**Sucrose og anaerobe sucrose-metabolisme i biofilm**

1. **En forklaring på hvorfor sucrose er speciel i forhold til udvikling af biofilm på tænderne**

Sucrose anses som det mest cariogene kulhydrat, den fremmer udvikling af lukket plak/biofilm fordi den er substrat til dannelse af ekstracellulære polysakkarider(også kaldt eksopolysakkarider (EPS))

Enzymer katalyserer dannelse af ekstracellulære polysakkarider ud fra Glucose og Fruktose

1. Dextransucrase(Glukosyltransferase)

Dannelse af Dextran og Mutan(Begge glucaner, dvs polymerer af glucose)

~~Sucrose -> Dextran + Fruktose~~

 2) Levansucrase(Fruktosyltransferase)

Dannelse af Levan(en fructan, dvs polymerer af fruktose)

~~Sucrose -> Levan + Glukose~~

Ekstracellulære polysakkarider:

* Ekstracellulær matrix(ECM) bliver tykkere og stabiliseres
* Dextran: en slags stativ for matrix, strukturel, stabiliserer, plak-massen bliver mere homogen.
* Mutan: matrix bliver klæbrig/klistrende, kompakt mere lukket.
* Levan: indgår også i ECM, men danner et depot af kulhydrat, som bakterier kan metabolisere under kulhydratmangel

Ergo sucrose bevirker at plakken bliver klæbrig (grundet mutan), tyk, massen tiltager hurtigt og bliver mere lukket/impermeabel

1. **En redegørelse for den bakterielle, anaerobe sucrosemetabolisme. Redegørelsen skal omfatte kardinalenzymer og ultimative produkter i tilfælde af henholdsvis overskud og underskud af sucrose**

Sucrose optages

Glukose nedbrydes vha. Glykolyse til 2 pyruvat

**Ved overskud af sucrose:**

Dannes meget af intermediaterne:

* Fructose 1,6-biphosphat
* GAP-3

Fructose 1,6-biphosphat aktiverer laktat-dehydrogenase og GAP-3 hæmmer pyruvat-formatlyase

Laktat-dehydrogenase katalyserer omdannelse af pyruvat til mælkesyre

Dvs. ved overskud af sucrose vil der blive dannet meget mælkesyre.

**Ved underskud af sucrose:**

Pyruvat-format lyase er aktiv(hæmmes ikke af høje GAP-3 levels)

PFL katalyserer omdannelse af pyruvat

Der dannes flere organiske syrer ved underskud af sucrose med højere pKa(undtagen myresyre)



Fordelen er at der dannes 1 ATP

1. **En forklaring på hvordan de ultimative produkter ved anaerobe sucrose-metabolisme påvirker tandemaljen, herunder om der er forskel på påvirkningen ved henholdsvis overskud og underskud af sucrose**

Lav pH i plak ift. opløselighed:

* Bakterier i plak danner syrer når kulhydrater fermenteres under anaerobe forhold.
* Syreproduktionen kan medføre et fald i plakkens pH til pHplak < kritisk pHplak mht. HAP hvor ionproduktet IHAPPLAK < KspHAP -> plakvæsken bliver undermættet mht. HAP PO4 og OH konc. Falder (pga. øget H+ koncentration)
* Ligevægten forskydes mellem HAP fastform og væskeform mod opløsning af HAP

|  |  |
| --- | --- |
| Faststof | Væskeform |
| Ca10(PO4)6(OH)2 | 10 Ca+2 + 6 PO4-3 + 2 OH- |
| Udfældning | Opløsning |
|  |  |

Anaerobe forhold under sucrose overskud:

* Dannelse af mælkesyre

Extracellulært mælkesyre

* Diffunderer i uladet form ind i emaljelag(emaljevæsken) og dissocierer til L- og H+
* H+ påvirker OH- og (PO4)-3
* L- kan binde til Ca+2

Alle 3 ioner af HAP kan påvirkes når der produceres mælkesyre ved kulhydratoverskud

* IHAP < KspHAP

Forskel mellem over- og underskud af sucrose:

* Ved underskud dannede syrer sænker også pH, men fleste er mindre stærke syrer end mælkesyren og de fjerner ikke calcium og dermed alle komponenter fra HAP.

**Spyttet er en væsentlig faktor i relation til begrænsning af cariesudvikling**

1. **Beskriv hvorledes spyttet sandsynligvis kan beskytte den rene emaljeoverflade mod dannelse af biofilm.**

Pellikeldannelse:

Pellikel-dannelse på ren emaljeoverflade indenfor minutter.

* Første proteiner der indgår i pellikeldannelsen: hovedsagligt PRP og statherin
* Tiltrækkes flere proteiner: Muciner, histatin, cystatin, lysozymer, lactoferrin, kulsyreanhydrase etc.
* Fosfatgrupperne ligger tættest op mod emaljeoverfladen, tiltrækker calcium ioner fra spyt.
* Dannes positivt ladet ion-dobbeltlag med meget mere calcium en phosphat
* Negativt ladede proteiner binder til ion-dobbeltlag. Helspyt som kilde til pellikelproteiner.

Elektrostatisk tryk mellem negativt ladede pellikeloverflade og negativt ladede bakterieoverflade

Sandsynligvis hæmning op til 90% af initial kolonisering

Oral clearance

* Oral clearance af bakterier fremmes af spyt proteiner som agglutininer(gp340) og andre proteiner som: IgA, prolin-rige proteiner og MUC7, der agglutinerer bakterier
* Flere antibakterielle spytproteiner binder med tiden til pelliklen e.g peroxidase, lysozym, lactoferrin, cystatin. Der kan påvirke/hæmme bakterievækst og metabolisme
1. **Angiv nogle komponenter i spyttet som virker bakteriehæmmende og beskriv hvilken type stoffer der er tale om.**

Organiske komponenter

* Antibakterielle spytproteiner bindes til pelliklen e.g. peroxidase, lysozym, lactoferrin, cystatin der kan påvirke bakterievækst og metabolisme
* Lactoferrin: jern chelator, hæmmer bakterie metabolisme
* Cystatin: protease inhibitor, hæmmer bakteriernes evne til at metabolisere spytproteiner
* Lysozym: kan ødelægge bakteriens cellevæg
* Peroxidase: kan nedbryde h20 for at omdanne thiocyanat til hypothiocyanat som virker antibakterielt.

Ikke egentlig spyt effekt:

* Flour i spyt, oprindeligt fra tandpasta eller flourideret drikke – kan optages af bakterier ved lav pH binder intracellulært Mg+2 som kræves for enzymet enolase
* Enolase katalyserer dannelse af phosphoenolpyruvat (PEP), kræves for PTS systemet fungerer.
* Optag af glukose hæmmes og dermed kan syreproduktion reduceres
1. **Beskriv hvorledes spyttet kan være med til at begrænse pH fald under anaerob sucrose-metabolisme i biofilm.**

Buffer systemer:

* Bikarbonat i buffersystem, effektiv i stimuleret spyt da bicarbonatkoncentration stiger med spytsekretionshastigheden, ved pH 5 – 7

H+HCO3-(svag base) <=>H2CO3(svag syre) <=>CO2+H2O

* Fosfat buffersystem, mest i ustimuleret spyt, ved pH 6-7,5(op til 8)
* Protein buffersystem ved lav pH(pH<5)

Urea i spyt kan diffundere ind i biofilmen, kilde til bakteriers nitrogenstofskifte og nedbrydes via urease

* Det dannede ammoniak er en base som kan øge pH ved at optage en proton
1. **Forklar hvordan spyttet efter anaerob sucrose-metabolisme i biofilm kan være med til at remineralisere demineraliseret emalje.**

Remineralisering

* Spyt indeholder calcium og fosfat samt fluorid ioner fra fx tandpasta, drikkevand. Ioner diffunderer ind i biofilmen/plakken. Fluorid i plak kan danne kompleks med calcium – CaF2
* Akkumuleres, da biofilm matrix med ekstracellulære polysakkarider dextran og mutan og denaturede proteiner udøver gelfiltrerings- og ionbytter-effekt og nedsætter diffusionen
* Biofilm/plakvæsken bliver mange gange overmættet mht. HAP og FAp.
* Pga. høj calcium og fosfat er den kritiske pH mht. Hydroxylapatit lavere i biofilmen/plak-væsken. pH skal falde mere før HAP i kontakt med væsken går i opløsning og:
* pH stiger efter endt syreproduktion hurtigere og kritisk pH, så remineralisering kan ske.
* Med flour tilstede kan nu ske remineralisering med FAP, er mere syreresistent(har en lavere kritisk pH) end HAP, så der skal større fald til næste gang før FAP eller FHAP går i opløsning

Primær drivkraft til remineralisering:

* Overmætning mht. Calcium og phosphat i spyt(og fluorid fra tandpasta i spyt etc.) akkumulering af disse ioner i plakvæsken, mange gange overmættet ift. emaljevand efter syreangreb
* Plakvæsken er overmættet mht. FAP ned til pH 4.5(kritisk pH for FAP i plakken)
* Under remineralisering kan fluorid indbygges, krystaller bliver mere resistente ved næste syreangreb

Opløsning af emalje

1. Forklar hvad der forstås ved mineralisering, demineralisering og remineralisering og hvordan emaljen kan opløses ved anaerob metabolisme under dentale biofilm. Forhold der er anderledes end ved emaljeopløsningen forårsaget af tanderosion.

Mineralisering

* Tandstendannelse, emalje dannelse

Demineralisering

* Ved produktion af syre i plak og hvis plakvæskens pH falder til:
* pH < kritisk pHplak
* IHAPPLAK < KspHAP
* HAP som er i kontakt med plakvæske kan gå i opløsning og der kan ske demineralisering af emaljen

Remineralisering

* Hvis syreproduktionen standser og plakvæskens pH stiger igen til:
* pH > kritisk pHplak
* IHAPPLAK > KspHAP
* Der vil ske udfældning af HAP og remineralisering af emaljen

Anaerobe forhold under sucrose overskud:

* Dannelse af mælkesyre

Extracellulært mælkesyre

* Diffunderer i uladet form ind i emaljelag(emaljevæsken) og dissocierer til L- og H+
* H+ påvirker OH- og (PO4)-3
* L- kan binde til Ca+2

Alle 3 ioner af HAP kan påvirkes når der produceres mælkesyre ved kulhydratoverskud

* IHAP < KspHAP
1. **Beskriv hvad der menes med kritisk pH og hvorfor denne ikke er den samme i forskellige væsker. Angiv den gennemsnitlige kritiske pH værdi for menneskespyt og forklar hvorfor individuelle forskelle i denne værdi. Beskriv hvilken betydning disse forhold kan have for cariesprocessen.**
* Kritisk pH værdi mht. HAP: ikke en konstant værdi, afhænger af opløsningens calcium og fosfat koncentration
* Forskellige opløsninger som HAP kommer i kontakt med (juice, plakvæske, spyt, læskedrikke) kan derfor have forskellige kritiske pH værdier, hvis deres calcium og fosfat koncentrationer varierer
* Jo mere calcium og fosfat en opløsning indeholder, jo lavere en opløsningens kritiske pH værdi mht HAP
* Gennemsnitsværdi i menneskespyt: kritisk pH 5.5
* Hvorfor er der individuelle forskelle? Fordi forskellige mennesker kan have forskellige calcium og fosfat koncentrationer i spyttet
* I forhold til caries processen: personer med lavere calcium og fosfat koncentrationer i spyt har en højere kritisk pH mht. HAP i spyt , ved pH fald nås den kritiske pH grænse hurtigere, der kan derfor være større risiko for demineralisering af emalje ved pH fald end hos personer med høje koncentrationer af fosfat og calcium i spyt og dermed en lavere kritisk pH mht. HAP
* pH skal stigere mere efter endt syreproduktion før remineralisering kan begynde. Der er risiko for at demineralisering ved hyppig sucrose indtag fx ikke kan kompenseres af remineralisering

**Med hensyn til pH værdien i den anaerobe dentale plak som kan medfører demineralisering henholdsvis remineralisering af tandemalje beskriv da**

1. **Bakterielle processer der vil medføre et pH fald i dental biofilm og hvilke forhold der i særligt grad kan accelerer disse processer.**
2. **Konkrete eksempler på bakterielle processer der vil medføre en pH stigning i dental biofilm**.

Basedannelse i biofilmen og dermed pH stigning:

* Hydrolyse af urea vha. enzymet urease (reaktion er opskrevet længere nede)
* Arginin metabolisme vha. arginindeminase system (ADS), en reaktion som bakterier under anaerobe forhold kan bruge til dannelse af 1 ATP samt dannelse af 2 ammoniak (base).
* Decarboxylering af aminosyrer vha. carboxylaser, aktive ved lav pH
* Urea stammer fra spyt, omdannes til ammoniak (NH3) og CO2 vha. bakterielle ureaser

Reaktion: Urea + H2O -> 2 ammoniak (NH3) + CO2

* Arginin: omdannes af ADS til ornithin, 2 NH3 og CO2 under dannelse af ATP

Arginin kan vha. følgende reaktion omdannes til ornithin og carbamoylfosfat

Arginin + H2O -> citrullin + NH3

Citrullin + Pi -> Carbamoylfosfat + ornithin

Carbamoylfosfat + ADP -> CO2 + ATP + NH3

Bakterien kan bruge denne pathway til ATP dannelse under anaerobe forhold

Ammoniak NH3 er en base – baseoverskud -> stigning i pH

Pathway kan induceres vha. Arginin supplementation, tanken bag tilsætning til tandpasta

Ornithin kan decarboxyleres til putrescin som følgende:

Ornithin -> putrescin + CO2

Putrescin er basisk og giver dårlig ånde (ildelugtende)

Decarboxylase enzym aktiveres ved lav pH.

Decarboxylering resulterer i netto basedannelse

1. Forhold der er særligt grad kan medfører at enten den ene eller anden proces bliver dominerende.

Ved tilstedeværelse af aminosyre:

* Aminosyre decarboxylering: Hvis pH falder tilstrækkeligt til at decarboxylaser aktiveres (pH 4.5-6) kan aminer dannes som er basiske, hvilket medfører stigning i pH.
* Decarboxyleringsreaktionen medfører baseoverskud da der fjernes en carboxylsyregruppe

Hvis bakterier udtrykker ADS og arginin er tilstede vil nedbrydning af arginin også resultere i basedannelse og pH stigning under anaerobe betingelser(Dannes også ATP)

Ornithin decarboxyleres hvorved der ligeledes dannes base (amin)

Strategi: Arginin tilsætning til fluorid tandpasta som syre neutraliserende indholdsstof

1. **Beskriv en tandoverflades ultrastrukturelle opbygning og forklar begrebet enhedscelle**
* Enhedscelle: mindste rumlige, tredimensionale fordeling af alle de ioner der indgår i den kemiske formel for HAP, rombeformet, OH ioner danner kanterne
* Gentager sig tusindvis af gange igennem krystallen
* Teoretisk, kan ikke eksistere i naturen
1. **Forklar hvordan pelikkelen dannes på tandoverfladen og beskriv sammensætning af henholdsvis pelikkel og biofilm med klar angivelse af væsentlige kemiske komponenter.**

Metabolisme af spytproteiner for at hæfte pelikkelen

* Bakterier udskiller enzymerne neurominidase og glycosidaser
* Neuraminidase: spalter sialasyre fra spyttets sialaproteiner
* Glycosidase spalter kulhydratgrupper fra glykoproteiner
* Derved udfældes proteinerne og denaturede proteiner inkooperes i plak matrix
* Kulhydraterne, sialasyre, fraspaltningprodukterne N-acetylgalaktosarrin og proteinkerne kan indgå i bakteriens metabolisme
* Bakterierne kan trænge længere ind i pelikklen det fremmer tilhæftningen

Biofilmens sammensætning: Bakterier + ekstracellulær matrix(ECM)

Bestående af: ekstracellulære polysakkarider (Dextran, Mutan, Levan) proteiner og vand

1. Forklar hvorfor diffusionsforholdene i dental biofilm som oftest ændres over tid hvis ikke biofilmen fjernes
* Diffusionsforholdende ændrer sig med tiden i dentale biofilm, fordi plakkens matrix bliver tykkere og tiltagende impermeabel
* Ekstracellulære polysakkarider nedsætter diffusionen i biofilmen, bidrager til at miljøet bliver mere anaerob og biofilmen lukket
* Biofilmen virker som en gelfilter(pga. ekstracellulære polysakkarider) og ionbytter. Ioner (calcium, fosfat, fluorid) akkumuleres
* Medfører at store og/eller ladede molekyler vanskeligt kan trænge ind eller ud, i modsætning til små uladede stoffer som glukose eller urea, der kan diffundere ind.
1. **Angiv hvorledes koncentrationen af calcium og fosfat i dental biofilm afviger fra koncentrationen i spyttet og beskriv hvilken betydning dette kan have for henholdsvis mineralisering, demineralisering og remineralisering**
* Grundet biofilmens ionbytter og gelfiltereffekt akkumleres/tilbageholdes ioner såsom calcium, fosfat fra spyt, men også fluorid fra f.eks tandpasta

Mineralisering

* Plakmatrix akkumulerer calcium og fosfat fra spyt, fremmer tandstendannelse og calcificering af biofilm ved høj pH, biofilm har tendens til at mineralisere

Demineralisering

* Højere calcium og fosfat i plakken end i spyt betyder at 2 ud af 3 ionkomponenter der indgår i HAPs ionprodukt forekommer i højere koncentrationer, hvilket kan kompensere for underskud af OH, som det forekommer ved fald i pH som følge af syreproduktion under bakteriernes anaerobe kulhydrat metabolisme
* Plakvæskens kritiske pH mht. HAP er derfor lavere end spyttet og i forhold til spyt skal et pH fald være større inden emaljen i kontakt med plakvæsken går i opløsning, dvs. risiko for demineralisering formindskes
* Med remineralisering er det omvendt. Grundt lav kritisk pH vil ved endt syreproduktion og genoprettelse af normal pH den grænse hvorfra remineralisering kan starte nås efter kortere tid, end hvis den kritiske pH lå højre