lahko najdemo številne članke, ki dokazujejo, da je med protibakterijsko učinkovit proti aerobnim, anaerobnim, po Gramu pozitivnim, po Gramu negativnim bakterijam in glivam, vendar njegova klinična raba v vseh primerih še ni popolnoma opredeljena. Ker so *in vitro* študije pokazale, da med s srednjo protibakterijsko aktivnostjo že pri nizkih koncentracijah popolnoma ustavi rast najpomembnejših bakterijskih vrst, ki okužujejo rane, je postal med sestavni del oblog za sodobno oskrbo ran (Willix in sod., 1992; French in sod., 2005; Molan, 1998). Ker med uspešno celi rane kjer koli na telesu, ima tudi potencial pri zdravljenju ran oziroma razjed na ustni sluznici, poleg tega pa s svojim protibakterijskim delovanjem preprečuje okužbe v ustni votlini (Molan, 2001b).

Namen diplomske naloge je bil *in vitro* določiti protibakterijsko učinkovitost 7 različnih vrst slovenskega ter novozelandskega medu manuka proti najpogostejšim parodontopatogenim bakterijam in nekatere ustnim streptokokom. Pričakovali smo, da med, pridelan v Sloveniji, po svojih protibakterijskih lastnostih ne bo zaostajal za novozelandsko, že preizkušeno vrsto medu.

Za določanje protibakterijske učinkovitosti smo v raziskavi uporabili agar difuzijsko metodo, ki temelji na vnosu medu ali razredčine medu v luknjico v agarskem gojišču, ki ga predhodno inokuliramo z mikrobno kulturo. Med inkubacijo med iz začetne točke nanosa pronica v agar

in v okolici, kjer je njegova koncentracija še dovolj velika, prepreči rast bakterijske kulture. To vidimo kot čisto območje okrog luknjice v agarju (inhibicijska cona). Velikost (premer) inhibicijske cone je mera za protibakterijsko učinkovitost medu; če je premer inhibicijske cone večji, lahko sklepamo, da je učinek testiranega medu večji. Ko med difundira v agar, se razredči, zato je učinkovita protibakterijska koncentracija medu pri tej metodi vedno nižja od koncentracije medu, ki smo jo nanegli na agarso ploščo (Molan, 1992a).

Natančnejša metoda za določanje protibakterijske učinkovitosti je dilucijska metoda, pri kateri v tekoče gojišče z znano koncentracijo bakterij dodajamo različne razredčine učinkovine. S serijo različnih koncentracij medu po inkubacijskem času določimo, v kateri razredčini je medu še uspelo preprečiti rast bakterij. Ta razredčina se imenuje minimalna inhibitorna koncentracija. Čim večja je razredčina medu, ki še prepreči rast bakterij, tem večja je protibakterijska učinkovitost (Molan, 1992a). Če bi za ugotavljanje protibakterijske učinkovitosti uporabili dilucijsko metodo, bi lahko dobljene rezultate primerjali z rezultati drugih raziskav, vendar smo se zaradi enostavnejše tehnične izvedbe odločili za agar difuzijsko metodo.

Protibakterijsko delovanje medu je kombinacija različnih dejavnikov. Med najpomembnejšimi so: visoka vsebnost sladkorjev v medu, vsebnost encima glukozne oksidaze, kisel pH in prisotnost protibakterijskih komponent, ki izvirajo iz rastlin, na katerih čebele nabirajo med. Velik delež sladkorjev v medu ustvari hipertonične razmere in vodi v plazmolizo bakterijskih celic. Encim glukozna oksidaza oksidira glukozo, pri čemer nastane glukonska kislina, vzporeden produkt reakcije pa je vodikov peroksid. Nizke koncentracije H₂O₂ dajejo medu protibakterijske lastnosti. Pri nekaterih vrstah medu so za protibakterijsko delovanje odgovorne protimikrobne neperoksidne substance, povezane z rastlinskim izvorom medu. Poleg tega k protibakterijskemu delovanju medu prispeva tudi kisel pH medu, ki je neugoden za rast bakterijskih celic (Molan, 1992a; Molan, 1992b).

Santos in sodelavci (2002) so *in vitro* dokazali protibakterijsko učinkovitost propolisa proti 17 izolatoma *P. intermedia*/*P. nigrescens* ter proti referenčnima izolatoma *P. gingivalis* ATCC 33277 in *P. intermedia* ATCC 25611. Tudi Gebara in sodelavci (2002) so dokazali protibakterijsko učinkovitost alkoholnega ekstrakta propolisa proti referenčnim izolatoma parodontopatogenih bakterij *P. intermedia* ATCC 33563, *Prevotella melaninogenica* ATCC

25845, *P. gingivalis* ATCC 33277, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 in 29522, *Capnocytophaga gingivalis* ATCC 33624 in *F. nucleatum* ATCC 10953. Z našo raziskavo smo prvi ugotovili, da proti parodontopatogenim bakterijam protibakterijsko učinkuje tudi naravni med.

Pri vseh vrstah medu smo v naši raziskavi ugotovili največji protibakterijski učinek proti izolatu *A. actinomycetemcomitans*, saj smo tu izmerili skoraj dvakrat večji premer inhibicijskih con kot pri ostalih izolatih. Sledil je protimikrobni učinek proti izolatu *P. intermedia*. Pri vseh vrstah medu je bil sicer opazen protibakterijski učinek proti kliničnemu in referenčnemu izolatu *P. gingivalis*, vendar je bil znatno manjši kot pri prej naštetih vrstah. Proti *F. nucleatum* je bil opazen minimalen protibakterijski učinek pri vseh vrstah medu, razen pri kostanjevem, kjer učinka ni bilo. Proti *E. corrodens* je imel relativno dober protibakterijski učinek med manuka, medtem ko je bil učinek ostalih vrst medu minimalen. Med ustnimi streptokoki so imele vse vrste medu najboljši učinek proti *S. sanguis*, sledila je učinkovitost proti *S. oralis*. Lipov in akacijev med nista imela učinka proti obema izolatoma *S. mutans* in *S. salivarius*, učinek ostalih vrst medu z izjemo manuka medu pa je bil proti tem izolatoma le minimalen.

Ker smo testirali več kot samo eno vrsto medu, smo opazili statistično značilne razlike v protibakterijski učinkovitosti med posameznimi vrstami medu, kar je posledica različne količine vodikovega peroksida v medu ter različnih neperoksidnih faktorjev, ki so povezani z rastlinskim izvorom medu (Molan, 1992b). Ker so nekatere vrste medu bolj učinkovite od drugih, je pomembno, da med izberemo z veliko previdnostjo, kadar ga uporabljamo kot protibakterijsko sredstvo. Da bi natančneje ovrednotili protibakterijsko delovanje posamezne vrste medu, bi morali analizirati tudi fizikalno-kemične lastnosti ter aktivnost encima glukozne oksidaze pri vsaki posamezni vrsti medu.

Med manuka je pokazal najboljše protibakterijsko delovanje proti izolatoma *P. intermedia*, *P. buccalis*, *P. gingivalis*, izolatu rodu *Bacteroides*, *E. corrodens*, *S. salivarius* ter proti obema referenčnima izolatoma *S. mutans*. Edini med vsemi vrstami medu je bil manuka med tudi v 50 % koncentraciji učinkovit proti izolatoma *P. intermedia*, *P. buccalis*, *S. salivarius* ter proti obema izolatoma *S. mutans*. Visoka protibakterijska učinkovitost medu manuka je bila dokazana že večkrat, in sicer je bolj od ostalih vrst medu učinkovit tudi proti bakterijski vrsti

Helicobacter pylori (Al Somai in sod., 1994), enterokokom (Cooper in sod., 2002b) ter proti vrstama *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* (Willix in sod., 1992). Dokazali so tudi visoko protibakterijsko aktivnost medu manuka proti kariogenim bakterijskim vrstam *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* in *Lactobacillus casei*, poleg tega pa je bila pri teh vrstah ustavljena produkcija mlečne kisline in dekstrana (Molan, 2001b). English in sodelavci (2004) poročajo tudi o statistično značilnem zmanjšanju zobnega plaka in števila krvavečih mest po 21 dneh pri skupini, ki je trikrat na dan žvečila žele iz medu manuka, kar odpira nove možnosti za zdravljenje gingivitisa in parodontalne bolezni s pomočjo medu. Med manuka nabirajo čebele na cvetovih grma *Leptospermum scoparium*, ki raste na Novi Zelandiji. Poleg fizikalno-kemičnih lastnosti medu, ki prispevajo k njegovi protibakterijski učinkovitosti (visoka vsebnost sladkorjev, nizek pH) vsebuje med manuka še protibakterijske komponente, ki izvirajo iz rastline *Leptospermum* in so odgovorne za visoko neperoksidno aktivnost medu (Molan, 1992b). Glavna bioaktivna komponenta v medu manuka je metilglioksal (MGO), ki je v koncentraciji nad 150 mg/kg odgovoren za karakteristične protibakterijske lastnosti medu manuka ter še neidentificirana sinergistična komponenta, ki za več kot dvakrat poveča protibakterijsko učinkovitost MGO (Mavric in sod., 2008; Atrott in Henle, 2009). Kwakman in sodelavci (2010) so dokazali, da poleg sladkorja, vodikovega peroksida in metilglioksala na protibakterijsko aktivnost medu vpliva tudi protein defenzin-1, ki ga v med vnašajo čebele. V družino defenzinov spadajo mikrobicidni in citotoksični peptidi, ki so del čebeljega imunskega sistema, saj preprečujejo mikrobo kolonizacijo na površinah epiteljskih celic.

Proti izolatu *P. oris* je bil v naši raziskavi najučinkovitejši hojev med. Hojevec je imel opazno protibakterijsko delovanje tudi v 50 % koncentraciji proti izolatu *P. gingivalis* ATCC 33277. Proti izolatoma *P. veroralis* in *F. nucleatum* je bil najučinkovitejši gozdni med. Pri gozdnem medu gre za skupno poimenovanje, tako da lahko vsebuje mano bora, smreke, hoje, macesna pa tudi listno mano. Manovci so v primerjavi s cvetličnim medom temneje obarvani, imajo višjo kislinsko stopnjo, ki jih v večji meri varuje pred pregrevanjem, imajo znatno več rudninskih snovi, zlasti mangana, železa in kobalta, v njih pa je tudi več fruktoze, zaradi česar počasneje kristalizirajo. Na splošno imajo gozdne vrste medu višjo baktericidno vrednost od cvetličnih vrst (Rihar, 2003). Cvetlični med je v naši raziskavi pokazal najboljše protibakterijsko delovanje proti izolatu *S. sanguis*.

Najbolj učinkovita proti kliničnemu izolat *P. gingivalis* sta bila kostanjev in repični med. Kostanjev med je imel opazno protibakterijsko učinkovitost proti temu izolatu tudi v 50 % koncentraciji, najbolj učinkovit pa je bil tudi proti izolatu *S. oralis*. V nasprotju s tem protibakterijskega učinka proti *F. nucleatum* s kostanjevim medom nismo dosegli. Kralj Kunčič in sodelavci (2010) sicer poročajo o najboljši učinkovitosti kostanjevega medu proti bakterijskim vrstam, ki so najpogostejši povzročitelji okužb ran (*S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*). Kostanjev med je v tekočem stanju rdečkastorjave barve, temna barva medu pa je povezana z večjo antioksidativno aktivnostjo medu (Frankel, 1998).

Repični med je imel najboljšo učinkovitost tudi proti izolatu *A. actinomycetemcomitans*. Proti izolatoma *P. gingivalis* ATCC 33277 in *S. oralis* je bil učinkovit tudi v 50 % koncentraciji. Pri referenčnem izolatu *P. gingivalis* ATCC 33277 smo opazili celo večjo protibakterijsko učinkovitost 50 % razredčine repičnega medu v primerjavi z nerazredčenim repičnim medom. To pomeni, da je učinek vodikovega peroksida, ki se je tvoril v razredčenem medu, presegel učinek osmolarnosti zaradi visoke vsebnosti sladkorjev v nerazredčenem medu. Možno je, da je repični med vseboval manjše količine katalaze, zaradi česar se ni razgradila večja količina vodikovega peroksida, to pa je povečalo protibakterijski učinek ali da repični med vsebuje še druge neperoksidne protibakterijske komponente. O najboljši učinkovitosti repičnega medu proti izolatu *S. aureus* poroča tudi Bogdanov (2008).

V raziskavi smo *in vitro* dokazali protibakterijsko delovanje medu proti parodontopatogenim bakterijam. Ker med torej lahko odstranjuje pomembne etiološke dejavnike bolezni, preprečuje direktni vzrok za erozijo povezovalnih tkiv in kosti pri parodontalni bolezni, deluje protivnetno in ima pomembno vlogo pri pospeševanju rasti tkiva, so nakazane dobre možnosti za uporabo medu pri zdravljenju parodontalne bolezni, kar bo treba potrditi tudi s kliničnimi raziskavami.

5.2 SKLEPI

- *In vitro* smo z agar difuzijsko metodo ugotovili protibakterijsko učinkovitost vseh testiranih slovenskih vrst medu in medu manuka proti večini testiranih izolatov parodontopatogenih bakterij in ustnih streptokokov.
- Vse vrste medu so imele največji protibakterijski učinek proti izolatu *A. actinomycetemcomitans*, sledil je učinek proti vrsti *P. intermedia*.
- Protibakterijski učinek proti vrsti *P. gingivalis* je bil opazen pri vseh vrstah medu, vendar je bil znatno manjši kot pri prej naštetih vrstah. Proti *F. nucleatum* smo ugotovili minimalen protibakterijski učinek vseh vrst medu, razen kostanjevega. Proti *E. corrodens* je imel relativno dober protibakterijski učinek le med manuka.
- Med ustnimi streptokoki so imele vse vrste medu najboljši učinek proti izolatu *S. sanguis*, sledila je učinkovitost medu proti izolatu *S. oralis*. Proti izolatoma *S. salivarius* in *S. mutans* je imel najboljši učinek med manuka, medtem ko je bil učinek ostalih vrst medu minimalen.
- Proti izolatoma *P. intermedia*, *P. buccalis*, *P. gingivalis* ATCC 33277, izolatu rodu *Bacteroides*, *E. corrodens*, *S. salivarius* ter proti obema referenčnima izolatoma *S. mutans* je bil protibakterijsko najbolj učinkovit med manuka. Proti izolatoma *P. oris*, *P. veroralis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *S. sanguis* in *S. oralis* pa so največjo protibakterijsko učinkovitost izkazale vrste slovenskega medu (hojev, gozdni, kostanjev, repični, cvetlični med).
- Največji premer inhibicijskih con smo izmerili pri nerazredčenih vrstah medu. Samo pri referenčnemu izolatu *P. gingivalis* smo opazili večjo protibakterijsko učinkovitost 50 % razredčine repičnega medu v primerjavi z nerazredčenim repičnim medom.

6 POVZETEK

Parodontalna bolezen je vnetje obzobnih tkiv, ki vodi v apikalni pomik stičnega epitelija in napredovalo razgradnjo zobovnice in čeljustne kosti. Ker prevalenca parodontalnih bolezni s starostjo narašča, naj bi se zaradi staranja populacije število obolelih še povečalo. Če parodontalnih bolezni ne zdravimo, vodijo v izgubo zob pri odraslih po 35. letu starosti. Bakterije, ki so vpletene v razvoj parodontalnih bolezni so večinoma anaerobne po Gramu negativne bakterije (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, vrste rodu *Capnocytophaga*, *E. corrodens* in *T. forsythensis*). Obstoječe zdravljenje parodontitisa lahko razdelimo na tradicionalno mehansko zdravljenje, antibiotično zdravljenje in kombinacijo obeh zdravljenj. Zaradi naraščajoče odpornosti bakterij proti različnim vrstam antibiotikov in neugodnih učinkov kemičnih protibakterijskih sredstev, ki se uporabljajo za zdravljenje bolezni, se je pojavila potreba po alternativnih metodah zdravljenja, ki bi bile tudi cenejše. Pri tem se vse več pozornosti v medicini namenja medu kot naravni učinkovini, saj zaradi svojih lastnosti (visoka vsebnost sladkorjev, sproščanje vodikovega peroksida, kisel pH, osmolarnost in vsebnost protibakterijskih sestavin) deluje protibakterijsko.

V diplomski nalogi smo z agar difuzijsko metodo določili protibakterijsko učinkovitost različnih vrst slovenskega ter medu manuka na najpogostejše parodontopatogene bakterije in nekatere ustne streptokoke.

Pri vseh vrstah medu smo v naši raziskavi ugotovili največji protibakterijski učinek proti izolatu *A. actinomycetemcomitans*, ki povzroča lokalni juvenilni parodontitis ali druge oblike agresivnega parodontitisa. Sledil je protimikrobni učinek proti izolatu *P. intermedia*. Pri vseh vrstah medu je bil sicer opazen protibakterijski učinek proti kliničnemu in referenčnemu izolatu *P. gingivalis*, vendar je bil znatno manjši kot pri prej naštetih vrstah. Proti *F. nucleatum* je bil opazen minimalen protibakterijski učinek pri vseh vrstah medu, razen pri kostanjevem, kjer učinka ni bilo. Proti *E. corrodens* je imel relativno dober protibakterijski učinek med manuka, medtem ko je bil učinek ostalih vrst medu minimalen. Protibakterijskega učinka proti izolatu rodu *Capnocytophaga* nismo dosegli z nobeno vrsto medu. Med ustnimi streptokoki so imele vse vrste medu najboljši učinek proti *S. sanguis*, sledila je učinkovitost proti *S. oralis*. Lipov in akacijev med nista imela učinka proti obema izolatom *S. mutans* in

S. salivarius, učinek ostalih vrst medu z izjemo manuka medu pa je bil proti tem izolatom le minimalen. Ugotovili smo, da se protibakterijska učinkovitost med posameznimi vrstami medu razlikuje, nanjo pa vpliva tudi koncentracija medu ter vrsta bakterijskega izolata.

7 VIRI

Alendejani T., Marsan J., Ferris W., Slinger R., Chan F. 2009. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, 141: 114-118

Al Somai N., Coley K.E., Molan P.C., Hancock B.M. 1994. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 87, 1: 9-12

Armitage G.C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 4, 1: 1-6

Atrott J., Henle T. 2009. Methylglyoxal in manuka honey - correlation with antibacterial properties. *Czech Journal of Food Science*, 27, Spec. Issue 1: S163-S165

Badet C., Quero F. 2011. The *in vitro* effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria. *Anaerobe*, 17: 19-22

Basson N.J., du Toit I.J., Grobler S.R. 1994. Antibacterial action of honey on oral streptococci. *Journal of the Dental Association of South Africa*, 49: 339-341

Basualdo C., Sgroy V., Finola M.S., Marioli J.M. 2007. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*, 124: 375-381

Berglundh T., Krok L., Liljenberg B., Westfelt E., Serino G., Lindhe J. 1998. The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease: A prospective, controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 25: 354-362

Bergstrom J., Eliasson S., Dock J. 2000. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *Journal of Periodontology*, 71, 8: 1338-1347

Bidault P., Chandad F., Grenier D. 2007. Systemic antibiotic therapy in the treatment of periodontitis. *Journal of the Canadian Dental Association*, 73: 515-520

Bogdanov S. 1984. Characterisation of antibacterial substances in honey. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 17: 74-76

Bogdanov S. 1997. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 30: 748-753

Bogdanov S. 2008. Antibacterial substances in honey. Muehlethurnen, Bee Product Science Network of Knowledge: 10 str.

http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/miel/49_sustancias_antibacterianas_miel.pdf
(december 2010)

Božnar A. 2003. Mikrobiologija medu. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 582-586

Božnar A., Senegačnik J. 1998. Med. V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Založba Kmečki glas: 376-414

Brondz I., Olsen I. 1989. Chemical differences in lipopolysaccharides from *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*: Clues to differences in periodontopathogenic potential and taxonomic distinction. *Infection and Immunity*, 57, 10: 3106-3109

Choi B.K., Paster B.J., Dewhirst F.E., Gobel U.B. 1994. Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infection and Immunity*, 62, 5: 1889-1895

Cooper R.A., Halas E., Molan P.C. 2002a. The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 23, 6: 366-370

Cooper R.A., Molan P.C., Harding K.G. 2002b. The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 857-863

Cvetko E., Skalerič U. 2008. Indikacije za sistemsko antibiotično zdravljenje parodontalne bolezni. *Zobozdravstveni Vestnik*, 63: 81-89

Dragaš A.Z. 1996. Oralna bakteriologija. Ljubljana, DZS: 103 str.

Duncan M.J. 2003. Genomics of oral bacteria. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 14, 3: 175-187

Dustmann J.H. 1972. Über den Einfluß des Lichtes auf den Peroxid-Wert (Inhibin) des Honigs. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 148, 5: 263-268

English H.K., Pack A.R., Molan P.C. 2004. The effects of manuka honey on plaque and gingivitis: A pilot study. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 6, 2: 63-67

Feng Z., Weinberg A. 2006. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology 2000*, 40: 50-76

Frankel S., Robinson G.E., Berenbaum M.R. 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 37, 1: 27-31

French V.M., Cooper R.A., Molan P.C. 2005. The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 228-231

Gašperšič R., Skalerič U. 2006. Pregled obzobnih tkiv. V: *Stomatološka klinična preiskava*. Skalerič U. (ur.). Ljubljana, Društvo zobozdravstvenih delavcev Slovenije: 82-96

Gebara E.C.E., Lima L.A., Mayer M.P.A. 2002. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 4: 365-369

Griffen A.L., Becher M.K., Lyons S.K., Moeschberger M.L., Leys E.J. 1998. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 11: 3239-3242

Grošelj D., Gubina M. 2002. Zobna gniloba in bakterijske okužbe obzobnih tkiv. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 363-371

Guerrero A., Griffiths G.S., Nibali L., Suvan J., Moles D.R., Laurell L., Tonetti M.S. 2005. Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: A randomized placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 32, 10: 1096-1107

Haffajee A.D. 2006. Systemic antibiotics: To use or not to use in the treatment of periodontal infections. That is the question. *Journal of Clinical Periodontology*, 33: 359-361

Haffajee A.D., Cugini M.A., Dibart S., Smith C., Kent R.L., Socransky S.S. 1997. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 24: 324-334

Haffajee A.D., Socransky S.S., Gunsolley J.C. 2003. Systemic anti-infective periodontal therapy: A systematic review. *Annals of Periodontology*, 8, 1: 115-181

Herrera D., Sanz M., Jepsen S., Needelman I., Roldan S. 2002. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as a adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 29: 136-159

Huidobro J.F., Sanatana F.J., Sanchez M.P., Sancho M.T., Muniategui S., Simal-Lozano J. 1995. Diastase, invertase and β -glucosidase activities in fresh honey from northwest Spain. *Journal of Apicultural Research*, 34, 1: 39-44

Jones R. 2009. Honey and healing through the ages. *Journal of ApiProduct & ApiMedical Science*, 1, 1: 2-5

Kaldahl W.B., Kalwarf K.L., Patil K.D., Molvar M.P., Dyer J.K. 1996. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *Journal of Periodontology*, 67, 2: 93-102

Kamma J.J., Nakou M., Manti F.A. 1994. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *Journal of Periodontology*, 65, 11: 1073-1078

Kamma J.J., Nakou M., Gmur R., Baehni P.C. 2004. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology*, 19, 5: 314-321

Kaplan J.B., Meyenhofer M.F., Fine D.H. 2003. Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Bacteriology*, 185, 4: 1399-1404

Kapš P. 1998. *Med in zdravje*. Novo mesto, Založba Erro: 23-36

Kornman K.S. 2001. Patients are not equally susceptible to periodontitis: Does this change dental practice and the dental curriculum? *Journal of Dental Education*, 65, 8: 777-784

Košmelj K. 2007. *Uporabna statistika*. 2. dop. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf
(november 2010)

Kralj Kunčič M., Jaklič D., Lapanje A., Drobne D., Gunde-Cimerman N. 2010. The antibacterial and antifungal activity of slovenian honeys. V: APIMONDIA International Forum on Apitherapy: Programme and the book of abstracts / 3rd Apimondia. Ljubljana, September 28 - October 2, 2010. Božič J. (ur.). Brdo pri Lukovici, Čebelarstva zveza Slovenije: 23-23

Kuru B., Yilmaz S., Noyan U., Acar O., Kadir T. 1999. Microbiological features and cervicular fluid aspartate aminotransferase enzyme activity in early onset periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 26, 1: 19-25

Kwakman P.H., te Velde A.A., de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls C.M., Zaat S.A. 2010. How honey kills bacteria. *FASEB Journal*, 24: 2576-2582

Loesche W.J., Giordano J.R., Hujoel P., Schwarcz J., Smith B.A. 1992a. Metronidazole in periodontitis: Reduced need for surgery. *Journal of Clinical Periodontology*, 19, 2: 103-112

Loesche W.J., Lopatin D.E., Stoll J., van Poperin N., Hujoel P.P. 1992b. Comparison of various detection methods for periodontopathogenic bacteria: Can culture be considered the primary reference standard? *Journal of Clinical Periodontology*, 30, 2: 418-426

Loesche W.J., Grossman N.S. 2001. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: Diagnosis and treatment. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 4: 727-752

Lusby P.E., Coombes A.L., Wilkinson J.M. 2005. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Archives of Medical Research*, 36: 464-467

Mandell R.L., Socransky S.S. 1981. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology*, 52, 10: 593-598

Matto J., Asikainen S., Vaisanen M.L., Rautio M., Saarela M., Summanen P., Finegold S., Jousimies-Somer H. 1997. Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in extraoral and some odontogenic infections. *Clinical Infectious Diseases*, 25, Suppl. 2: S194-S198

Mavric E., Wittmann S., Barth G., Henle T. 2008. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52: 483-489

Meyer D.H., Lippmann J.E., Fives-Taylor P.M. 1996. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infection and Immunity*, 64, 8: 2988-2997

Mihelič S. 1984. Čebele in čebelji proizvodi v preteklosti. V: Moč medu. Skrt-Kos N. (ur.). Ljubljana, Založba Centralnega zavoda za napredek gospodinjstva: 5-45

Molan P.C. 1992a. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73, 1: 5-28

Molan P.C. 1992b. The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World*, 73, 2: 59-76

Molan P.C. 1998. A brief review of the use of honey as a clinical dressing. *Australian Journal of Wound Management*, 6, 4: 148-158

Molan P.C. 2001a. Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2, 1: 13-19

Molan P.C. 2001b. The potential of honey to promote oral wellness. *General Dentistry*, 49: 584-588

Mombelli A. 2006. Heresy? Treatment of chronic periodontitis with systemic antibiotics only. *Journal of Clinical Periodontology*, 33: 661-662

Mombelli A. 2008. Antibiotics in periodontal therapy. V: *Clinical periodontology and implant dentistry*. 5th ed. Lang N.P., Lindhe J. (eds.). Oxford, Blackwell Munksgaard: 882-897

Mombelli A., Gmür R., Gobbi C., Lang N.P. 1994. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. I. Topographic distribution before and after treatment. *Journal of Periodontology*, 65, 9: 820-826

Rams T.E., Feik D., Listgarten M.A., Slots J. 1992. *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 7: 1-6

Rihar J. 2003. Mana iglavcev, napovedovanje gozdnega medenja. Ljubljana, Založba PANSAN: 28-32

Rosling B., Serino G., Hellström M-K., Socransky S.S., Lindhe J. 2001. Longitudinal periodontal tissue alterations during supportive therapy. Findings from subjects with normal and high susceptibility to periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 28: 241-249

Sakellari D., Goodson J.M., Socransky S.S., Kolokotronis A., Konstantinidis A. 2000. Concentrations of 3 tetracyclines in plasma, gingival crevice fluid and saliva. *Journal of Clinical Periodontology*, 27: 53-60

Santos F.A., Bastos E.M.A., Rodrigues P.H., de Uzeda M., de Carvalho M.A.R., de Macedo Farias L., Moreira E.S.A. 2002. Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents. *Anaerobe*, 8: 9-15

Sapadin A.N., Fleischmajer R. 2006. Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54: 258-265

Schreiner H.C., Sinatra K., Kaplan J.B., Furgagan D., Kachlany S.C., Planet P.J., Perez B.A., Figurski D.H., Fine D.H. 2003. Tight-adherence genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are required for virulence in a rat model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 12: 7295-7300

Seme K. 2002a. Stafilokoki. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 139-145

Seme K. 2002b. Normalna mikrobna flora. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 59-64

Sherlock O., Dolan A., Athman R., Power A., Gethin G., Cowman S., Humphreys H. 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 10: 47-51

Shiloah J., Patters M.R., Dean J.W.^{3rd}, Bland P., Toledo G. 1998. The prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *B. forsythus* in humans 1 year after 4 randomized treatment modalities. Journal of Periodontology, 69: 1364-1372

Skalerič E., Petelin M., Kovač-Kavčič M., Skalerič U. 2008. Potrebe po parodontalnem zdravljenju pri prebivalcih Ljubljane 20 let po prvem pregledu. Zobozdravstveni Vestnik, 63: 63-66

Skalerič U., Gašperšič R. 2005. Vrstni red stomatološkega zdravljenja s poudarkom na parodontalnem zdravljenju. Zobozdravstveni Vestnik, 60: 175-181

Skalerič U., Kovač-Kavčič M. 1989. Periodontal treatment needs in a population of Ljubljana, Yugoslavia. Community Dentistry and Oral Epidemiology, 17: 304-306

Slots J. 1982. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Journal of Clinical Microbiology, 15, 4: 606-609

Slots J. 2002. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. Journal of Periodontal Research, 37: 389-398

Slots J. 2004. Systemic antibiotics in periodontics. Journal of Periodontology, 75, 11: 1553-1565

Slots J., Rams T.E. 1990. Antibiotics in periodontal therapy: Advantages and disadvantages. Journal of Clinical Periodontology, 17: 479-493

Slots J., Ting M. 2002. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. Periodontology 2000, 28: 106-176

White J.W.Jr. 1975. Composition of honey. V: Honey: A comprehensive survey. Crane E. (ed.). London, Heinemann: 157-206

White J.W.Jr., Subers M.H. 1964a. Studies on honey inhibine. 3. Effect of heat. *Journal of Apicultural Research*, 3, 1: 45-50

White J.W.Jr., Subers M.H. 1964b. Studies on honey inhibine. 4. Destruction of the peroxide accumulation system by light. *Journal of Food Science*, 29: 819-828

White J.W.Jr., Subers M.H., Schepartz A.I. 1963. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 73: 57-70

Willix D.J., Molan P.C., Harfoot C.J. 1992. A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *Journal of Applied Microbiology*, 73: 388-394

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Katji Seme, dr. med., za strokovno vodenje, usmerjanje, koristne nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi Marjetki Kralj Kunčič za vodenje pri praktični izvedbi diplomskega dela, za strokovne nasvete, vložen čas in potrpljenje.

Recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina se zahvaljujem za natančen in korekten pregled diplomske naloge.

Za vso pomoč, vzpodbudne besede in nasvete pri praktični izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem Antoniji, Marji, Mrjetki, Petri in Poloni iz Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Za pomoč pri zbiranju strokovne literature se zahvaljujem tudi dr. Marti Kocjan Anžič, dr. stom, specialist za zobne in ustne bolezni ter parodontologijo.

Največja zahvala gre mojim staršem Slovenku in Jadranki ter bratu Žigi, ki so me spodbujali in verjeli vame.