

## 10. STRESZCZENIE

Zdolność bakterii i grzybów do tworzenia struktur biofilmu ma istotne znaczenie w patogenezie wielu chorób, w tym również chorób jamy ustnej.

Próchnica, kandydoza, choroby przyzębia to choroby związane z tworzeniem struktur biofilmu. Tworzenie dynamicznej przestrzennie złożonej struktury biofilmu i odmienne cechy fizjologiczne drobnoustrojów go tworzących, tłumaczą po części jego wysoką oporność na działanie różnych czynników m.in. antybiotyków co powoduje trudności w terapii jamy ustnej.

Terapia tego rodzaju zakażeń stanowi wyzwanie dla współczesnej stomatologii. Wieloczynnikowa natura procesów chorobowych dotyczących jamy ustnej, jak i specyfika biofilmu może skutkować niepowodzeniem zastosowanego leczenia. To wszystko zmusza do poszukiwania alternatywnych metod terapii.

Celem pracy była ocena zdolności tworzenia biofilmów jedno i wielogatunkowych przez drobnoustroje jamy ustnej. W pracy oceniono aktywność przeciwdrobnoustrojową lipopeptydów i terapii laserem wobec szczepów z jamy ustnej.

W 1 etapie badaniem objęto 43 szczepy *Candida* spp., 2 szczepy *S. mutans* i 18 szczepów *Lactobacillus* spp. Stopień adhezji drobnoustrojów i tworzenie biofilmu (1,2,3 gatunkowych) było oceniane ilościowo testem z fioletem krystalicznym. Dodatkowo oznaczono żywotność biofilmów testem redukcji MTT.

Do dalszych badań wybrano szczepy, które wykazywały najlepszą zdolność tworzenia biofilmów (14 szczepów *Candida* spp., 2 szczepy *S. mutans*, 13 szczepów *L. rhamnosus*). Oceniano ilość komórek koloniotwórczych CFU/mL w dojrzałych biofilmach jedno i wielogatunkowych. W badaniach zastosowano dwa lipopeptydy: Pal-KKKK-NH<sub>2</sub> i Pal-CKKKKC-NH<sub>2</sub>. Przeżywalność drobnoustrojów w biofilmie wobec peptydów była badana metodą mikrorozcieńczeń w płytkach titracyjnych. Wrażliwość szczepów na lipopeptydy oceniono wyznaczając wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC). Aktywność wobec biofilmu dojrzałego zarówno jedno-, jak i wielogatunkowego określono poprzez wyznaczenie minimalnego stężenia eradykującego biofilm (MBEC). W pracy wykorzystano lasery diodowe: Smart M LASOTRONIX zakres (405, 635, 808 nm) oraz MMO LASER DUO zakres (660, 808 nm). Oceniając wpływ promieniowania laserowego na biofilm mieszany stosowane były

metody ilościowe- test z fioletem, CFU/mL. Analiza struktury biofilmu po działaniu peptydu i fototerapii została oceniona z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej

Uzykane wyniki wskazują na silne relacje synergistyczne *Candida* spp. z *S. mutans* w biofilmach mieszanych. Natomiast *Lactobacillus rhamnosus* wykazał antagonistyczne działanie w stosunku do gatunków partnerskich obecnych w biofilmie mieszanym (*S. mutans-Lactobacillus*; *C. albicans-Lactobacillus* oraz *Candida-Streptococcus-Lactobacillus*).

Wykazano, że peptyd Pal-CKKKKC-NH<sub>2</sub> eradykował *Candida* spp. z biofilmu jednogatunkowego na wysokim poziomie 79%. Biofilmy *S. mutans* były wrażliwe na oba lipopeptydy. Najwyższą aktywność przeciwbiofilmową wobec *S. mutans* w 2 gatunkowym biofilmie *Candida-Streptococcus* wykazał peptyd Pal-KKKK-NH<sub>2</sub> co czyni go potencjalnym środkiem leczniczym w próchnicy.

Zaobserwowano, że fototerapia zarówno laserem LASOTRONIX jak i MMO DUO cechowała się najwyższą skutecznością w eradykacji biofilmów niż sam fotouczulacz czy laser.

## 11. ABSTRACT

The ability of bacteria and fungi to form biofilm structures is important in the pathogenesis of many diseases, including oral diseases. Caries, candidiasis, periodontal disease are diseases associated with the formation of biofilm structures. The formation of a dynamic, spatially complex structure of the biofilm and the different physiological characteristics of the microorganisms that make it up partly explain its high resistance to various factors m.in antibiotics, which causes difficulties in oral therapy. Therapy of this type of infection is a challenge for modern dentistry. The multifactorial nature of oral disease processes as well as the specificity of biofilm may result in the failure of the treatment used. All this forces us to look for alternative methods of therapy.

The aim of the study was to assess the ability of mono- and multi-species biofilms to be formed by oral microorganisms. The antimicrobial activity of lipopeptides and laser therapy against oral strains was evaluated.

In stage 1, the study included 43 strains of *Candida* spp., 2 strains of *S. mutans* and 18 strains of *Lactobacillus* spp. The degree of microbial adhesion and biofilm formation (1,2,3 species) was quantified by a crystal violet assay. In addition, the viability of biofilms was determined by the MTT reduction test.

For further studies, strains were selected that showed the best biofilm formation ability (14 strains of *Candida* spp., 2 strains of *S. mutans*, 13 strains of *L. rhamnosus*). The number of colony-forming CFU/mL cells in mature mono- and multi-species biofilms was evaluated. Two lipopeptides were used in the study: Pal-KKKK-NH<sub>2</sub> and Pal-CKKKKC-NH<sub>2</sub>. The survival of microorganisms in biofilm against peptides was investigated by microdilution in titration plates. Susceptibility to lipopeptides was assessed by determining the value of the minimum inhibitory concentration (MIC). The activity against both mono- and multi-species mature biofilm was determined by determining the minimum biofilm eradication concentration (MBEC). The work uses diode lasers: Smart M LASOTRONIX range (405, 635, 808 nm) and MMO LASER DUO range (660, 808 nm). When assessing the effect of laser radiation on mixed biofilm, quantitative methods were used – violet test, CFU/mL. Analysis of the biofilm structure after peptide and phototherapy was evaluated using confocal microscopy.

The results indicate strong synergistic relationships of *Candida* spp. with *S. mutans* in mixed biofilms. In contrast, *Lactobacillus rhamnosus* showed antagonistic activity in relation to

partner species present in mixed biofilm (*S. mutans*-*Lactobacillus*; *C. albicans*- *Lactobacillus* and *Candida*-*Streptococcus*-*Lactobacillus*).

Pal-CKKKKC-NH<sub>2</sub> was shown to eradicate *Candida* spp. from monospecific biofilm at a high level of 79%. Biofilms of *S. mutans* were sensitive to both lipopeptides. The highest antibiofilm activity against *S. mutans* in the 2-species biofilm *Candida*-*Streptococcus* was shown by the peptide Pal-KKKK-NH<sub>2</sub>, which makes it a potential therapeutic agent in caries. It was observed that phototherapy with both LASOTRONIX and MMO DUO lasers was more effective in biofilm eradication than the photosensitizer or laser itself.