



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Mikrobiologii farmaceutycznej i Parazytologii**

Ruth Dudek-Wicher

Ocena *in vitro* zdolności środków przeciwdrobnoustrojowych do eradykacji biofilmu tworzonego przez patogeny jamy ustnej

***"In vitro* evaluation of selected antimicrobials ability to eradication
biofilm produced by oral cavity pathogens"**

**Prof. dr hab. n. med. Marzenna Bartoszewicz
Promotor**

**Dr hab. n. med. Adam Feliks Junka, prof. UMW
Promotor pomocniczy**

Streszczenie

Mikrobiom jamy ustnej pełni istotne funkcje w utrzymywaniu homeostazy organizmu. Dysbioza w tej niszy ekologicznej prowadzi do rozwinięcia stanów patologicznych takich jak próchnica, zapalenie przyzębia czy zapalenie dziąseł. Ponadto, wykazano powiązania między mikrobiomem jamy ustnej a licznymi schorzeniami ogólnoustrojowymi takimi jak nieswoiste zapalenia jelit, cukrzyca, czy choroby układu krążenia. Dlatego też kontrola biofilmu jamy ustnej ma fundamentalne znaczenie dla zachowania zdrowia całego organizmu ludzkiego.

Celem tej pracy była ocena zdolności do tworzenia biofilmu przez drobnoustroje jamy ustnej w różnych warunkach wzrostowych, a także ewaluacja efektywności eradykacji biofilmu po zastosowaniu wybranych środków przeciwdrobnoustrojowych. Badaniem objęto 8 szczepów referencyjnych oraz 95 szczepów klinicznych, izolowanych z kości żuchwy oraz zapaleń gardła. W pierwszym etapie doświadczeń porównano tempo wzrostu badanych szczepów w formie planktonicznej oraz biofilmowej w standardowych mediach hodowlanych oraz w mediach wzbogaconych 5% sacharozą lub 5% ksylitolem. Drugim etapem była ocena wzrostu badanych szczepów w formie biofilmowej na powierzchni hydroksyapatytu w sztucznej ślinie oraz sztucznej ślinie wzbogaconej 5% sacharozą lub 5% ksylitolem. Na podstawie uzyskanych wyników wybrano warunki hodowlane w najwyższym stopniu odzwierciedlające te panujące w jamie ustnej. Toteż, w kolejnym etapie do hodowli biofilmu badanych drobnoustrojów zastosowano sztuczną ślinę i krążki hydroksyapatytowe a hodowle prowadzono w atmosferze z dodatkiem 5% CO₂.

Wobec wyhodowanego w powyższych warunkach biofilmu, zastosowano takie środki przeciwdrobnoustrojowe jak chlorheksydyna, poliheksanidyna, chlorek cetylopirydyniowy, mieszanina olejków eterycznych, nanocząsteczki srebra, sulfonowane fenole oraz olej kokosowy z dodatkiem 0,2% eterycznego olejku miętowego. Wykazano, że badane jednogatunkowe biofilmy cechowały się zróżnicowaną wrażliwością na działanie użytych związków przeciwdrobnoustrojowych, a efekt eradykacji był ściśle związany ze składem macierzy zewnątrzkomórkowej poszczególnych gatunków oraz czasem kontaktu. W ostatnim etapie prac badawczych zastosowano metodę A.D.A.M (*Antibiofilm Dressing's Activity Measurement*). Dzięki metodzie tej wykazano, że skuteczność działania substancji przeciwdrobnoustrojowej zależy nie tylko od gatunku wobec którego została zastosowana ale także od szczepu w obrębie tego gatunku.

Zaobserwowano, iż badane środki drobnoustrojowe posiadają zróżnicowaną zdolność do eradykacji biofilmu z powierzchni hydroksyapatytu i mogą stanowić zasadne uzupełnienie mechanicznego zwalczania biofilmu jamy ustnej. Ze względu na złożony charakter interakcji w biofilmach konieczne jest dalsze poszukiwanie nowych, skutecznych środków przeciwbiofilmowych, nie tylko względem biofilmów jednogatunkowych ale zwłaszcza wielogatunkowych, które dominują w środowisku jamy ustnej.

Abstract

The oral microbiom plays important role in maintaining the homeostasis of human organism. Dysbiosis in this ecological niche leads to development of pathological conditions such as tooth decay and gingivitis. In addition, the link between the oral microbiome and numerous systemic diseases such as nonspecific intestinal inflammation, diabetes, and cardiovascular diseases has been demonstrated. Therefore, the control of oral biofilm is fundamental to maintaining the health of the whole human body.

The aim of this study was to assess the ability of oral microorganisms to produce biofilm under different growth conditions, as well as to evaluate the effectiveness of the eradication of biofilm after the use of selected antimicrobials. The study included 8 reference strains and 95 clinical strains isolated from the jaw bones and pharynx inflammation. In the first phase of the experiment, the growth rate of tested strains in planktonic form was evaluated, using standard media and media enriched with 5% sucrose or 5% xylitol. The second step was to evaluate the growth of tested strains in a form of a biofilm formed on a hydroxyapatite surface in artificial saliva and artificial saliva enriched with 5% sucrose or 5% xylitol. Based on the results obtained, the culturing conditions, faithfully as possible, reflecting those prevailing in the oral cavity were chosen. Thus, in the next stage, artificial saliva and hydroxyapatite disks were used to culture the biofilm of the tested microorganisms, and the cultures were conducted in an atmosphere with 5% CO₂. Against biofilms, cultured under the abovementioned conditions, antimicrobials such as chlorhexidine, polyhexanidine, cetylpyridinium chloride, a mixture of essential oils, silver nanoparticles, sulfonated phenols and coconut oil with an addition of 0,2 % essential mint oil were used. It has been demonstrated that single - species biofilms have a different sensitivity to the antimicrobial agents, and the effect of eradication was connected with an extracellular matrix composition of the individual specie and the time of contact. In the final stage of the research , the A.D.A.D.A.M method (Antibiofilm addressing's Activity Measurement) has been used. The method has shown that the efficacy of an antimicrobial compound is not only depend on the species to be applied against but also on the strains within these species.

It has been observed that the tested antimicrobials have a different ability to eradicate biofilm from hydroxyapatite surface however may be a reasonable complement to mechanical control of oral biofilm. Due to the complex nature of interaction within biofilm structure, it is necessary to continue to seek new and effective antibiofilm compounds, not only against single-species biofilms but especially multispecies biofilms, which predominate in oral environment.