

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Diagnostyki Medycznej

Autoreferat

Wirginia Krzyściak

Kraków, 2018

Spis treści

1. Dane osobowe	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego	3
5. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym	10
A. Tytuł osiągnięcia naukowego	10
B. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	11
C. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	14
Wprowadzenie	14
Cel przeprowadzonych badań	15
Omówienie wyników badań	15
Wnioski	32
Podsumowanie	33
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	34
7. Plany dotyczące dalszych badań	41
8. Kierowanie i udział w projektach naukowych	42
9. Nagrody i wyróżnienia	43
10. Członkostwo w towarzystwach naukowych	44
11. Członkostwo w radach redakcyjnych	44
12. Recenzje prac	44
13. Działalność dydaktyczna i organizacyjna	44
14. Literatura	46

1. Dane osobowe

Imię i Nazwisko: **Wirginia Krzyściak**

Zakład Diagnostyki Medycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

Kontakt e-mail: wirginia.krzyściak@uj.edu.pl

Telefon: 12 620 57 60

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

magister analityki medycznej - Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum Wydział Farmaceutyczny, obrona pracy magisterskiej o tytule: Ocena zakażeń szpitalnych wywołanych przez *Pseudomonas aeruginosa* metodą PCR-RAPD; opiekun pracy: prof. dr hab. Alicja Budak, 2005-07-04

doktor nauk farmaceutycznych - Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum Wydział Farmaceutyczny, obrona pracy doktorskiej z wyróżnieniem - specjalność biochemia kliniczna, tytuł pracy: Badania wybranych wskaźników układu antyoksydacyjnego w homogenatach wydolnych i niewydolnych fragmentów żył oraz próbkach krwi obwodowej i zastoinowej chorych z przewlekłą chorobą żylną; promotor: prof. dr hab. n. med. Marek Stępniewski, 2009-06-25

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

asystent - Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny Zakład Radioligandów, Katedra Farmakobiologii - 01.10.2005-30.09.2010

adiunkt - Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, Zakład Diagnostyki Medycznej - 01.10-2010 do chwili obecnej

4. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego

Ukończyłam Liceum Ogólnokształcące im. Karola Miarki w Mikołowie w klasie o profilu matematyczno-fizycznym. W 2000 roku podjęłam studia magisterskie na kierunku analityka medyczna na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, które ukończyłam w 2005 roku.

Moja praca magisterska związana była z problemem zakażeń szpitalnych i oceną częstości występowania *Pseudomonas aeruginosa*. Temat mojej pracy magisterskiej: „Ocena zakażeń szpitalnych wywołanych przez *Pseudomonas aeruginosa* metodą PCR-RAPD” był wynikiem mojego zainteresowania mikrobiologią. Efektem naukowym pracy, poza uzyskaniem tytułu magistra analityki medycznej było doniesienie naukowe na Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, 5–7 września

2006 r. Pod kierunkiem prof. dr hab. Alicji Budak, promotora mojej pracy magisterskiej, poznałam zasady pracy w naukowym laboratorium mikrobiologicznym, a zdobyte w ten sposób doświadczenie wykorzystywałam wielokrotnie w późniejszych badaniach.

W 2006 roku podjęłam pracę na Wydziale Farmaceutycznym w Zakładzie Radioligandów, Katedry Farmakobiologii, UJ CM. Promotorem mojej pracy doktorskiej: „Badania wybranych wskaźników układu antyoksydacyjnego w homogenatach wydolnych i niewydolnych fragmentów żył oraz próbkach krwi obwodowej i zastoinowej chorych z przewlekłą chorobą żylną” został prof. dr hab. med. Marek Sępniewski, któremu zawdzięczam wiedzę zarówno teoretyczną, jak i praktyczną z dziedziny diagnostyki laboratoryjnej.

Moje zainteresowania naukowe można podzielić na kilka dziedzin z zakresu biochemii klinicznej i mikrobiologii. Powstałe prace wpisują się w omawiane dziedziny i zostały ujęte w każdej z nich. Zagadnienia z zakresu biochemii klinicznej to: rola stresu oksydacyjnego w patomechanizmie chorób oraz rola wybranych białek śliny jako markerów przebiegu i progresji wybranych chorób. Z kolei zagadnienia dotyczące mikrobiologii skoncentrowały się wokół determinant patogenności szczepów *Streptococcus* izolowanych z płytki nazębnej i śliny, jako potencjalnych czynników etiologicznych próchnicy wczesnego dzieciństwa (ECC). Zainteresowania biochemią i mikrobiologią zaowocowały prowadzonymi i kierowanymi przeze mnie badaniami (m.in. grant MNiSW „Najlepsi z najlepszych!”) nad aktywnością metaboliczną szczepów bakterii odpowiedzialnych za wywoływanie próchnicy u ludzi.

Efektem mojego zainteresowania tematem stresu oksydacyjnego w przewlekłej chorobie żylniej (PChŻ) były doniesienia naukowe:

Ostafin W, Sępniewski M, Kózka M, Olszewska L., Biedroń P. The role of oxidants and antioxidants in varicose veins at tissue level. Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism : materials of 16th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology, Cracow, June 4, 6, 2007 / ed. by Henryk Lach Pedagogical University of Cracow. S. 361 Kraków: Wydawnictwo Naukowe AP, 2007

Krzyściak W, Kózka M, Pietrzycka A, Sępniewski M. Związek między poziomem cholesterolu LDL a aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) u chorych z przewlekłą chorobą żylną (PChŻ). *Przegl. Flebol.* 2009 : T. 17, z. 2, s.90
VI Kongres Polskiego Towarzystwa Flebologicznego, Warszawa, 28

Krzyściak W, Kózka M, Pietrzycka A, Sępniewski M. Stężenie malonyldialdehydu (MDA) w osoczu krwi chorych z żylakami kończyn dolnych z różnym wskaźnikiem BMI. *Prz. Flebol.* 2009: T. 17, z. 2, s. 87-88. VI Kongres Polskiego Towarzystwa Flebologicznego, Warszawa, 28-30 maja 2009

Krzyściak W, Kózka M, Pietrzycka A, Kowalska J, Kazek G, W. Kwiatek. Rola cynku i miedzi w rozwoju stresu oksydacyjnego w przewlekłej chorobie żylniej (PChŻ). *Prz. Flebol.* 2009: T. 17, z. 2, s. 87 VI Kongres Polskiego Towarzystwa Flebologicznego, Warszawa, 28-30 maja 2009. VI Kongres Polskiego Towarzystwa Flebologicznego, Warszawa, 28-30 maja 2009.

Krzyściak W, Kózka M, Krośniak M, Stępniewski M. Reduced glutathione as a beneficial marker of antioxidant defense system in patients with chronic venous disease. Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism: materials of 18th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology / ed. by Henryk Lach; Józef Dietl Malopolska Higher Vocational School in Cracow – Kraków, 2009 s. 171-173.

W rozprawie doktorskiej skupiłam się na określeniu stężeń i aktywności wybranych wskaźników oksydacyjno-antyoksydacyjnych we krwi i tkankach osób cierpiących na przewlekłą chorobę żylną (PChŻ). Badania aktywności enzymatycznej: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GPx), oraz stężenia malonyldialdehydu (MDA), glutationu zredukowanego (GSH) i całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (FRAP) we krwi i tkankach zostały przedstawione na zjeździe 18th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology w Krakowie oraz na VI Kongresie Polskiego Towarzystwa Flebologicznego w Warszawie. Zebrane wyniki opisane zostały w artykułach opublikowanych na łamach Przeglądu Lekarskiego oraz oficjalnego kwartalnika Polskiego Towarzystwa Angiologicznego, a także Polskiego Towarzystwa Chirurgii Naczyniowej – Acta Angiologica.

Kózka M, **Krzyściak W**, Pietrzycka A, Stępniewski M. Obesity and its' influence on reactive oxygen species (ROS) in the blood of patients with varicose veins of the lower limbs. Prz. Lek. 2009, T. 66, nr 5, s. 213-217.

Krzyściak W, Kózka M, Kazek G, Stępniewski M. Selected indicators of the antioxidant system in the blood of patients with lower limb varicose veins. Acta Angiol. 2009, Vol. 15, nr 1, s. 10-19

Pracę doktorską obroniłam z wyróżnieniem w 2009 roku. Na tym etapie rozwoju naukowego mój dorobek obejmował 5 prac oryginalnych o łącznym współczynniku *impact factor* równym 2.321 i sumie punktów MNiSW 40.

Przeprowadzone na użytek pracy doktorskiej eksperymenty oceny stanu oksydacyjno-antyoksydacyjnego zachęciły mnie do dalszych badań w tej dziedzinie.

Krzyściak W, Kózka M, Pietrzycka A, Kowalska J, Kazek G, Kwiatek W. Rola cynku i miedzi w rozwoju stresu oksydacyjnego w przewlekłej chorobie żylniej (PChŻ). Prz. Flebol. 2009, T. 17, z. 2, s. 87 VI Kongres Polskiego Towarzystwa Flebologicznego, Warszawa, 28, 30 maja 2009.

Wykazałam różnice w stężeniach badanych pierwiastków zależnie od nasilenia stresu oksydacyjnego, co pozwoliło mi na wyciągnięcie wniosku, że działanie enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa czy peroksydaza glutationowa stymuluje układ antyoksydacyjny chorych zależnie od poziomu wybranych pierwiastków śladowych.

Uzyskane wyniki zmotywowały mnie do kontynuowania badań nad rolą żelaza tkankowego w kontekście obserwowanego stresu oksydacyjnego w przewlekłej chorobie żylniej (PChŻ).

Krzyściak W, Kowalska J, Kózka M, Kwiatek WM, Hartwich J. Iron content (PIXE) in competent and incompetent veins is related to the vein wall morphology and tissue antioxidant enzymes. XXI International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society (BES), Cracow, Poland, 8-12.05.2011.

Zebrane wyniki stały się przedmiotem publikacji na łamach międzynarodowego czasopisma Bioelectrochemistry poświęconego wykorzystaniu elektrochemii w naukach przyrodniczych.

Wirginia Krzyściak, Joanna Kowalska, Mariusz Kózka, Monika A. Papież, Wojciech M. Kwiatek. Iron content (PIXE) in competent and incompetent veins is related to the vein wall morphology and tissue antioxidant enzymes. Bioelectrochemistry (Amst.) 2012 : Vol. 87, s. 114-123, il., bibliogr. 90 poz., abstr. 1567 Impact Factor ISI: 3.947; MNiSW: 30.000

Od sierpnia 2007 r. uczestniczyłam w realizacji różnych projektów naukowych. W 7 projektach pełniłam rolę kierownika (1 projekt MNiSW, 3 dotacje celowe, 2 projekty statutowe, 1 projekt ekspercki), a w 6 byłam wykonawcą (1 projekt POiG, 1 projekt MNiSW, 4 projekty statutowe).

Wyniki moich badań zostały zaprezentowane w postaci wielu wystąpień ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych (m. in. 2nd World Dental Online Conference 2014; 22nd International Student Congress of (bio) Medical Sciences, 5 czerwca 2015, Groningen, Holandia; International Conference on Biochemistry, October 10-12, 2016, Kuala Lumpur, Malezja; International Conference on Microbial Physiology and Genomics, October 20-22, 2016, Rzym), a także opublikowane na łamach międzynarodowych czasopism (Front Microbiol., BMC Microbiol., Eur J Clin Microbiol Infect Dis., Anticancer Res., Bioelectrochemistry., Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, Food Chem Toxicol., Drug Des Devel Ther., J Physiol Pharmacol. i in.). Jestem autorką i współautorką 45 streszczeń konferencyjnych, w tym 26 ze zjazdów międzynarodowych.

1 października 2010 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku adiunkta w Zakładzie Diagnostyki Medycznej, kierowanym przez dr hab. Ryszarda Drożdża.

Moje badania skoncentrowały się wokół znaczenia wybranych białek śliny jako markerów przebiegu i progresji chorób jamy ustnej, szczególnie próchnicy wczesnego dzieciństwa (ECC). Warsztat badawczy i dostępna aparatura umożliwiły mi opracowanie i zoptymalizowanie metod oznaczania wybranych aminokwasów aromatycznych, białek: histatyny-5, oraz β -defensyny-2, które kolejno wykorzystałam do badań na materiale klinicznym. Efektem prowadzonych prac były wystąpienia ustne i posterowe podczas konferencji o zasięgu krajowym i międzynarodowym oraz publikacje.

Dorota Koscielniak, Beata Bystrowska, Anna Jurczak, Iwona Gregorczyk Maga, Iwona Kołodziej, Ryszard Drożdż, **Wirginia Krzyściak** Capillary Zone Electrophoresis (CZE) method for saliva aromatic amino acids in children caries. J. Stomatol. 2014 : Vol. 67, supl. 1, s. 160-161.

Anna Jurczak, Dorota Kościelniak, Monika Papież, Palina Vyhouskaya, **Wirginia Krzyściak**. A study on β -defensin-2 and histatin-5 as a diagnostic marker of early childhood caries progression. Biol. Res. 2015: Vol. 48, nr 1 art. 61, s. 1-9, il., bibliogr. 56 poz., abstr. Impact Factor ISI: 1.328 MNiSW: 25.000

Anna Jurczak, Dorota Kościelniak, Anna Skalniak, Monika Papież, Paulina Vyhouskaya, **Wirginia Krzyściak**. The role of the saliva antioxidant barrier to reactive oxygen species with regard to caries development. Redox Rep. 2017 : Vol. 22, nr 6, s. 524-533, il., bibliogr. 42 poz. Autor korespondencyjny: Wirginia Krzyściak. Impact Factor ISI: 2.070 MNiSW: 20.000

Od 2013 r. prowadzę badania we współpracy z Pracownią Stomatologii Dziecięcej Instytutu Stomatologii Collegium Medicum, kierowaną przez dr n. med. Annę Jurczak, w których jednym z etapów jest ocena czynników determinujących patogenność szczepów *Streptococcus* izolowanych z jamy ustnej dzieci z próchnicą. W ramach tego projektu do warsztatu badawczego została włączona ocena tworzenia biofilmu po przez ocenę ilości drobnoustrojów (CFU/ml), ocenę biomasy oraz analizę zdjęć w skaningowej mikroskopii elektronicznej. W ramach przygotowania optymalnych warunków metod badania biofilmów porównane zostały różne warunki hodowli, podłoża hodowlane, stężenia substratów oraz dokonano oceny tworzenia biofilmu mono-, dwu- i wielogatunkowego przez wybrane gatunki bakterii.

Zainteresowania biochemią biofilmu zaowocowały opracowaniem i zoptymalizowaniem kilku metod badania wybranych enzymów glikolizy, m.in.: fosfofruktokinazy (PFK) oraz kinazy pirogronianowej (PK), które wykorzystano kolejno do badań *ex vivo*. Uzyskane wyniki zostały zgłoszone do konkursów w ramach międzynarodowych konferencji, posłużyły do przygotowania wystąpień na dwóch zeszłorocznych konferencjach, organizowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Biochemiczne (International Conference on Biochemistry 10-12.10.2016 Kuala Lumpur, Malaysia) oraz Międzynarodowe Towarzystwo Mikrobiologiczne (International Conference on Microbial Physiology and Genomics 20-22.10.2016 Rome, Italy) oraz stały się przedmiotem publikacji.

Palina Vyhouskaya, Anna Skalniak, Jakub Piątkowski, Anna Jurczak, Dorota Kościelniak, Ryszard Drożdż, **Wirginia Krzyściak**. Importance of cariogenic biofilm formation in *S. mutans* carbohydrate metabolism. J. Microb. Biochem. Technol. 2016: Vol. 8, nr 6 suppl., s. 50. 3rd World Congress and Expo on Applied Microbiology, Dubaj, ZEA, 7 9.11.2016.

Palina Vyhouskaya, Anna Jurczak, Dorota Kościelniak, Anna Skalniak, Jakub Piątkowski, Ryszard Drożdż, **Wirginia Krzyściak**. New insights in the mechanisms and prophylaxis of early childhood caries. J. Microb. Biochem. Technol. 2016: Vol. 8, nr 6 suppl., s. 71. 3rd World Congress and Expo on Applied Microbiology, Dubaj, ZEA, 7 9.11.2016.

Palina Vyhouskaya, **Wirginia Krzyściak**, Anna Jurczak, Dorota Kościelniak, Ryszard Drożdż. Pyruvate kinase as a new target for anti caries agents. Biochem. Anal. Biochem. 2016: Vol. 5, nr 3 suppl., s. 28. International Conference on Biochemistry, Kuala Lumpur, Malaysia, October 10 12, 2016.

Palina Vyhouskaya, **Wirginia Krzyściak**, Anna Jurczak, Dorota Kościelniak, Ryszard Drożdż. Significance of key glycolytic enzymes in cariogenic biofilm formation. Clin. Microbiol. 2016: Vol. 5, nr 5 suppl., s. 33. 6th Clinical Microbiology Conference, Rome, Italy, October 20 22, 2016.

Wirginia Krzyściak, Palina Vyhouskaya, Paweł Krzyściak, Jakub Piątkowski, Anna Skalniak, Anna Jurczak, Dorota Kościelniak, Ryszard Drożdż. The role of pyruvate kinase (PK) and glucokinase (GCK) in *Streptococcus mutans* mixed biofilm development. *Biochem. Anal. Biochem.* 2016: Vol. 5, nr 3 suppl., s. 42. International Conference on Biochemistry, Kuala Lumpur, Malaysia, October 10-12, 2016.

Wirginia Krzyściak, Anna Jurczak, Dorota Kościelniak, Beata Bystrowska, Anna Skalniak. The usefulness of biotyping in the determination of selected pathogenicity determinants in *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiol.* (Online) 2014: Vol. 14, art. no 194, s. 1-15, il., bibliogr. 45 poz., abstr. Impact Factor ISI: 2.729 MNiSW: 30.000

Wirginia Krzyściak, Anna Jurczak, Dorota Kościelniak, Beata Bystrowska, Anna Skalniak. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014: Vol. 33, nr 4, s. 499-515, il., bibliogr. 103 poz., abstr. Impact Factor ISI: 2.668 MNiSW: 25.000

Wirginia Krzyściak, Monika Papież, Anna Jurczak, Dorota Kościelniak, Palina Vyhouskaya, Katarzyna Zagórska Świeży, Anna Skalniak. Relationship between Pyruvate Kinase Activity and Cariogenic Biofilm Formation in *Streptococcus mutans* Biotypes in Caries Patients. *Front. Microbiol.* 2017: Vol. 8, art. no. 856, s. 1-18, Impact Factor ISI: 4.076 MNiSW: 35.000

Wirginia Krzyściak, K.K. Pluskwa, Anna Jurczak, Dorota Kościelniak. The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2013: Vol. 32, nr 11, s. 1361-1376, il., bibliogr. 149 poz., abstr. Impact Factor ISI: 2.544 MNiSW: 30.000

Zainteresowania nowymi metodami leczenia chorób jamy ustnej, związanymi z formowaniem biofilmu doprowadziły do określenia wpływu lizozymu i histatyny 5 – kluczowych białek ślinowych na zdolność tworzenia biofilmu monogatunkowego *S. mutans* oraz biofilmu dwugatunkowego *S. mutans* i *L. rhamnosus*. Wyniki tych badań wskazują jednoznacznie na wrażliwość szczepów kariogennych na wybrane peptydy przeciwdrobnoustrojowe (*antimicrobial peptides*, AMPs).

Krzyściak W, Jurczak A, Piątkowski J, Kościelniak D, Gregorczyk Maga I, Kołodziej I, Papież MA, Olczak Kowalczyk D. Effect of histatin 5 and lysozyme on the ability of *Streptococcus mutans* to form biofilms in in vitro conditions. *Postepy Hig Med Dosw* (Online). 2015 Sep 20; 69:1056-66. Impact Factor ISI: 0.769 MNiSW: 15.000

W zakresie lekowrażliwości drobnoustrojów brałam udział w badaniach i przygotowaniu artykułu, razem z pracownikami Pracowni Stomatologii Dziecięcej IS UJ CM, dotyczącymi wrażliwości na leki bakterii z rodzaju *Streptococcus* izolowanych z płytki nazębnej dzieci z próchnicą. Prowadzone badania wymagały opracowania metodyki umożliwiającej wzrost badanych szczepów i ich jednoznaczne określenie przy użyciu seryjnych rozcieńczeń antybiotyku w podłożu agarowym. Prowadzone przeze mnie badania wrażliwości paciorkowców grupy *Viridans*, izolowanych z płytki nazębnej dzieci z próchnicą, na leki przeciwbakteryjne wykazały większą skuteczność *in vitro* amoksycyliny niż erytromycyny wśród szczepów należących do biotypów III i IV, w porównaniu do szczepów z biotypów I i II, które były bardziej wrażliwe na erytromycynę niż amoksycylinę, wbrew zaleceniom, by u pacjentów zagrożonych infekcjami w czasie antybiotykowej profilaktyki stomatologicznej stosować preparaty amoksycyliny.

Wirginia Krzyściak, Dorota Kościelniak, Monika Papież, Anna Jurczak, Palina Vyhouskaya. Methods of Biotyping of Streptococcus mutans Species with the Routine Test as a Prognostic Value in Early Childhood Caries. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine 2017 : Vol. 2017, Article ID 6859543, s. 115, Impact Factor ISI: 1.740 MNiSW: 30.000

Jako wykonawca w projekcie finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego dr hab. Moniki Papież *Badanie uszkodzeń DNA, apoptozy i proliferacji komórek w śledzionie oraz szpiku kostnym szczurów z białaczką promielocytową po podaniu związków o działaniu anty- lub prooksydacyjnym* zainteresowałam się podejściem do leczenia raka, polegającym na stosowaniu terapii kombinowanej z udziałem polifenoli i chemioterapii przeciwnowotworowej.

W 2016 r. na zlecenie Polskiego Towarzystwa Stomatologii Dziecięcej realizowałam jako kierownik projekt badawczy w ramach komercyjnej działalności umownej UJCM (K/KDU/000354). Celem projektu było określenie działania przeciwpróchnicowego produktów leczniczych, zawierających inaktywowane termicznie szczepy *L. salivarius* na wybrane gatunki bakterii.

W dziedzinie poszukiwania nowych związków przeciwpróchnicowych w ramach współpracy z firmą Polpharma w 2017 roku przeprowadziłam badania nad preparatem o potencjalnym wykorzystaniu klinicznym. Określiłam działanie nowo zsyntetyzowanego związku o potencjale przeciwpróchnicowym na wybrane gatunki drobnoustrojów w biofilmie mieszanym: bakteryjno-grzybiczym.

Efektom prowadzonych badań była publikacja.

Krzyściak W, Kościelniak D, Papież M, Vyhouskaya P, Zagórska-Świeży K, Kołodziej I, Bystrowska B, Jurczak A. Effect of a Lactobacillus Salivarius Probiotic on a Double-Species Streptococcus Mutans and Candida Albicans Caries Biofilm. Nutrients. 2017 Nov 14;9(11). pii: E1242. doi: 10.3390/nu9111242, Impact Factor ISI: 3.550 MNiSW: 35.000

Byłam zapraszana przez Polskie Towarzystwo Stomatologii Dziecięcej do wygłoszenia wykładów na Konferencjach Naukowo-Szkoleniowych poświęconych tematyce profilaktyki i leczenia próchnicy wczesnego dzieciństwa, a także przez Polskie Towarzystwo Stomatologiczne, Polskie Towarzystwo Mikrobiologów oraz Polpharmę.

„Nowe perspektywy w zapobieganiu próchnicy” 5.11.2015 podczas II Międzynarodowej Konferencji1. Naukowo-Szkoleniowej Stomatologii Dziecięcej „Fear&Pain 2015” <http://fearandpain.ptsd.net.pl/wykladowcy/>

„Profilaktyka próchnicy - nanotechnologia XXI wieku. Caries prophylaxis: next generation nanotechnology” - 9.10.2014 podczas I Międzynarodowej Konferencji Naukowo-Szkoleniowej Stomatologii Dziecięcej „Pulp & Prevention 2014 Kraków” <http://pulpanprevention.cm-uj.krakow.pl/pl/wykladowcy-pl.php>

„Nanotechnologia XXI wieku w profilaktyce i leczeniu próchnicy wczesnego dzieciństwa”. 12.09.2015. podczas Konferencji PTS@CEDE 2015 Stomatologia Kliniczna <https://www.cede.pl/2015/program/pts/wszystkie/?event=102>

„Determinanty patogenności *Streptococcus mutans*, a ryzyko rozwoju próchnicy - perspektywy leczenia” Zebranie ogólne PTS Oddział Kraków 15.03 2014; Centrum Konferencyjne Hotelu Galaxy, ul. Gęsia 22, Kraków, godz.11:00

„The role of selected glycolysis metabolic pathway proteins in *S. mutans* single and mixed biofilm. species”. **Wirginia Krzyściak**, Joanna Słowik, Palina Vyhouskaya TM’s 2nd World Dental Online Conference 2014; 19–21 August 2014

“Influence of the probiotic, containing *Lactobacillus salivarius* on the *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* dual-species biofilm model.” Krzyściak Wirginia 30.XI.2017 Kraków PTM Oddział Kraków

„Rola probiotyku zawierającego *Lactobacillus salivarius* w niefluorkowym zapobieganiu próchnicy zębów.” Krzyściak Wirginia 4.01.18 Polpharma; Hotel Ossa Congress & Spa Ossa 1, 96-200 Rawa Mazowiecka

Doświadczenie zdobyte w przygotowaniu monografii wykorzystałam również przy tworzeniu rozdziałów do podręcznika zagranicznego i podręcznika z zakresu stomatologii dziecięcej dla studentów.

Wirginia Krzyściak, Anna Jurczak, Jakub Piątkowski. The Role of Human Oral Microbiome in Dental Biofilm Formation. Microbial Biofilms - Importance and Applications. Rijeka: InTech, 2016. s. 329 382: il., bibliogr. 191 poz., abstr. Chapter 16. P ISBN: 97895351 24368 rozdział monografii zagranicznej, praca oryginalna.

Urszula Kaczmarek, **Wirginia Krzyściak**. Mikrobiom jamy ustnej. Współczesna stomatologia wieku rozwojowego. Otwock : Wydawnictwo Med Tour Press International, 2017. Rozdział 7. P ISBN: 978 83 87717 26 1

Obecnie mój dorobek obejmuje 28 prac oryginalnych, 6 prac poglądowych, jeden rozdział w monografii zagranicznej oraz jeden rozdział w monografii polskiej. Zgodnie z analizą bibliometryczną, łączny współczynnik oddziaływania *impact factor* całego dorobku wynosi 46.186, a odpowiadająca mu punktacja MNiSW to 546 punktów.

Prezentowane prace były cytowane 182 razy, a współczynnik Hirscha wynosi 6.

5. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

A. Tytuł osiągnięcia naukowego

Przedmiotem osiągnięcia naukowego, stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego jest cykl powiązanych tematycznie 6 publikacji zatytułowany: „***Streptococcus mutans* jako czynnik etiopatologiczny próchnicy wczesnego dzieciństwa (ECC) – diagnostyka, patomechanizm oraz terapia antybiofilmowa.**”

B. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

M-1. **Krzyściak W**, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. (2014) The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Apr;33(4):499-515. doi: 10.1007/s10096-013-1993-7. Epub 2013 Oct 24. IF ISI: 2.668; MNiSW: 25.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, doborze i analizie danych literaturowych, napisaniu manuskryptu, korekcie językowej pracy, wysłaniu pracy do redakcji, korekcie merytorycznej manuskryptu po recenzjach.

Mój udział procentowy oceniam na 76%.

M-2. **Krzyściak W**, Pluskwa KK, Piątkowski J, Krzyściak P, Jurczak A, Kościelniak D, Skalniak A. (2014) The usefulness of biotyping in the determination of selected pathogenicity determinants in *Streptococcus mutans*. BMC Microbiol. 2014 Aug 5;14:194. doi: 10.1186/1471-2180-14-194. IF ISI: 2.729; MNiSW: 30.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i zaprojektowaniu badania, opracowaniu protokołu badania klinicznego, napisaniu wniosku do Komisji Bioetycznej UJ, wykonaniu większości eksperymentów, napisaniu manuskryptu, korekcie językowej pracy, wysłaniu pracy do redakcji, analizie uwag recenzentów i korekcie merytorycznej manuskryptu po recenzjach, redakcji naukowej pracy.

Mój udział procentowy oceniam na 60%.

M-3. **Krzyściak W**, Kościelniak D, Papież M, Jurczak A, Vyhouskaya P. (2017) Methods of Biotyping of *Streptococcus mutans* Species with the Routine Test as a Prognostic Value in Early Childhood Caries. Evid Based Complement Alternat Med. 2017;2017: 6859543. doi: 10.1155/2017/6859543. Epub 2017 Jun 15. IF ISI: 1.740; MNiSW: 30.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaprojektowaniu i wykonaniu wszystkich badań, współudziale w opracowaniu kryteriów włączenia i wykluczenia z badania, opracowaniu protokołu badania klinicznego, przygotowaniu wniosku do Komisji Bioetycznej UJ, napisaniu manuskryptu, korekcie językowej pracy, wysłaniu pracy do redakcji, analizie uwag recenzentów i korekcie merytorycznej manuskryptu po recenzjach, odpowiedzi na uwagi recenzentów, redakcji naukowej pracy.

Mój udział procentowy oceniam na 77%.

M-4. **Krzyściak W**, Papież M, Jurczak A, Kościelniak D, Vyhouskaya P, Zagórska-Świeży K, Skalniak A. (2017) Relationship between Pyruvate Kinase Activity and Cariogenic Biofilm Formation in *Streptococcus mutans* Biotypes in Caries Patients. Front. Microbiol., 16 May 2017. IF ISI: 4.076; MNiSW: 35.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i zaprojektowaniu badania, przygotowaniu i przeprowadzeniu większości eksperymentów,

doborze i analizie danych literaturowych, napisaniu manuskryptu, korekcie językowej pracy, wysłaniu pracy do redakcji, korekcie merytorycznej manuskryptu po recenzjach, odpowiedzi na uwagi recenzentów, redakcji naukowej pracy .

Mój udział procentowy oceniam na 77%.

M-5. **Krzyściak W**, Jurczak A, Piątkowski J, Kościelniak D, Gregorczyk-Maga I, Kołodziej I, Papież MA, Olczak-Kowalczyk D. (2015) Effect of histatin-5 and lysozyme on the ability of *Streptococcus mutans* to form biofilms *in vitro* conditions. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. Sep 20; 69: 1056-66. IF ISI: 0.769; MNiSW: 15.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i zaprojektowaniu badania, przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów, doborze i analizie danych literaturowych, napisaniu manuskryptu, korekcie językowej pracy, wysłaniu pracy do redakcji, analizie uwag recenzentów i korekcie manuskryptu po recenzjach, redakcji naukowej pracy.

Mój udział procentowy oceniam na 71%.

M-6. **Krzyściak W**, Kościelniak D, Jurczak A, Vyhouskaya P, Zagórska-Świeży K, Kołodziej I, Bystrowska B, Papież M. (2017) Effect of a *Lactobacillus Salivarius* Probiotic on a Double-Species *Streptococcus Mutans* and *Candida Albicans* Caries Biofilm. *Nutrients*. 2017 Nov 14;9(11). IF ISI: 3.550; MNiSW: 35.000

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i zaprojektowaniu badania, przeprowadzeniu większości eksperymentów, doborze i analizie danych literaturowych, napisaniu manuskryptu, korekcie językowej pracy, wysłaniu pracy do redakcji, korekcie manuskryptu po recenzjach, redakcji naukowej pracy.

Mój udział procentowy oceniam na 75%.

Zgodnie z analizą bibliometryczną (nr 952.833.4.2018; Kraków, 5.01.2018 r.), łączna punktacja 6 prac składających się na osiągnięcie naukowe, stanowiących podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego wynosi:

IF=**15.532**; MNiSW=**170**; średni udział własny **72%**.

We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem.

Badania składające się na monotematyczny cykl publikacji zostały wykonane w następujących jednostkach naukowo-badawczych:

M-1. Pracę pogładową wykonano w Zakładzie Diagnostyki Medycznej na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM.

M-2. Kwalifikację pacjentów do badania i pobieranie materiału klinicznego wykonano w Pracowni Stomatologii Dziecięcej Instytutu Stomatologii UJ CM w Krakowie. Badania obróbki materiału klinicznego m.in. izolację wybranych gatunków bakterii z płytki nazębnej, przygotowanie i wykonanie podłoża do selektywnych hodowli wybranych gatunków bakterii z płytki nazębnej dzieci z próchnicą oraz dzieci bez objawów choroby, hodowlę i identyfikację fenotypową wybranych gatunków bakterii, biotypowanie, oznaczanie aktywności dehydrogenazy preferenianowej (PDH) w tym ekstrakcję, oczyszczanie enzymu wśród badanych szczepów, izolację DNA z wyizolowanych gatunków bakterii wykonano w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej UJCM oraz w Zakładzie Diagnostyki Medycznej na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM. Analizę genetyczną, w tym amplifikację 16S rDNA, elektroforezę i sekwencjonowanie 16S rDNA badanych gatunków bakterii wykonano w Pracowni Badań Genetycznych Kliniki Endokrynologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

M-3, M-4. Kwalifikację pacjentów do badania i pobieranie materiału klinicznego (płytki nazębnej) wykonano w Pracowni Stomatologii Dziecięcej Instytutu Stomatologii UJ CM w Krakowie. Identyfikację fenotypową badanych gatunków bakterii, identyfikację morfologiczną wyizolowanych gatunków bakterii, przygotowanie i standaryzację zawiesin badanych mikroorganizmów, oznaczenie wrażliwości na wybrane antybiotyki (amoksycylinę, cefazolinę, teikoplaninę, erytromycynę) przez badane szczepy kliniczne metodą rozcieńczeń antybiotyku w podłożu płynnym, a także stałym, biotypowanie badanych szczepów klinicznych, ocenę tworzenia biofilmu przez określenie CFU/mL, oraz całkowitej jego biomasy w warunkach *in vitro* wykonano w Zakładzie Diagnostyki Medycznej na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM. Wizualizację wytworzonego biofilmu w skaningowym mikroskopie elektronowym wykonano w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Katedry i Kliniki Otolaryngologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

M-5, M-6. Kwalifikację pacjentów do badania i pobieranie materiału klinicznego (płytki nazębnej) wykonano w Pracowni Stomatologii Dziecięcej Instytutu Stomatologii UJ CM w Krakowie. Identyfikację fenotypową badanych gatunków drobnoustrojów, identyfikację morfologiczną wyizolowanych gatunków bakterii i grzybów, przygotowanie i standaryzację zawiesin badanych mikroorganizmów, ocenę tworzenia biofilmu przez określenie CFU/mL oraz całkowitej jego biomasy w warunkach *in vitro*, a także badanie wpływu wybranych związków na zdolność tworzenia biofilmu wykonano w Zakładzie Diagnostyki Medycznej na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM oraz Zakładzie Mykologii Lekarskiej Katedry Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego UJ CM. Wizualizację wytworzonego biofilmu w skaningowym mikroskopie elektronowym wykonano w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Katedry i Kliniki Otolaryngologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

C. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Według definicji zaproponowanej przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) próchnica jest miejscowym, patologicznym procesem prowadzącym do odwapnienia twardych tkanek zęba, a następnie proteolitycznego rozkładu odsłoniętych tkanek miękkich wywołanym przez czynniki egzogenne [1,2].

Próchnica wczesnego dzieciństwa (ang. *early childhood caries*, ECC) jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych na całym świecie chorób zakaźnych wśród dzieci poniżej 6 roku życia [3]. W Polsce stwierdzana jest u ponad 85% dzieci w wieku przedszkolnym, w tym u ok. 54% dzieci 3-letnich [4,5]. Polska plasuje się w czołówce krajów o najwyższym wskaźniku próchnicy w tych grupach wiekowych [6,7,8,9,10,11].

Nieleczona ECC może doprowadzić do szybkiego i rozległego uszkodzenia zębów, a w wyjątkowych sytuacjach nawet do infekcji ogólnoustrojowych [12]. Pierwsze oznaki ECC, mimo prowadzonych działań profilaktycznych czy interwencji stomatologicznych, stwarzają wysokie ryzyko przyszłych nawrotów choroby [13,14], generując obciążenia zdrowotne i ekonomiczne.

Złożony patomechanizm choroby próchnicowej jest klasycznym przykładem wzajemnych interakcji zachodzących pomiędzy środowiskiem zewnętrznym, drobnoustrojami i podatnym gospodarzem. Jednym z kluczowych czynników w powstawaniu próchnicy jest zdolność mikroorganizmów do organizowania biofilmów na powierzchni zębów [15,16,17]. Ważnym czynnikiem mikrobiologicznym rozwoju ECC jest *Streptococcus mutans*, który przy długotrwałej ekspozycji na cukry spożywcze (np. sacharoza), tworzy zewnątrzkomórkowe glukany uważane za główny budulec macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular polymeric substance*, EPS) biofilmu. Dodatkowymi właściwościami umożliwiającymi bytowanie tym bakteriom w złożonym ekosystemie płytki nazębnej jest zdolność do przeżycia w kwaśnym środowisku, generowanym przez inne gatunki oraz wchodzenie z nimi w liczne interakcje. W tworzenie płytki nazębnej poza *S. mutans* zaangażowanych jest kilkaset innych gatunków drobnoustrojów, włączając grzyby, wirusy i bakterie [17]. Tworzenie biofilmu jest ewolucyjną adaptacją drobnoustrojów do przeżycia w niesprzyjających warunkach np. podczas presji antybiotyków [18,19].

Bakterie w biofilmie reprezentują dynamiczny, samokształtujący się ekosystem. Efektywne terapie skierowane przeciw biofilmom, powinny być ukierunkowane nie tylko na całe mikrośrodowiska, ale także na poszczególne komórki przyłączające się do istniejących ekosystemów. Generalnie istnieją dwa podejścia kontroli tworzenia biofilmów: podejście fizyczne np. poprzez stosowanie cieczy lub gazów pod zwiększonym ciśnieniem w celu oczyszczania miejsc śródoperacyjnych oraz podejście chemiczne, związane z powlekaniami powierzchni lub impregnowaniem materiałów

antybiotykami lub środkami przeciwdrobnoustrojowymi np. cement ortopedyczny z antybiotykami, srebrne powłoki rurek dotchawiczych, a także miedziane powierzchnie szpitalne.

Postęp, jaki dokonał się w odkrywaniu mikrośrodków biofilmu poprzez wykorzystanie zaawansowanych zdobyczy techniki (nanotechnologia czy inżynieria chemiczna), stwarza możliwość opracowania terapii opartej o wiele punktów uchwytu, zapobiegania biofilmom, ich dezintegracji i zwiększenia skuteczności stosowanego leczenia.

Cel przeprowadzonych badań

Celem badań było opracowanie metod wykrywania *Streptococcus mutans* i określenie jego udziału w próchnicy wczesnego dzieciństwa (ECC) oraz ocena skuteczności alternatywnych terapii antybiofilmowych (M-1 – M-6). Cel ten został zrealizowany poprzez przeprowadzenie następujących badań:

1. Przegląd literatury w zakresie określenia cech determinujących chorobotwórczość *Streptococcus mutans* i zdolność do tworzenia biofilmów oraz sposobów ich hamowania w perspektywie leczenia próchnicy
2. Opracowanie metod izolacji *S. mutans* z płytki nazębnej, identyfikacja fenotypowa i genotypowa badanych mikroorganizmów. Określenie podobieństw wśród izolatów na drodze biotypowania. Ocenę przydatności ustalonych biotypów w ocenie lekowrażliwości
3. Opracowanie i optymalizację wybranych metod oznaczania metabolizmu *S. mutans* na przykładzie dehydrogenazy preferianowej i kinazy pirogronianowej. Analiza związku pomiędzy dehydrogenazą preferianową (PDH), kinazą pirogronianową (PK) i zdolnością formowania biofilmu *S. mutans*, a ustalonymi biotypami i stanem klinicznym pacjentów od których izolowano szczepy
4. Zbadanie wpływu wybranych peptydów antybakteryjnych: histatyny-5 i lizozymu na zdolność tworzenia biofilmu przez *Streptococcus mutans*
5. Badanie wpływu probiotyku zawierającego *Lactobacillus salivarius* na zdolność formowania biofilmu dwugatunkowego przez *Streptococcus mutans* i *Candida albicans* w próchnicy wczesnego dzieciństwa.

Omówienie wyników badań stanowiących podstawę pracy habilitacyjnej wraz z ich ewentualnym wykorzystaniem

Wprowadzeniem do prac badawczych było przygotowanie pracy przeglądowej:

Manuskrypt M - 1 - Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. (2014) The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Apr;33(4):499-515. doi: 10.1007/s10096-013-1993-7. Epub 2013 Oct 24.

Przegląd ten jest próbą ustalenia, które cechy związane z tworzeniem się biofilmu - determinanty chorobotwórczości *S. mutans* - są odpowiedzialne za rozwój próchnicy.

Manuskrypt M - 2 - Krzyściak W, Pluskwa KK, Piątkowski J, Krzyściak P, Jurczak A, Kościelniak D, Skalniak A. (2014) The usefulness of biotyping in the determination of selected pathogenicity determinants in *Streptococcus mutans*. BMC Microbiol. 2014 Aug 5;14:194.

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano i zoptymalizowano metodę izolacji *S. mutans* z płytki nazębnej. W tym celu wykorzystano podłoże selektywne umożliwiające wzrost *S. mutans* i hamujące wzrost pozostałych drobnoustrojów. Dokonano oceny wzrostu najczęściej izolowanych gatunków bakterii, wykonując następujące podłoża namnażająco-wybiórcze: podłoże agarowe z wyciągiem z drożdży i cysteiną, zawierające w swoim składzie sacharozę i bacytracynę (ang. *trypticase, yeast, cystine agar supplemented with sucrose and bacitracin*, TYCSB) [20], podłoże do selektywnej hodowli *S. mutans* (ang. *Streptococcus Mutans Medium*, SMM), agar tryptozowo-sojowy z trzustkowym wyciągiem z kazeiny, sacharozą, bacytracyną, siarczanem polimyksyny i fioletem krystalicznym (podłoże HL Ritza, HLR-S) [21] oraz podłoże mitis-salivarius z bacytracyną (ang. *mitis-salivarius bacitracin*, MSB) [22]. Wyniki badań wykazały, że najlepszym podłożem selektywnym, umożliwiającym wzrost *S. mutans* z materiału klinicznego jest podłoże HLR-S, dla którego wyznaczony próg wykrywalności *S. mutans* wynosił 2×10^4 log (CFU/mL) płytki nazębnej. Uzyskane wyniki zdecydowały o wykorzystaniu podłoża HLR-S w dalszych badaniach.

W prowadzonym badaniu uzyskano częstość izolacji *S. mutans* z płytki nazębnej dzieci z próchnicą na poziomie 77% (zębów trzonowych i siekaczy 61 dzieci z próchnicą wczesnego dzieciństwa), co jest zbliżone z wynikami Kanasi i wsp. - 73% [23], Tanner i wsp. (częstość izolacji *S. mutans*=68%) [24] czy Brauncajs i wsp., którzy w Łodzi dwukrotnie otrzymywali podobne wyniki: w 2001 roku - częstość izolacji na poziomie 60% [25], oraz w 2004 roku - częstość izolacji 63% [26]. W przypadku grupy kontrolnej zanotowano istotnie niższą częstość izolacji *S. mutans* (24%), co pokrywa się z wynikami Tannera i wsp. (częstość izolacji 32%) [24]. Uzyskano 3-krotnie częstsze występowanie *S. mutans* u dzieci ze zdiagnozowaną próchnicą wczesną zębów mlecznych w porównaniu do dzieci bez widocznych objawów choroby, co tym samym potwierdza związek *S. mutans* jako czynnika etiopatologicznego próchnicy wczesnego dzieciństwa (ECC).

Identyfikację wyizolowanych gatunków bakterii prowadzono w oparciu o metody fenotypowe i genotypowe. W metodach fenotypowych korzystano z komercyjnie dostępnego testu biochemicznego STREPTOtest24. Z kolei w metodach molekularnych analizowano sekwencję 16S rybosomalnego DNA badanych szczepów i porównywano z sekwencjami zamieszczonymi w ogólnie dostępnej bazie danych

BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*). Na podstawie zgodności sekwencji zidentyfikowano gatunki. Wyniki uzyskane metodami biochemicznymi i genetycznymi były zgodne. Dla przykładu zidentyfikowany *S. intermedius* za pomocą STREPTOtest24 ze współczynnikiem dyskryminacji > 96,15%, wykazał się 99% podobieństwem z sekwencją 16S rDNA dla *S. intermedius* (np. CP003857, AP014880 GenBank) w metodach genotypowych.

Porównanie otrzymanej sekwencji wykazało 99% podobieństwo do sekwencji *S. intermedius* dostępnych w bazie BLAST. Na tej podstawie szczep (20K) zidentyfikowano jako *S. intermedius*.

Dla przypadków, w których wskaźniki dyskryminacji w metodzie fenotypowej były <95%, przy ostatecznej identyfikacji brano pod uwagę wyniki sekwencjonowania. Na uwagę zasługuje fakt, że dla wskaźników dyskryminacji >75% wyniki genotypowania pokrywały się w 75% przypadków z metodami fenotypowymi.

W celu określenia podobieństw międzygatunkowych wyizolowanych szczepów *S. mutans* przeprowadzono biotypowanie, które omówiono w publikacji *Methods of Biotyping of Streptococcus mutans Species with the Routine Test as a Prognostic Value in Early Childhood Caries*. Ocenę podobieństwa izolatów, pochodzących od różnych pacjentów dokonano na podstawie cech związanych z ich metabolizmem, m.in. z syntezą aminokwasów aromatycznych.

Kluczowym półproduktem metabolizmu *S. mutans* jest pirogronian, który przekierowany do syntezy aminokwasów aromatycznych, bierze udział w utrzymaniu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wodorowych. Biosynteza aminokwasów rozgałęzionych jest formą adaptacji gatunku do przeżycia w kwaśnym środowisku [27]. Tolerancja niskiej wartości pH i tworzenie biofilmu przez *S. mutans* są związane ze wspólnym mechanizmem [28], co stało się przedmiotem moich zainteresowań.

W badaniach podejmowano próby hamowania *S. mutans* poprzez wpływ wybranych inhibitorów na określone mechanizmy związane z przeżyciem tego gatunku m.in. celując w szlaki biosyntezy aminokwasów aromatycznych [29]. U wyizolowanych *S. mutans* zbadano aktywność jednego z kluczowych enzymów szlaku biosyntezy aminokwasów aromatycznych – dehydrogenazy preferianowej, który katalizuje przejście preferianu w 4-hydroksyfenylopirogronian (ang. *prephenate dehydrogenase*, PDH EC 1.3.1.12). Wykorzystano metodę opracowaną przez Chapney'a i Jensena dla *Bacillus subtilis* [30] z modyfikacją wg Ku i wsp. dla *S. mutans* [31]. Przeprowadzone wstępnie procedury ekstrakcji i oczyszczania enzymu pozwoliły na pomiar powstającego zredukowanego dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH), którego ilość była wprost proporcjonalna do aktywności PDH [30,32]. Enzym ten nie występuje u ludzi [31], dlatego mógłby stanowić potencjalny cel dla nowo syntetyzowanych związków o potencjalnej aktywności przeciwbakteryjnej.

Zmienna aktywność PDH zależała od źródła pochodzenia szczepów, tzn.: aktywność dehydrogenazy preferianowej była wyższa wśród izolatów pochodzących od dzieci z próchnicą, niż dzieci bez objawów choroby. Być może dehydrogenaza preferianowa jako produkt metabolizmu aminokwasów aromatycznych może stanowić jeden z czynników wirulencji *S. mutans*, podobnie jak Δ aliA and Δ ilvH u *S. pneumoniae* w bakteriemii [33]. Aktywność dehydrogenazy preferianowej porównano w kontekście proponowanych w pracy biotypów. Istnieją różnice w aktywności szczepów w obrębie określonych biotypów, przy czym biotyp I wykazuje najwyższą aktywność enzymu.

Uzyskane wyniki zainspirowały mnie do dalszych badań, w których określiłam wrażliwość na wybrane antybiotyki ww. szczepów z uwzględnieniem uzyskanych biotypów.

Manuskrypt M - 3 - Krzyściak W, Kościelniak D, Papież M, Jurczak A, Vyhouskaya P. (2017) Methods of Biotyping of *Streptococcus mutans* Species with the Routine Test as a Prognostic Value in Early Childhood Caries. Evid Based Complement Alternat Med. 2017: 6859543. doi: 10.1155/2017/6859543. Epub 2017 Jun 15.

Prace M - 3 i M - 4 zawierają opis opracowanych metod biotypowania i oceny ich przydatności do diagnostyki chorobotwórczych szczepów *S. mutans*. W prezentowanych pracach określono kryteria biotypowania szczepów klinicznych *S. mutans* izolowanych z płytki nazębnej dzieci z różnym stopniem zaawansowania choroby próchnicowej. Kolejno określono wrażliwość na wybrane antybiotyki wśród badanych szczepów bakterii i sprawdzono związek pomiędzy lekowrażliwością a wybranymi biotypami *in vitro*.

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano dwie metody ustalania biotypów wśród 143 wyizolowanych szczepów *S. mutans*. Pierwsza polegała na wybraniu wyselekcjonowanych reakcji biochemicznych na podstawie analizy ich aktywności w populacji badanych szczepów. Pięć reakcji biochemicznych występujących u wszystkich szczepów (reakcje dla L-leucyno-aminopeptydazy LAP, mannitolu MAN, laktozy LAC, trehalozy TRE), test na wzrost w obecności 6,5% NaCl, który był ujemny u wszystkich szczepów oraz 7 reakcji, które nie zachodziły u żadnego ze szczepów (β -mannozydaza bMN, β -glukuronidaza GLR, pullulan PUL, arginina ARG, rozpuszczalność w 6,5% NaCl S06, α -metylglukozydaza AMG, sorboza SOE) nie nadawało się do różnicowania i zostało odrzuconych *per se*. Kolejne siedem reakcji biochemicznych: β -glukuronidaza występująca u 90.21% szczepów, β -galaktozydaza występująca u 90.91% szczepów, α -galaktozydaza występująca u 90.21%, sorbitol występujący u 90.91%, ryboza występująca u 11.89%, maltoza występująca u 86.01% oraz rafinoza występująca u 86.01% szczepów; występujące tylko w kilku przypadkach również zostało odrzuconych, gdyż wykorzystanie tych enzymów w biotypowaniu powodowałoby, że rozkład szczepów w poszczególnych biotypach byłby niejednorodny. Oznacza to, że występowałyby zbyt duża liczba

biotypów, do których zakwalifikowano by po jednym szczepie. Kiedy zawężono kryteria biotypowania i przyjęto zakres: 10-90% szczepów z dodatnią reakcją biochemiczną, to pozostało 7 reakcji biochemicznych dających 24 profile, a więc ostatecznie 12 biotypów. Po uwzględnieniu zakresu 12,5-75% zostało 5 reakcji, dających 18 profili, a więc ostatecznie 9 biotypów. Uwzględniając zakres 15-85% zostały 3 reakcje, dające 8 profili, a więc ostatecznie 4 biotypy.

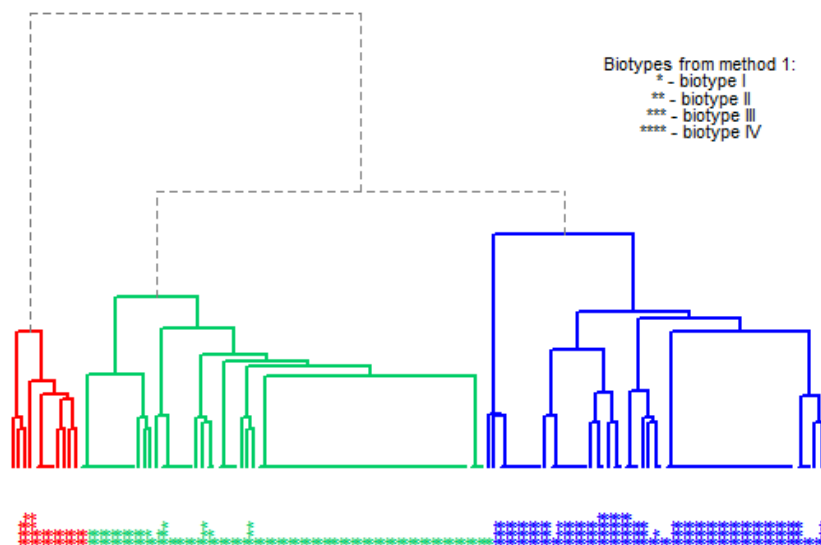
Zdecydowano się wybrać ostatnią możliwość, ponieważ przy 143 izolatach, uzyskanie 9 biotypów dawało niecałe 16 szczepów na biotyp.

Reakcje biochemiczne, które wybrano do biotypowania to reakcja na obecność polisacharydu - inuliny INU, dwucukru - melibiozy MLB i tagatozy TGT. Przyjęcie tych reakcji za kryteria biotypowania pozwoliło na zdefiniowanie 8 profili biochemicznych, umownie określonych kolejnymi literami alfabetu od A do H. Najliczniej reprezentowany był profil C cechujący się brakiem aktywności inuliny oraz tagatozy.

Rozkład otrzymanych w ten sposób profili był niejednorodny, dlatego zgrupowano do jednego biotypu szczepy, których profile różniły się tylko MLB (MLB była najbliższej wypadnięcia z zakresu 15-85%). Otrzymano cztery biotypy określone cyframi rzymskimi od I do IV dla trzech reakcji: inuliny – 40,56%, melibiozy – 83,22%, tagatozy – 21,68%.

W drugiej metodzie określania biotypów zastosowano statystyczną nienadzorowaną (bez dostępnej wiedzy *a priori*) analizę danych. Zastosowany algorytm (aglomeracyjne grupowanie hierarchiczne; ang. *agglomerative hierarchical clustering*, AHC) podzielił dane na grupy (klastry) tak, aby każda z grup była możliwie jednorodna (szczepy wewnątrz grup były podobne do siebie), a jednocześnie klastry były między sobą odmienne (szczepy z różnych grup miały jak najmniej cech wspólnych).

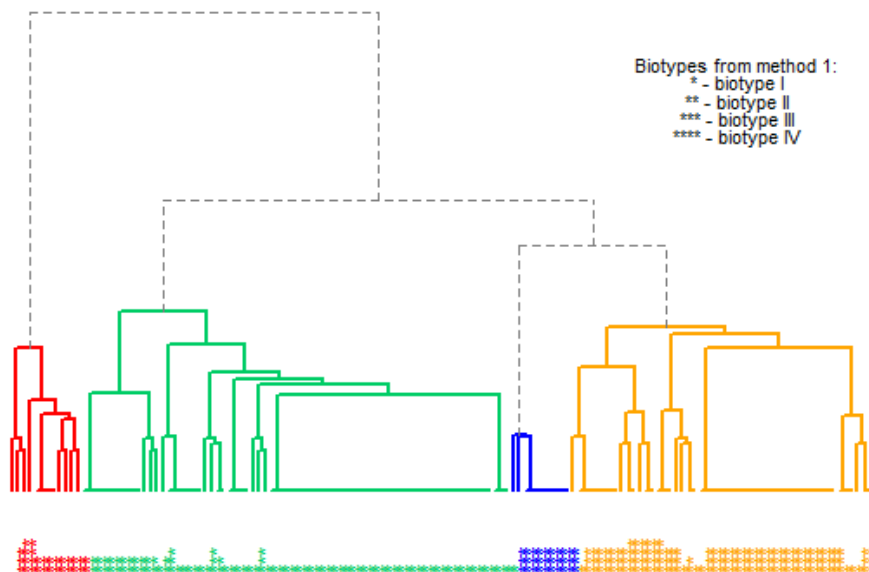
Wyniki podziałów na klastry przedstawiono w postaci dendrogramów; w przypadku najbardziej dopasowanego dendrogramu okazało się, że szczepy można różnicować na podstawie obecnej melibiozy oraz tagatozy. Uzyskano w ten sposób trzy biotypy – główne gałęzie na Rysunku 1 zaznaczone kolorami: czerwonym, zielonym i niebieskim.



Rysunek 1. Dendrogram z zaznaczonymi 3 biotypami *S. mutans* badanej populacji sporządzony w oparciu o metodę klasteryzacji (algorytm *agglomerative hierarchical clustering*, AHC). Na rycinie zaznaczono również rozkład profili enzymatycznych uzyskanych metodą arbitralną; czerwony klaster to biotyp II; zielony to biotyp I, a niebieski to biotyp III.

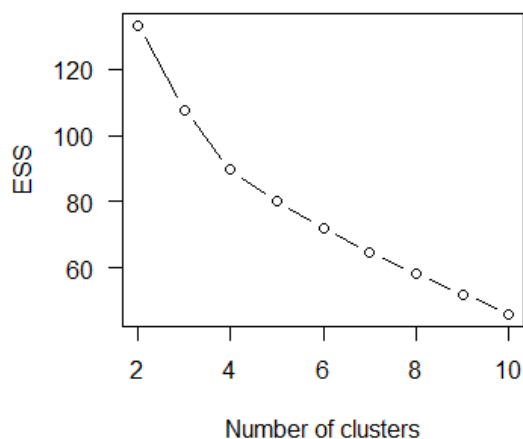
Dodatkowo sprawdzono liczbę możliwych klastrów wykorzystując obiektywną metodę profilu (*Silhouette method*). W wyniku przeprowadzonej analizy uzyskano 2 klastry zaznaczone kolorami: czerwonym i zielonym. Kryterium decydującym o odrzuceniu metody *Silhouette* był fakt, że jeden klaster miał tylko 11 obserwacji, a drugi ponad 100.

Korzystając z wyników otrzymanych w metodzie arbitralnej wykonano trzeci dendrogram obrazujący 4 klastry (Rysunek 2). Rozkład uzyskanych biotypów w ww. metodzie przedstawiał się kolejno: czerwony klaster obejmował w większości szczepy należące do biotypu drugiego (ang. *agglomerative hierarchical clustering*, AHC), ale też zdarzały się szczepy należące do biotypu III i IV; zielony klaster to w większości szczepy należące do biotypu I, ale też zdarzały się szczepy należące do biotypu II i III, niebieski klaster to szczepy należące do biotypu III, żółty klaster tworzyły szczepy należące w większości do biotypu III, ale też zdarzały się szczepy należące do biotypów I, II i IV.



Rysunek 2 Dendrogram z zaznaczonymi 4 biotypami *S. mutans* badanej populacji ustalony metodą subiektywną na podstawie metody arbitralnej. Kolory pokazują podział na 4 biotypy uzyskane za pomocą dendrogramu, a gwiazdki pod dendrogramem pokazują biotypy z metody arbitralnej.

Dodatkowo wykorzystano metodę ospypiska, określaną potocznie metodą „łokcia” (*elbow method*) w identyfikacji optymalnej liczby klastrów (Rysunek 3). Wynik analizy wydaje się zgodny z ustalonym w metodzie arbitralnej, co pokrywa się z ustalonym dla niej dendrogramem (Rysunek 2). Z wykresu widać, że łokiec jest dla 4 klastrów (bo do 4 klastrów ESS spada bardziej gwałtownie, a potem już spokojniej). Metoda ospypiska wskazuje zatem na 4 klastry podobnie jak ustalone na rysunku 2.



Rysunek 3. Ustalanie optymalnej liczby klastrów metodą „łokcia” (*elbow method*).

Zauważono, że podział na cztery klastry, choć poparty metodą obiektywną, nie miałby sensu. W przypadku dendrogramu z czterema klastrami istnieją dwa klastry, w których sklasyfikowane szczepy stanowią odpowiednio mniej niż 7% i 8% szczepów. Ponadto rozmieszczenie szczepów w ww. klastrach cechuje się dużą różnorodnością, tzn. jeden klaster jest utworzony przez szczepy z co najmniej 3 lub nawet 4 biotypów. W przypadku trzech klastrów rozmieszczenie szczepów było względnie jednorodne i zgrupowane w konkretnych biotypach, stąd ten podział był najbardziej uzasadniony.

Wyniki uzyskane przy arbitralnym doborze wybranych reakcji biochemicznych były zgodne z wynikami z analizy skupień na 3 klastry. Czynnikiem zwiększającym przydatność ustalonych biotypów była powtarzalność uzyskanych wyników w dwóch niezależnych metodach (arbitralnej i klasteryzacji - bez dostępnej wiedzy *a priori*).

Zbadano wrażliwość klinicznych szczepów *S. mutans* na wybrane antybiotyki: amoksycylinę, teikoplaninę, cefazolinę i erytromycynę. Okazało się, że szczepy z określonych biotypów wykazują różne poziomy wrażliwości (średnie wartości MIC) na wybrane antybiotyki. Zanotowano większą skuteczność *in vitro* amoksycyliny niż erytromycyny wśród szczepów należących do biotypów III i IV, w porównaniu do szczepów z biotypów I i II. Te ostatnie szczepy były bardziej wrażliwe na erytromycynę niż amoksycylinę, co jest wbrew zaleceniom, by u pacjentów zagrożonych infekcjami w czasie antybiotykowej profilaktyki stomatologicznej stosować preparaty amoksycyliny.

Uzyskane rezultaty są zgodne z wynikami Harrisona i wsp. [34], którzy nie znaleźli szczepów opornych na erytromycynę wśród izolowanych z płytki nazębnej paciorkowców. Trudno jednak porównywać wyniki uzyskane w prowadzonym badaniu (M - 3) z wcześniejszymi doniesieniami ze względu na różnice w metodologii, zmienność badanych szczepów, grupę docelową i różnice w interpretacji stref zahamowania wzrostu *S. mutans*. Oporność na amoksycylinę i erytromycynę stanowiła punkt wyjścia wielu przeprowadzonych badań, a w przypadku paciorkowców jamy ustnej była cechą zmienną tj. kiedy pojedyncze szczepy były odporne na erytromycynę, w innych przypadkach wykazywały również zmienną oporność na amoksycylinę [35]. Można założyć, że zmienna wrażliwość na antybiotyki wśród paciorkowców jamy ustnej jest uzależniona od zmieniającej się dojrzałości mikrobiomu jamy ustnej, co zostało opisane przeze mnie w rozdziale monografii *The Role of Human Oral Microbiome in Dental Biofilm Formation*. Rijeka: InTech, 2016 *Microbial Biofilms - Importance and Applications*. s. 329-382.

W przypadku paciorkowców grupy *Viridans* (VGS), które najczęściej występują w jamie ustnej m.in. *S. mutans*, mogą pojawiać się drobnoustroje oportunistyczne, które mogą być odpowiedzialne za takie choroby, jak zakaźne zapalenie wsierdźca (IE), bakteremia lub udar niedokrwienny [36, 37]. W tych przypadkach wydaje się, że decydujące znaczenie ma określenie wrażliwości na antybiotyki gatunków bakterii

VGS ze względu na rejestrowane przypadki i czynnik ryzyka rozwoju wyżej wymienionych chorób u pacjentów stomatologicznych.

W przeprowadzonych badaniach zwrócono uwagę na różny stopień wrażliwości szczepów *S. mutans* w wybranych biotypach w zależności od nasilenia próchnicy zębów. Szczepy zgrupowane w klastrach A i B u dzieci z zaawansowaną próchnicą („cavitated”) wykazywały wrażliwość na amoksycylinę i erytromycynę. Szczepy zgrupowane w obrębie klastrów B i C z grupy ‘non-cavitated’ wykazały podobną wrażliwość na amoksycylinę i erytromycynę. Co ciekawe, wyniki analizy wrażliwości na wyżej wymienione antybiotyki w tych klastrach charakteryzują się określonym fenotypem badanych szczepów, tzn. szczepy zgrupowane w klastrach B i C cechują się tym samym fenotypem związanym z brakiem rozkładu tagatozy i zmiennym metabolizowaniem melibiozy. Szczepy tworzące klaster A (głównie biotyp II) charakteryzowały się maksymalną wrażliwością na amoksycylinę i erytromycynę. Ta grupa obejmuje szczepy o innym fenotypie w porównaniu do opisanych powyżej klastrów B i C o aktywności tagatozy, ale bez aktywności inuliny i zmiennej aktywności melibiozy. We wszystkich przypadkach można zaobserwować niejednorodny rozkład szczepów rozkładających/nierozkładających melibiozę. Spadek fermentacji melibiozy jest szeroko dyskutowany w odniesieniu do różnicowania szczepów *S. mutans* [38], na co zwróciłam uwagę także we wcześniejszej pracy (M - 2). Facklam opisał biotypy dla izolatów klinicznych *S. mutans* z płytki nazębnej i krwi. W prowadzonym badaniu częstość występowania poszczególnych enzymów była porównywalna z częstością występującą u Facklama (u ponad 90% szczepów stwierdzono zdolność rozkładu: mannozy, trehalozy, sorbitolu, eskuliny). W przypadku melibiozy, 83,22% wyizolowanych szczepów wykazywało reakcję dodatnią, podczas gdy Facklam obserwował tę cechę u mniej niż połowy szczepów izolowanych z płytki (43%) i 88% szczepów izolowanych z krwi [39].

Colby i wsp. zauważyli, że szczepy *S. mutans* niefermentujące melibiozy stanowią grupę genetycznie heterogenną. Brak dystrybucji tego dwucukru może wynikać z różnych zmian genetycznych, najczęściej spowodowanych dużą delecją chromosomalną, obejmującą operon „metabolizmu wielocukrowców” (ang. *multiple sugar metabolism, msm*) [40]. W prowadzonym badaniu jest zbyt mało szczepów fermentujących melibiozę, stąd dyskusja na temat grupy szczepów zależnej tylko od tej cechy jest pozbawiona sensu. Ponadto niejednorodność rozkładu melibiozy w ustalonych biotypach/klastrach uniemożliwiła wyciągnięcie wniosków dla badanej populacji.

Manuskrypt M - 4 - Krzyściak W, Papież M, Jurczak A, Kościelniak D, Vyhouskaya P, Zagórska-Świeży K, Skalniak A. (2017) Relationship between Pyruvate Kinase Activity and Cariogenic Biofilm Formation in *Streptococcus mutans* Biotypes in Caries Patients. Front. Microbiol., 16 May 2017.

Próchnica zębów jest dynamicznym procesem patologicznym, związanym z rozwojem silnie chorobotwórczych biofilmów [41]. Czynnikiem decydującym o rozwoju choroby poza obecnością drobnoustrojów i podatnym gospodarzem jest obecność węglowodanów w diecie, które przy niskiej dostępności tlenu są

fermentowane przez bakterie z wytworzeniem kwasów organicznych [42]. Środowisko kwaśne powoduje demineralizację szkliwa, co bezpośrednio przekłada się na powstawanie ognisk próchnicy.

W prezentowanej pracy dokonano oceny zdolności badanych szczepów *S. mutans* do tworzenia biofilmu oraz oceny ich aktywności glikolitycznej podczas tego procesu. Jako wskaźnikiem tej aktywności posłużono się oceną aktywności kinazy pirogronianowej (PK), enzymu biorącego udział w ostatnim etapie glikolizy. Reakcja katalizowana przez PK uważana jest za reakcję warunkującą szybkość przebiegu całego procesu glikolizy u *S. mutans* [43]. Rola PK polega na przeniesieniu grupy fosforanowej z cząsteczki fosfoenolopirogronianu (PEP) na ADP z wytworzeniem pirogronianu. Ten ostatni wykorzystywany jest przez komórki do produkcji kwasów organicznych m.in. kwasu mlekowego. Kwas mlekowy, transportowany na zewnątrz komórki, obniża pH płytki nazębnej do wartości <5.0, a tym samym hamuje rozwój bakterii wrażliwych na zmiany środowiskowe, takich jak np. *S. sanguinis* [44]. Dlatego ilość *S. sanguinis* obecna w płytce nazębnej jest odwrotnie proporcjonalna do ilości komórek *S. mutans*. Z drugiej jednak strony, *S. sanguinis* jest mikroorganizmem wydzielającym do środowiska nadtlenek wodoru, będący czynnikiem inhibicyjnym dla *S. mutans*, który nie posiada mechanizmów skutecznej obrony przed wolnymi rodnikami tlenowymi, na co zwróciłam uwagę w prowadzonych wcześniej badaniach [45]. W wyniku wzajemnych interakcji pomiędzy drobnoustrojami, ustalany jest skład tworzonego na zębach biofilmu bakteryjnego.

Większość zakażeń wywołanych przez *S. mutans* związanych jest z tworzeniem płytki nazębnej, dlatego poddałam analizie zdolność tworzenia biofilmu przez ten gatunek. Zdolność formowania filmu biologicznego przez 143 szczepy kliniczne oceniono poprzez określenie ilości żywych komórek *S. mutans* w biofilmie, dokonując posiewów ilościowych na podłożu mitis-salivarius-bacitracin (MSB) - agar oraz poprzez pośrednią ocenę jego biomasy wykorzystując barwienie fioletem krystalicznym.

W ocenie biomasy biofilmu wykorzystano metodę z użyciem fioletem krystalicznego (CV) ze względu na jej prostotę i zadowalające w odniesieniu do innych metod odtwarzalność i dokładność (M – 4).

Sprawdzono czy, i w jakim stopniu wyizolowane szczepy *S. mutans* tworzą biofilm oraz oceniono ich aktywność metaboliczną. Wszystkie z analizowanych szczepów *S. mutans*, wyizolowane z płytki nazębnej dzieci z próchnicą, są w stanie tworzyć biofilm w warunkach *in vitro*. Oceniono zdolność tworzenia biofilmu przez szczepy wzorcowe *Streptococcus mutans* oraz szczepy izolowane z płytki nazębnej dzieci bez objawów klinicznych próchnicy w różnych podłożach hodowlanych, przy dostępności wybranych substratów odżywczych, przy różnych stężeniach testowanych związków oraz w obecności mieszanej flory bakteryjno-grzybiczej. Okazało się, że szczepy kliniczne *S. mutans* izolowane od dzieci z próchnicą tworzą znacznie większy biofilm w pożywkach sztucznych niż szczepy referencyjne, czy pochodzące od osób zdrowych.

Analiza wyników uzyskanych dla badanych szczepów w porównaniu do szczepów referencyjnych, czy pochodzących od osób zdrowych, pozwoliła na ich różnicowanie jako słabych, średnich i silnych producentów biofilmu na podstawie wytworzonej biomasy określanej pośrednio w barwieniu fioletem krystalicznym. Poziomy absorbancji zostały przyjęte subiektywnie w celu sklasyfikowania analizowanych szczepów.

Wśród szczepów izolowanych z płytki nazębnej dzieci z postacią zaawansowaną próchnicy zaobserwowano większy biofilm w porównaniu ze szczepami pochodzącymi od dzieci z postacią łagodną, oraz dzieci bez objawów choroby. Wyniki prowadzonych badań wykazały istotne różnice w zdolności tworzenia filmu biologicznego w zależności od miejsca izolacji szczepu, co doprowadziło do wniosku, że miejsce bytowania *S. mutans* stymuluje te bakterie do silniejszego tworzenia biofilmu.

Szczepy kliniczne *S. mutans* wykazywały również wyższą aktywność kinazy pirogronianowej niż szczepy wzorcowe. Zależność ta była wprost proporcjonalna do ilości komórek *S. mutans*, jak i biomasy biofilmu. W zmiennych warunkach fizykochemicznych aktywność enzymu podlegała wpływom zarówno środowiska, w którym rozwijał się biofilm, jak i wpływom towarzyszącej flory bakteryjnej. Z kolei po dodaniu surowicy czy śliny zaobserwowano zwiększenie wytwarzania biofilmu dwugatunkowego tworzonego przez szczepy *S. mutans* i *Candida albicans*.

Uzyskane wyniki zmotywowały mnie do zastanowienia się, czy współtowarzysząca flora bakteryjna może mieć wpływ na zdolność tworzenia biofilmu i aktywność metaboliczną drobnoustrojów. W ramach projektu nr: MNiSW/2016/DIR/181/NN: *Opracowanie i optymalizacja testów biochemicznych in vitro służących określeniu aktywności enzymatycznej wybranych białek biorących udział w regulacji szlaku glikolitycznego u Streptococcus mutans w biofilmach mieszanych* został stworzony warsztat do badania biofilmów nie tylko monogatunkowych, ale także mieszanych, odzwierciedlających warunki jamy ustnej.

Przeprowadzono badania nad interakcją *S. mutans* z *L. rhamnosus* i *C. albicans* (M-5, M-6). Efektem tych badań było wykazanie, że *S. mutans* jest w stanie wzrastać w biofilmach z *C. albicans* mimo panującego przekonania, że hamuje on tworzenie wspólnej struktury z *C. albicans* (m.in. przez wysyłanie cząsteczek sygnałowych tj. mutanobaktyna A, które naturalnie hamują powstawanie strzępek u *C. albicans*). Wskazuje to, że drożdże mogą dostarczać składników potrzebnych do wzrostu niektórych gatunków *Streptococcus*.

Na podstawie aktywności jednego z enzymów glikolizy – kinazy pirogronianowej oceniono aktywność metaboliczną bakterii w biofilmach. Wykorzystano metodę z dehydrogenazą mleczanową (LDH). Oznaczano aktywność enzymu w biofilmie bakterii *S. mutans* izolowanych z różnych źródeł, przy użyciu różnych podłoży hodowlanych, z różnymi substratami. Najlepszymi aktywatorami okazały się glukozo-6-fosforan, fruktozo-1,6-bisfosforan, kationy diwalentne: Mg^{2+} i kationy monowalentne K^+ a najlepszymi inhibitorami reakcji adenozy-5'-trifosforan

oraz dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy. Wybrano najlepsze substraty reakcji takie jak: fosfoenolopirogronian, oraz adenozy-5'-difosforan. Na aktywność kinazy pirogronianowej wpływ miały pH i temperatura środowiska. W przypadku biofilmów tworzonych z udziałem *S. mutans* zaobserwowano prawie 3-krotne zwiększenie aktywności kinazy pirogronianowej w środowisku obniżonego pH=5.0 w porównaniu z aktywnością przy pH=7.1.

Parametrem fizykochemicznym pośrednio związanym z przeprowadzeniem ww. reakcji enzymatycznych było stężenie tlenu panujące wewnątrz biofilmu. Niskie stężenie tlenu (<5%), czyli hipoksja panująca wewnątrz tworzonej struktury podwyższała aktywność enzymów glikolitycznych. W trakcie prowadzonych badań wykazano, że pod wpływem zwiększonej ekspozycji na tlen, dochodziło do wolniejszego rozwoju biofilmu *S. mutans* i zmian w aktywności badanych enzymów. Wykazano, że aktywność PK w biofilmie *S. mutans* hodowanym w warunkach podwyższonej dostępności tlenu była niższa o 70-120%, w porównaniu z hodowlą kontrolną, w warunkach optymalnych dla wzrostu *S. mutans* ($O_2 < 5\%$, $pCO_2 = 5\%$). Wskazywał na to poziom pH, powstały w wyniku obecności produktu przemian glikolitycznych - kwasu mlekowego, a także zmniejszona aktywność kinazy pirogronianowej PK.

Zwrócono uwagę na ilość komórek *S. mutans* log (CFU/ml) tworzących biofilm, oraz jego biomasę, które były największe po 18 godzinie. W miarę starzenia się biofilmu aktywność glikolityczna enzymu ulegała obniżeniu. Prawdopodobną przyczyną tego stanu były ograniczone miejsce do wzrostu, brak substratów odżywczych oraz chęć uniknięcia dalszego zakwaszania środowiska, gdy biofilm był coraz grubszy a stężenie kwasu mlekowego ekstremalnie wysokie. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami McNeilla i Hamiltona (2004) [46], którzy zwrócili uwagę na maksymalną aktywność białek glikolizy w czasie początkowych 24 godzin formowania biofilmu. Wraz ze zmniejszeniem biomasy filmu biologicznego i stopniową degradacją tworzących go komórek dochodzi do spadku aktywności enzymów glikolitycznych, takich jak kinaza pirogronianowa. Spadek ten związany jest z ograniczoną dyfuzją glukozy w strukturach heterogennych biofilmu, ostatecznie redukując wchłanianie glukozy. Obniżona szybkość glikolizy wraz ze spadkiem tempa wzrostu komórek w filmie biologicznym stanowią sygnał dla komórek do odrywania się od istniejącej struktury i tworzenia bardziej stabilnej i odpornej na czynniki zewnętrzne społeczności, związanej z większą zjadliwością tworzonych biofilmów.

Po dokonaniu analizy aktywności kinazy pirogronianowej naniesiono otrzymane wyniki na ustalone wcześniej biotypy i zwrócono uwagę, że aktywność enzymu związana była w sposób istotny z określonymi biotypami. W grupie szczepów niefermentujących inuliny, ale fermentujących tagatozę czy cechujących się częściową fermentacją melibiozy (klaster A, biotyp II) aktywność kinazy pirogronianowej była istotnie wyższa niż w pozostałych grupach. Uzyskane biotypy pozwoliły na różnicowanie szczepów pod względem aktywności kinazy pirogronianowej, której aktywność ściśle wiązała się z metabolizmem ww. cukrów (A>B>C oraz I>II>III).

Po dokonaniu analizy wyników zdolności tworzenia biofilmu okazało się, że zarówno ilość komórek *S. mutans*, jak i biomasa tworzonej struktury były ściśle związane z fermentacją cukrów przez szczepy z określonych biotypów. Ilość komórek w biofilmie oraz ich masa w grupie szczepów niefermentujących inuliny, ale fermentujących tagatozę czy cechujących się częściową fermentacją melibiozy (klaster A, biotyp II) była istotnie wyższa niż w pozostałych grupach. Zwrócono uwagę na istnienie dodatniej korelacji pomiędzy ilością komórek *S. mutans* w biofilmie, jego biomasa oraz aktywnością glikolityczną – im większa ilość komórek *S. mutans* i masa biofilmu, tym wyższa aktywność glikolityczna.

W przeprowadzonym badaniu zwrócono uwagę na proporcjonalny wzrost aktywności PK, biomasy biofilmu i liczby mikroorganizmów tworzących biofilm CFU /ml ilustrując główny mechanizm kontroli metabolicznej bakterii *S. mutans*. Blokowanie aktywności metabolicznej wybranych enzymów glikolitycznych takich jak kinaza pirogronianowa może stanowić punkt uchwytu dla potencjalnych leków zapobiegających nawrotom próchnicy.

Manuskrypt M - 5 - Krzyściak W, Jurczak A, Piątkowski J, Kościelniak D, Gregorczyk-Maga I, Kołodziej I, Papież MA, Olczak-Kowalczyk D. (2015) Effect of histatin-5 and lysozyme on the ability of *Streptococcus mutans* to form biofilms *in vitro* conditions. Postepy Hig Med Dosw (Online). Sep 20; 69: 1056-66.

Oddziaływania zachodzące pomiędzy *S. mutans* a drobnoustrojami kolonizującymi płytkę nazębną mogą skutkować zarówno przyspieszeniem jak i inhibicją tworzenia biofilmu. Tym sposobem patogenność *S. mutans* zależy nie tylko od warunków środowiska, lecz także od składu współtowarzyszącej mikroflory.

Analizując interakcje zachodzące pomiędzy *S. mutans* a *L.rhamnosus* jako czynników etiologicznych próchnicy prowadzono badania z wykorzystaniem hodowli podwójnych. W prezentowanym modelu grupą porównawczą były hodowle pojedyncze wybranych bakterii. Sprawdzono tolerancję pH środowiska przez wybrane szczepy kliniczne *S. mutans* i *L. rhamnosus*. Najbardziej sprzyjającym do wzrostu badanych drobnoustrojów okazało się kwaśne podłoże o pH=5. Stopniowe zwiększanie pH środowiska warunkowało słabszą tolerancję drobnoustrojów, która związana była z ich malejącym przeżyciem w tych warunkach. Z kolei podwyższenie pH do wartości 7, niemal całkowicie hamowało wzrost badanych szczepów, niezależnie od zastosowanego podłoża hodowlanego. Uzyskane wyniki stanowią dowód, że *S. mutans* posiada systemy usuwania kwaśnych metabolitów z wnętrza komórki, bez wpływu na wewnątrzkomórkowe pH. Dzięki zdolności do szybkiej i bardzo efektywnej konwersji sacharozy do kwasu mlekowego (w wyniku prowadzonej glikolizy) oraz oporności na niskie pH, *S. mutans* posiada przewagę nad pozostałymi gatunkami zasiedlającymi jamę ustną, co było widoczne w prowadzonym badaniu.

Wykazano, że bakterie *S. mutans* tworzą większy biofilm monogatunowy, niż w przypadku wspólnej hodowli z *L.rhamnosus*. Wskazuje to, że bakterie *Lactobacillus* mogą konkurować o składniki potrzebne do wzrostu *S. mutans* lub mogą produkować

czynniki m.in. bakteriocyny, które mogą działać antagonistycznie w stosunku do gatunków pozbawionych mechanizmów kompensacyjnych. Dotychczas sądzono, że bakterie *Lactobacillus* są silnie związane z rozwojem próchnicy w zębinie, ze względu na ich silne zdolności fermentacyjne cukrów do kwaśnych produktów, które obniżając pH w jamie ustnej sprzyjają rozwojowi biofilmu [47]. Z drugiej jednak strony, niskie pH oraz produkowane przez drobnoustroje *Lactobacillus* czynniki antibakteryjne takie jak: nadtlenek wodoru czy bakteriocyny, działają antagonistycznie w stosunku do gatunków nieprzystosowanych do takich warunków bytowania, np. *Porphyromonas gingivalis* [48], co decyduje m.in. o ich wykorzystaniu jako probiotyków w profilaktyce chorób jamy ustnej. Uzyskane wyniki zachęciły mnie do prowadzenia dalszych badań nad wykorzystaniem probiotyków, zawierających w swoim składzie bakterie z rodzaju *Lactobacillus* jako alternatywnych terapii antibiofilmowych. Wyniki te stanowią ostatnią część omawianego cyklu publikacji (M-6).

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs), naturalnie występujące w ślinie poprzez swoje właściwości biobójcze w stosunku do *S. mutans* są ciekawym rozwiązaniem problemu zwalczania powstawania biofilmów w kwaśnym środowisku (M-5). Wysoka zawartość histydyny i fenyloalaniny w strukturze ww. peptydów w środowisku o obniżonym pH zmienia ich naturalną α -helikalną formę łańcucha, na bardziej reaktywną formę nieuporządkowanego kłęбка [49].

Zainteresowałam się naturalnymi peptydami przeciwdrobnoustrojowymi także ze względu na ich szerokie działanie przeciwdrobnoustrojowe. AMPs mogą być użyteczne zarówno przeciwko biofilmom bakteryjnym, jak i grzybiczym [50,51].

Działanie syntetycznych AMPs jest odwrotne do ich naturalnych odpowiedników, z jednej strony posiadają domenę, która wykazuje szerokie spektrum bakteriobójcze a z drugiej strony specyficznie wiąże się z gatunkami mikrobiomu ustnego promując wzrost tzw. flory fizjologicznej [52]. Kolejną zaletą AMPs jest ich aktywność permeabilizująca błony komórkowe drobnoustrojów, dzięki której związki te wnikają z łatwością w komórki odrywające się od istniejących biofilmów, a także w populacje uśpione, co może zmniejszać szanse na rozwój oporności, obecnie szeroko obserwowanej wśród drobnoustrojów. Fakty te decydują o dużym potencjale AMPs jako terapii ukierunkowanej na biofilmy.

W wyniku przeprowadzonych badań określono wrażliwość szczepów klinicznych *S. mutans* i *L. rhamnosus* dla wybranych peptydów (histatyny-5 oraz lizozymu) zgodnie z metodą opracowaną przez Kliniczny Instytut ds. Standardów w Laboratoriach (CLSI, USA 2012). Określono minimalne stężenia hamujące (MIC) wzrost badanych szczepów przez wybrane peptydy. Zbadano ich wpływ na wzrost *S. mutans* i *L. rhamnosus*, w różnych podłożach hodowlanych, zmiennym pH i zmieniającym się ciśnieniu parcjalnemu tlenu.

Kolejno określono wpływ wybranych stężeń histatyny-5 i lizozymu na zdolność tworzenia filmu biologicznego przez *S. mutans* i *L. rhamnosus*. Do tego celu wykorzystano zamknięty model biofilmu tworzonego na ściankach oraz dnie 96-dołkowej płytki mikrotitracyjnej. Określono zdolność tworzenia biofilmu przez ocenę ilości drobnoustrojów tworzących biofilm CFU/ml oraz ocenę jego biomasy.

Wykazano, że histatyna-5, lizozym i mieszanina badanych związków hamowały wzrost szczepów klinicznych *S. mutans* i *L. rhamnosus* w stężeniach 27,2 µg/ml, 54,4 µg/ml, 108,3 µg/ml odpowiednio. W przypadku testowanych podłoży hodowlanych, środowiskiem w którym drobnoustroje wzrastały najgorzej były podłoża wzbogacone histatyną-5 i lizozymem przy pH=5. W przypadku podłoża TSB oraz surowicy, wzbogaconych badanymi peptydami, większość badanych szczepów wykazała słaby i bardzo słaby wzrost. W przypadku zastosowania śliny ludzkiej nie obserwowano zmiany intensywności wzrostu badanych szczepów, które w większości wykazywały wzrost zakwalifikowany jako bardzo słaby. Na tak słaby wzrost wpływ miały niskie pH (omówione wyżej) oraz użyte peptydy. Indukowanie aktywności AMPs pod wpływem zmieniającego się pH wydaje się obiecujące, co w przypadku wnętrza biofilmu, w którym pH może spadać <4 stanowi cel ataku AMPs i jest kluczowe, jeśli chodzi o penetrację leku do wnętrza biofilmu. Współczesne techniki syntezy leków, oparte o powolne uwalnianie substancji aktywnej w danym miejscu przez bakteryjne i zewnętrzne wyzwalacze (na przykład obecność metabolitów, lub pH) zwiększają selektywność i kontrolowane dostarczanie leków *in situ*.

Mechanizmy adhezji do powierzchni stałych umożliwiają *S. mutans* kolonizowanie jamy ustnej i tworzenie biofilmów, które odgrywają ważną rolę w rozwoju próchnicy. Dodatkowe właściwości umożliwiające przeżycie *S. mutans* w jamie ustnej wiążą się z jego zdolnością do przetrwania w kwaśnych środowiskach i specyficznych interakcji z innymi mikroorganizmami zamieszkującymi ten ekosystem. Określono aktywność przeciwbakteryjną histatyny-5 i lizozymu w stosunku do *S. mutans* i *L. rhamnosus*. W badaniu wykorzystano szczepy należące do flory fizjologicznej (*L. rhamnosus*) i odpowiedzialne za wywoływanie próchnicy u ludzi (*S. mutans*), wyizolowane z płytki nazębnej dziecka z próchnicą wczesną zębów mlecznych (ECC). Obecność bakterii probiotycznych *L. rhamnosus* wpłynęła negatywnie na zdolność wytwarzania biofilmu przez *S. mutans*. Potwierdzono działanie przeciwbakteryjne histatyny-5, która hamowała wzrost *S. mutans* w stężeniach 27,2 µg/ml i 54,4 µg/ml, zarówno indywidualnie, jak i w mieszaninie z lizozymem (w stężeniu 54,4 µg/ml). Wyniki są obiecujące ze względu na ich potencjalne dalsze wykorzystanie w zapobieganiu i wczesnej diagnostyce próchnicy.

Konieczne są dalsze badania w modelach zwierzęcych, aby potwierdzić lub wykluczyć faktyczną skuteczność wybranych peptydów antydrobnoustrojowych, ponieważ związki te mogą wiązać się z komponentami macierzy EPS i innymi cząsteczkami gospodarza, co może zmniejszać ich skuteczność. Ponadto negatywny wpływ na ich potencjał terapeutyczny mogą mieć proteazy drobnoustrojowe.

Manuskrypt - M - 6 - Krzyściak W, Kościelniak D, Jurczak A, Vyhouskaya P, Zagórska-Świeży K, Kołodziej I, Bystrowska B, Papież M. (2017) Effect of a Lactobacillus Salivarius Probiotic on a Double-Species Streptococcus Mutans and Candida Albicans Caries Biofilm. Nutrients. 2017 Nov 14;9(11).

Badania nad wzajemnymi oddziaływaniami pomiędzy *S. mutans* a współtowarzyszącą florą z mikrobiomu ustnego stały się interesujące w kontekście

oddziaływań bakteryjno-grzybiczych tworzonych biofilmów nazębnych. Oddziaływania zachodzące pomiędzy *S. mutans* a *C. albicans*, kolonizującymi płytkę nazębną dzieci z próchnicą stały się przedmiotem niniejszej pracy.

Interakcje pomiędzy mikroorganizmami z tzw. flory fizjologicznej z gatunkami potencjalnie próchnicotwórczymi są przedmiotem współczesnych zainteresowań tzw. bioterapii jamy ustnej, których celem są m.in. nieaktywne metabolicznie komórki w biofilmach (formy planktoniczne) czy innych zajmowanych niszach (dziąsła, ślina) z mikrobiomu ustnego. Uważa się bowiem, że w proces formowania chorobotwórczych biofilmów, poza uznanymi czynnikami etiologicznymi takimi jak *S. mutans* zaangażowane są także formy nieaktywne metabolicznie, które mogą występować zarówno jako formy planktoniczne, jak i drobnoustroje związane z filmami biologicznymi. Pod wpływem warunków środowiskowych mogą one ulegać spontanicznej aktywacji, powodując niekontrolowane zaburzenia mikrośrodowiska biofilmu [53].

W wyniku prowadzonych badań wyizolowano *S. mutans* oraz *C. albicans* z płytki nazębnej dzieci z próchnicą wczesną. Dane te są dość zaskakujące, ponieważ w hodowlach komórkowych prowadzonych *in vitro*, komórki drożdży *C. albicans* zwykle nie agregują dobrze z *S. mutans*, a także nie występują samodzielnie na zębach. Przeciwnie, w warunkach *in vivo* *C. albicans* współdziała z paciorkowcami jamy ustnej w tworzeniu biofilmów na powierzchniach akrylowych czy błonach śluzowych, będących przyczyną infekcji błon śluzowych jamy ustnej. W prowadzonych badaniach wzajemne oddziaływania pomiędzy izolatami *S. mutans* i *C. albicans* były zwiększone w obecności sacharozy. W obecności *S. mutans* i przy dostępności sacharozy, drożdże tworzyły strzępki, dzięki czemu wykazywały lepszą przyczepność do powierzchni niż przy braku sacharozy i przy braku obecności *S. mutans*. Ponadto wykazano większy biofilm *C. albicans* w hodowli wspólnej z *S. mutans*, w porównaniu z biofilmami monogatunkowymi *C. albicans*, *S. mutans*, co wskazuje, że *S. mutans* stymuluje wzrost *C. albicans*. Chociaż mechanizm molekularny dla obserwowanych zjawisk jest bliżej nieokreślony, niektórzy badacze tłumaczą wzajemne interakcje pomiędzy *S. mutans* i *C. albicans* nadmierną ekspresją genów związanych z transportem węglowodanów i prowadzoną glikolizą. Te i wiele innych, jeszcze nieznanymi, unikatowych efektów zwiększają właściwości adhezyjne obu mikroorganizmów w kolonizacji powierzchni zębów.

Kontynuując badanie wzajemnych interakcji pomiędzy drobnoustrojami z tzw. flory fizjologicznej, do których należy *Lactobacillus* a mikroorganizmami kariogennymi, do których należą *S. mutans* i *C. albicans* określono wpływ probiotyku, zawierającego *Lactobacillus salivarius* na zdolność formowania biofilmu monogatunkowego *S. mutans*, *C. albicans* i dwugatunkowego *S. mutans* i *C. albicans*.

Zwrócono uwagę, że wyizolowany *L. rhamnosus* wykazywał działanie antagonistyczne w stosunku do *S. mutans*. Tym razem do badania posłużył szczep *L. salivarius*, znajdujący się w preparacie probiotycznym - HM6 Paradens. Wyniki pokazały, że ww. preparat zahamował tworzenie się biofilmu monogatunkowego *S. mutans*, *C. albicans* i biofilmu dwugatunkowego *S. mutans* i *C. albicans* znacznie

bardziej niż *L. rhamnosus*, który mógłby być kandydatem na probiotyk o aktywności przeciwpróchnicowej. Analiza w skaningowym mikroskopie elektronowym wykazała, że hodowla wspólna *S. mutans* z HM6 dawała znacznie mniejszy biofilm monogatunkowy i dwugatunkowy w porównaniu do hodowli kontrolnej bez probiotyku. Wyniki analizy ilości komórek *S. mutans* w filmie biologicznym i pomiary jego biomasy wykazały, że *L. salivarius* ma silniejszą aktywność bakteriobójczą przeciwko *S. mutans* niż zastosowany wcześniej *L. rhamnosus*.

Wiele badań klinicznych wskazuje, że codzienne spożycie produktów mlecznych zawierających bakterie z rodzaju *Lactobacillus* może hamować próchnicę, poprawiać ogólny stan zdrowia i zmniejszać potrzebę stosowania antybiotyków u dzieci w wieku przedszkolnym. Jednak nie wszystkie dzieci spożywają produkty mleczne równie bogate w probiotyki. Dodatkowo wpływ preparatów probiotycznych na zdrowie jamy ustnej i hamowanie próchnicy u dzieci nie jest całkowicie jasny, a efekty podawania probiotyków wydają się krótkotrwałe i często są skierowane wyłącznie na redukcję próchnicy poprzez wyłącznie hamowanie *S. mutans* w ślinie, bez wpływu na pozostałe gatunki drobnoustrojów, których obecność została potwierdzona w rozwoju próchnicy zębów.

Lactobacillus salivarius (HM6 Paradens) może działać jako inhibitor enzymów proteolitycznych, tj. proteaz aspartylowych (Saps) *C. albicans*, które są uważane za główny czynnik wzajemnych oddziaływań bakteryjno-grzybiczych. W skaningowym mikroskopie elektronowym widać wyraźnie, że hodowle wspólne były obfite w tworzone przez drożdże strzępki czego nie było widać po zastosowaniu probiotyku. Podczas oceny morfologii drożdży zauważono, że *L. salivarius* hamował tworzenie się form zarodnikowych i pseudogrzybni w hodowli wspólnej *S. mutans* i *C. albicans*. Prezentowane wyniki wydają się interesujące tym bardziej, że do tej pory przypuszczano, że to *S. mutans* w mieszanym biofilmie z *C. albicans*, wysyła cząsteczki sygnałowe, takie jak mutanobaktyna A, które naturalnie hamują powstawanie strzępek u *C. albicans*, zapobiegając tym samym rozwojowi biofilmów kariogennych. *C. albicans* we wzajemnych oddziaływaniach z *S. mutans* dominuje w rywalizacji o unikalne nisze ekologiczne takie jak ubytki i powierzchnie złamań w zębach [54], a dzięki swojej naturalnej zdolności do tigmotropizmu przenika głęboko w otwarte kanaliki zębinowe. *C. albicans* prowadzi do rozwoju agresywnej próchnicy i przyczynia się do szybkiego postępu choroby [55,56]. Wyniki badania wpływu *L. salivarius* na biofilm dwugatunkowy *S. mutans* i *C. albicans* są próbą odpowiedzi na pytanie, dlaczego współczesne terapie próchnicy nie są tak skuteczne, jak metody przesiewowe służące diagnozowaniu dzieci zagrożonych rozwojem próchnicy wczesnego dzieciństwa. Przyszłe badania powinny się skupiać na ocenie wzajemnych relacji pomiędzy potencjalnie oddziałującymi ze sobą mikroorganizmami (patogennymi i niepatogennymi). Podejście oparte na obecnym stanie wiedzy na temat próchnicy, zwiększa szanse na zrozumienie patogenezы tej choroby i może prowadzić do powstania nowych sposobów zapobiegania tej chorobie.

Wiele badań z użyciem probiotyków jest kontrowersyjnych, gdyż ukazują je jako środki hamujące wzrost monokultur *S. mutans* bez wpływu na kariogenność biofilmów wielogatunkowych. Bardziej uzasadnione wydaje się badanie wpływu probiotyków na wzajemne relacje między różnymi gatunkami mikroorganizmów tworzących film biologiczny i hamujących próchnicogenne *S. mutans*. Wyniki badań (M - 6) związane z hamowaniem tworzenia biofilmu, nie tylko *S. mutans*, ale także biofilmu dwugatunkowego *S. mutans/C. albicans* wskazują, że użycie *Lactobacillus salivarius* (HM6 Paradens) jest uzasadnione. Dodatkowo, zaproponowane przez Koo i Bowena [57], rozwiązanie użycia w środkach przeciwpróchnicowych czynnika o potencjale przeciwgrzybiczym wydaje się uzasadnione w przypadku przyszłych terapii próchnicy wczesnego dzieciństwa ECC.

Chociaż istnieje wiele badań ukazujących wzajemne interakcje grzybów z bakteriami, w tym *S. mutans*, większość mechanizmów odpowiedzialnych za te oddziaływania pozostaje niewyjaśnionych. Niedawno pojawiło się kilka kluczowych odkryć, które charakteryzują cząsteczki biorące udział we wzajemnych oddziaływaniach *S. mutans* z *C. albicans*. Jednak modele te nie uwzględniają czynników związanych z gospodarzem i patogennością szczepów zależnych od środowiska gospodarza. Wiadomo, że w pewnych warunkach bakterie lub grzyby nabywają cechy, które decydują o ich chorobotwórczości [58]. Prezentowany model ma tę zaletę, że bierze pod uwagę szczepy kliniczne, pochodzące ze źródła infekcji (płytką nazębną od dzieci z próchnicą), które rozwinęły swoją zjadliwość w odpowiedzi na środowisko, w którym istnieją. Potwierdzają to wyniki interakcji między *S. mutans* i *C. albicans*, które związane są z czynnikami chorobotwórczymi, takimi jak grzybnia i pseudogrzybnia w hodowli wspólnej. W praktyce klinicznej podobne objawy są manifestacją czynnej infekcji ze strony *C. albicans*, która prowadzi do rozwoju ciężkiej próchnicy. Kontynuując uzyskane w pracy M - 6 wyniki badań oceniono czynnik wzrostu strzępek ALS3, który, jak widać w badaniach Ellepoli i wsp. [59], może stanowić potencjalny mechanizm wzrostu grzybni w biofilmie dwugatunkowym *S. mutans/C. albicans*. Ponadto zweryfikowano, w jaki sposób dostępne składniki odżywcze, z wyjątkiem sacharozy, modyfikują wyżej obserwowane czynniki wirulencji. Powyższe obserwacje mogą wyjaśniać wzajemne interakcje *S. mutans* i *C. albicans* w tworzeniu kariogennych biofilmów i stanowić strategię tworzenia lub wykorzystania cząsteczek o potencjale przeciwpróchnicowym. Wyniki badań nad hamowaniem próchnicy zależnej od biofilmów dwugatunkowych *S. mutans/C. albicans* stanowią kierunek moich dalszych badań nad preparatem zawierającym *L. salivarius* w badaniach *in vivo*.

Wnioski

- 1) Chorobotwórczość szczepów *S. mutans* zależy od warunków środowiskowych, związanych z podatnością gospodarza, współtowarzyszącą mikroflorą oraz warunkami fizyko-chemicznymi

- 2) Test STREPTOtest24 może służyć do biotypowania szczepów *Streptococcus mutans*
- 3) Szczepy *S. mutans* różnią się pod względem wrażliwości na leki, zdolnością tworzenia biofilmu oraz aktywnością enzymów glikolizy i enzymów metabolizmu aminokwasów aromatycznych
- 4) *S. mutans* wchodzi w interakcję z *C. albicans* i wbrew dotychczasowym poglądom nie hamuje tworzenia strzępek, a wręcz działa przeciwnie wzmagając proces hyfogenezy
- 5) Peptydy zawarte w ślinie wykazują działanie anti-biofilmotwórcze, szczególnie w niskim pH, jakie panuje wewnątrz biofilmów
- 6) Stosowanie szczepów probiotycznych *L. salivarius* daje lepsze rezultaty niż stosowanie szczepów *L. rhamnosus* w zwalczaniu kariogennych *S. mutans*

Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych badań, będących podstawą osiągnięcia naukowego, zidentyfikowano i określono udział procentowy bakterii obecnych w płytce nazębnej dzieci z próchnicą wczesnego dzieciństwa ECC. Dla wyizolowanych szczepów klinicznych *S. mutans* określono charakterystyczne biotypy enzymatyczne, które scharakteryzowano pod względem wrażliwości na wybrane antybiotyki i oznaczono wybrane determinanty patogenności powyższych szczepów, takie jak aktywność dehydrogenazy preferianowej, kinazy pirogronianowej czy zdolność formowania biofilmu.

Pod uwagę zostały wzięte determinanty patogenności *S. mutans*, które są istotne z punktu widzenia leczenia objawowego oraz modyfikujące przebieg choroby. Badania skupiły się na enzymach glikolizy jako głównego szlaku metabolicznego umożliwiającego *S. mutans* kolonizowanie i przetrwanie w jamie ustnej. Glikoliza jest głównym źródłem energii i tworzenia bloków budulcowych dla mikroorganizmów kariogennych, dlatego zahamowanie tego procesu wydaje się obiecującym sposobem walki z próchnicą.

Efektom prowadzonych badań było określenie i zoptymalizowanie testów biochemicznych pozwalających na ocenę aktywności wybranych enzymów glikolizy podczas formowania biofilmu przez *S. mutans* oraz enzymów szlaku biosyntezy aminokwasów aromatycznych, na przykładzie dehydrogenazy preferianowej, niewystępującej u ludzi, a obecnej u *S. mutans*.

Wykazano, że adekwatną miarą do przewidywania potencjalnej aktywności powyższych enzymów jest zmiana ilości drobnoustrojów skumulowanych w postaci biofilmu i masa tworzonej struktury. Uzupełnieniem badań nad ww. metodami oceny stanu metabolicznego *S. mutans* jest określenie mechanizmu hamowania biofilmu *S. mutans* przez wybraną kombinację peptydów antydrobnoustrojowych, a także

preparatu probiotycznego, zawierającego przedstawiciela flory fizjologicznej – *L. salivarius*. Potwierdzono, że tworzenie biofilmu zachodzi wolniej pod wpływem wybranych związków oraz wykazano, że istotną rolę w formowaniu biofilmu bakteryjno-grzybiczego odgrywają wzajemne oddziaływania potęgujące zjadliwość tworzonych struktur.

Badania te potwierdziły również dużą rolę oddziaływań między paciorkowcami jamy ustnej a drożdżami w transformacji morfologicznej chorobotwórczych grzybów.

Opracowane metody będą stanowiły bazę dla projektowania inhibitorów enzymatycznych oraz inhibitorów formowania biofilmu. Dzięki zastosowaniu metod *in vitro* ukierunkowanych na inhibicję kinazy pirogronianowej i dehydrogenazy preferenowej rysuje się możliwość przyszłych badań nad terapią kombinowaną z użyciem inhibitorów ww. enzymów w połączeniu z peptydami przeciwdrobnoustrojowymi. Szczególnie obiecujące wydaje się połączenie inżynierii chemicznej z nanotechnologią, wśród których obiecujące wydają się wielofunkcyjne inhibitory PK/PDH połączone z AMPs wycelowane na mikrośrodowisko biofilmu, co dzięki lokalnemu uwalnianiu tych związków może znacznie ograniczyć układową cytotoksyczność i wzmocnić rozpraszanie filmów biologicznych *S. mutans*.

Podsumowując, badania stanowiące podstawę habilitacji, doprowadziły do opracowania metod oznaczania wybranych determinant patogenności szczepów klinicznych *S. mutans* oraz metod diagnostycznych służących monitorowaniu wirulencji ww. drobnoustrojów, co może mieć potencjalne zastosowanie w terapii i profilaktyce próchnicy wczesnego dzieciństwa (ECC). Aplikacja tych metod do modelu klinicznego, uwzględniająca wzajemne oddziaływania drobnoustrojogospodarz znacząco podnosi rangę prowadzonych badań i stanowi przesłankę do przyspieszonych prac badawczych umożliwiających otrzymanie nowych aktywnych związków, które będą rozwijane w modelach *in vitro* i *in vivo*, a w przyszłości mogą być wdrożone jako lek.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Prowadzone badania naukowe związane były z następującymi zagadnieniami:

1. Patomechanizm, diagnostyka i leczenie przewlekłej choroby żylniej (PChŻ)
2. Rola stresu oksydacyjnego u pacjentów z cukrzycą
3. Wpływ związków o działaniu przeciwzapalnym i/lub przeciwutleniającym na leczenie białaczki promielocytowej w modelu *in vitro* i *in vivo*
4. Wpływ pochodnych ksantenu na wybrane parametry oksydacyjno-antyoksydacyjne *in vitro* i *ex vivo*
5. Ocena właściwości antyoksydacyjnych i antymikrobiotycznych wyciągów z derenia jadalnego
6. Rola stresu oksydacyjnego u pacjentów z liszajem płaskim jamy ustnej
7. Znaczenie stresu oksydacyjnego u pacjentów z chorobą Crohna

8. Zmiany wybranych wskaźników obrony antyoksydacyjnej we krwi pacjentów po rutynowym badaniu tomografii komputerowej o wysokiej rozdzielczości (*high resolution computed tomography*, HRCT)
9. Rola Nrf2 w regulacji stresu oksydacyjnego jako narzędzie oceny jakości nasienia w niepłodności męskiej
10. Poszukiwanie nowych markerów oceny występowania i progresji próchnicy wczesnego dzieciństwa (ECC)

1. Patomechanizm, diagnostyka i leczenie przewlekłej choroby żyłnej (PChŻ)

Poza określeniem roli stresu oksydacyjnego w patofizjologii przewlekłej choroby żyłnej (PChŻ) uczestniczyłam w badaniach poświęconych ocenie wpływu stosowanej terapii na mikrokążenie u pacjentów cierpiących na PChŻ. Badania prowadzone były we współpracy z Kliniką Chirurgii Naczyniowej Uniwersyteckiego Szpitala w Krakowie a także Katedrą i Kliniką Chirurgii Naczyń i Angiologii Akademii Medycznej im. Prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie pod kierunkiem Profesora Tomasza Zubilewicza. Zdobyte doświadczenie stało się dla mnie szczególnie interesujące ze względu na trwające obecnie ustalenia konsensusu, co do stosowanej terapii u pacjentów w różnym stopniu nasilenia choroby (od C2-C5 wg klasyfikacji CEAP).

Biorąc pod uwagę, że jednym z czynników patogenetycznych PChŻ jest stres oksydacyjny - oceniłam uszkodzenia oksydacyjne DNA leukocytów izolowanych z krwi obwodowej i zastoinowej, pacjentów stosujących Detralex. Badania wykonywałam metodą elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym. Pomiar uszkodzeń oksydacyjnych wykonywałam w oparciu o wykrywaną 8-oksoguaninę przy użyciu Fpg (formamidopirymidyno-DNA glikozydazy), enzymu posiadającego aktywność N-glikozyazy i AP endonukleazy. Zebrane wyniki opisane zostały w artykule na łamach *Open Cardiovascular Medicine Journal*.

Krzyściak W, Cierniak A, Kózka M, Kozieł J. Oxidative DNA Damage in Blood of CVD Patients Taking Detralex. *Open Cardiovasc Med J.* 2011;5:179-87. doi: 10.2174/1874192401105010179. Epub 2011 Aug 1.

Poszukując nowych metod terapii PChŻ zajęłam się oceną porównawczą wpływu zmikronizowanej oczyszczonej frakcji flawonoidów MPFF oraz dobesyłanu wapnia na poziom śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF w adhezji mediowanej przez integryny β_2 . Nadciśnienie żyłne należy do głównych czynników regulujących ekspresję VEGF w komórkach śródbłonka naczyń żylnych i prowadzi do aktywacji leukocytów oraz komórek śródbłonka. Proangiogenne działanie VEGF stymuluje keratynocyty i komórki mięśni gładkich do tworzenia nowych naczyń. Nowopowstałe naczynia są bardziej przepuszczalne niż naczynia powstające fizjologicznie. Powoduje to okołonaczyniowe nagromadzenie się dużych cząsteczek, będące istotą teorii mankietu fibrynowego tłumaczącej wiele stanów zapalnych. Przyspieszona proliferacja, migracja i adhezja makrofagów do śródbłonka naczyń żylnych stanowi

jeden z mechanizmów regulujących zwiększenie ilości miejsc wiążących dla genu KDR na receptorze VEGF. Wstępne wyniki prowadzonych badań zaprezentowałam na konferencji międzynarodowej poświęconej molekularnym i fizjologicznym procesom zachodzącym w organizmie.

Wirginia Krzyściak. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) as a marker of leukocytes adhesion to extracellular matrix (ECM) mediated by β_2 integrins. 19th International Symposium "Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism", Cracow, June 11-12.2010. s. 171-173 : bibliogr. 26 poz.

Planowane są dalsze badania z Katedrą i Kliniką Chirurgii Naczyń i Angiologii Akademii Medycznej im. Prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie kierowaną przez Prof. Profesora Tomasza Zubilewicza, zmierzające do określenia wpływu stosowanego leczenia na proponowany mechanizm u pacjentów operowanych z powodu PChŻ.

2. Rola stresu oksydacyjnego u pacjentów z cukrzycą

Uczestniczyłam w badaniach prowadzonych przez mgr Grzegorza Kazka, dotyczących roli stresu oksydacyjnego u chorych z cukrzycą LADA. Szereg metod badania stanu oksydacyjno-antyoksydacyjnego zostało zwalidowanych i zoptymalizowanych do warunków laboratoryjnych przy wykorzystaniu materiału klinicznego jakim była krew pacjentów z cukrzycą LADA. Wynikiem prowadzonych badań były wystąpienia ustne podczas konferencji międzynarodowych.

Grzegorz Kazek, **Wirginia Krzyściak**, Marek Stępniewski. Oxidative protein modification in cell signaling: a short review. Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism : materials of 17th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology/ed. by Henryk Lach; Pedagogical University of Cracow. s. 202-206 : il., bibliogr.

Grzegorz Kazek, **Wirginia Krzyściak**, Beata Kurdas, Krzysztof Iwanicki, Marek Stępniewski. (2008) Antioxidants and lipid peroxidation in latent autoimmune diabetes in adults (LADA). Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism : materials of 17th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology/ed. by Henryk Lach; Pedagogical University of Cracow. s. 198-201

3. Wpływ związków o działaniu przeciwzapalnym i/lub przeciwutleniającym na leczenie białaczki promielocytowej w modelu *in vitro* i *in vivo*

Jako wykonawca w grantie finansowanym przez MNiSzW dr hab. Moniki Papież, pt.: *Badanie uszkodzeń DNA, apoptozy i proliferacji komórek w śledzionie oraz szpiku kostnym szczurów z białaczką promielocytową po podaniu związków o działaniu anty- lub prooksydacyjnym* dokonałam oceny wybranych parametrów stanu oksydacyjno-antyoksydacyjnego w komórkach, krwi i materiale tkankowym szczurów z przeszczepialną białaczką promielocytową. Uzyskane wyniki dowodzą, że badane związki roślinne selektywnie zwiększają wrażliwość komórek białaczkowych na klasyczną terapię przeciwnowotworową. Badania te opublikowano na łamach

międzynarodowych czasopism, a także zaprezentowano podczas krajowych i międzynarodowych konferencji naukowych.

Monika A. Papież, **Wirginia Krzyściak**, Krzysztof Szade, Karolina Bukowska-Strakova, Magdalena Kozakowska, Karolina Hajduk, Beata Bystrowska, Jozef Dulak, Alicja Jozkowicz. Curcumin enhances the cytogenotoxic effect of etoposide in leukemia cells through induction of reactive oxygen species. *Drug Des Devel Ther.* 2016 Feb 4;10:557-70. doi: 10.2147/DDDT.S92687. eCollection 2016. Impact Factor ISI: 2.822; Punktacja MNiSW: 30.000

Papież MA, **Krzyściak W**, Wasik M. Inhibition of myeloperoxidase activity have impact on the formation of DNA double-strand breaks induced by etoposide in HL-60 cell line. *Folia Med Cracov* 2015;55 (1): 43-51. 10 pkt. Impact Factor ISI: 0; Punktacja MNiSW: 10.000

Monika A. Papież, **Wirginia Krzyściak**. The antioxidant quercetin protects HL-60 cells with high myeloperoxidase activity against pro-oxidative and apoptotic effects of etoposide. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(4):795-9. Epub 2014 Dec 11. Impact Factor ISI: 1.153; Punktacja MNiSW: 15.000

Monika A. Papież, Karolina Bukowska-Strakova, **Wirginia Krzyściak**, Jarosław Baran. (-)-Epicatechin Enhances Etoposide-induced Antileukaemic Effect in Rats with Acute Myeloid Leukaemia. *Anticancer Res.* 2012 Jul;32(7):2905-13. Impact Factor ISI: 1.713; Punktacja MNiSW: 20.000

Monika A. Papież, Małgorzata Dybala, Magdalena Sowa-Kucma, **Wirginia Krzysciak**, Hevidar Taha, Alicja Jozkowicz, Gabriel Nowak. Evaluation of oxidative status and depression-like responses in Brown Norway rats with acute myeloid leukemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009 Jun 15;33(4):596-604. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.02.015. Epub 2009 Mar 3 wskaźnik Impact Factor ISI: 2.823; Punktacja MNiSW: 24.000

Monika A. Papież, A. Cierniak, **Wirginia Krzysciak**, M. Bzowska, H.M. Taha, A. Jozkowicz, M. Piskula. The changes of antioxidant defense system caused by quercetin administration do not lead to DNA damage and apoptosis in the spleen and bone marrow cells of rats. *Food Chem Toxicol.* 2008 Sep;46(9):3053-8. doi: 10.1016/j.fct.2008.06.006. Epub 2008 Jun 19. wskaźnik Impact Factor ISI: 2.321; Punktacja MNiSW: 24.000

Wirginia Ostafin, A. Cierniak, Monika A. Papież (2007) Disturbance of oxidant-antioxidant balance in rats with mieloid leukaemia. *Acta Haematol. Pol.* XXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów pod patr. Ministra Zdrowia, Warszawa, 6-8 września 2007. 2007 : T. 38 supl. 2, s. 369-370, abstr. 304.

Monika Papież, A. Cierniak, **Wirginia Ostafin**, M. Piskula, M. Kapiszewska.(2007) The pro-oxidant activity of quercetin does not lead to DNA damage in vivo. *Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism: materials of 16th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology, Cracow, June 4-6, 2007 / ed. by Henryk Lach ; Pedagogical University of Cracow. Kraków: Wydawnictwo Naukowe AP, 2007 s. 365-366.*

Monika A. Papież, Tomasz Mikołajczyk, **Wirginia Krzyściak**. (2008) The influence of (-)-epicatechin on extent of DNA damage and apoptotic cell death in the bone marrow and spleen of rats with acute myeloid leukemia. *XIII International Congress of Histochemistry and Cytochemistry ICHC2008 Imaging of Cell Dynamics, Gdansk, Poland, 23rd-27th August 2008.* 2008: Vol. 46 supl. 2, s. S68, abstr. P2.28

Wirginia Krzyściak, Grzegorz Kazek, Monika Papież (2008) Different influence of curcumin on antioxidant status in healthy and leukemic rats. *COST Action 926 Conference: Benefits and*

Risks of Bioactive Plant Compounds, Kraków, Poland, March 27th-28th, 2008. 2008: Vol. 55 suppl. 1, s. 31, abstr. P2.10

Monika A. Papież, **Wirginia Krzyściak**. (2012) Wpływ (-)-epikatechiny i etopozydu na stan oksydacyjny w wątrobie szczurów z białaczką szpikową. XLVI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików; III Konferencja poświęcona Digitalizacji Obrazów Mikroskopowych w Medycynie, Poznań, 24-26 maja 2012. 2012 : T. 39, suppl. 27, s. 52.

Monika A. Papież, **Wirginia Krzyściak**, Beata Bystrowska. The role of oxidative stress in the synergistic action of curcumin and etoposide. 48 Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików : Od makro do nano : nowe horyzonty i nowe możliwości w naukach podstawowych i klinicznych, Wisła, 3-6 września 2014. s. 67 : abstr. P.II.29.

4. Wpływ pochodnych ksantonu na wybrane parametry oksydacyjno-antyoksydacyjne *in vitro* i *ex vivo*

W dziedzinie poszukiwania nowych związków o potencjalnej aktywności farmakologicznej, od 2008 roku w ramach współpracy z Zakładem Chemii Bioorganicznej (kierownik Prof. dr hab. Henryk Marona) wykonywałam badania wpływu pochodnych ksantonu na wybrane parametry oksydacyjno-antyoksydacyjne we krwi osób hemodializowanych. Wyniki tych badań wskazały jednoznacznie na wrażliwość erytrocytów ludzkich na badane pochodne ksantonu. Efektem tej współpracy było doniesienie zjazdowe.

Wirginia Krzyściak, Agnieszka Żaba, Henryk Marona, Marek Stępniewski. (2009) Influence of chosen derivatives of xanthone on superoxide dismutase activity in patients undergoing hemodialysis. Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism: materials of 18th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology / ed. by Henryk Lach; Józef Dietl Malopolska Higher Vocational School in Cracow. - Kraków : [s.n.], 2009 (Kraków Zespół Poligrafii UP) s. 174-175.

5. Ocena właściwości antyoksydacyjnych i antymikrobiotycznych wyciągów z derenia jadalnego oraz organicznych kompleksów wanadu w modelach *in vitro* i *in vivo*

W ramach współpracy z Zakładem Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego UJCM wraz z dr hab. Mirosławem Krośniakiem badałam właściwości antyoksydacyjne i antymikrobiotyczne wyciągów z derenia jadalnego. W prowadzonych badaniach wykazano potencjalne działanie antyoksydacyjne oraz antymikrobiotyczne ekstraktów etanolowych z liści i nasion derenia przeciwko różnym gatunkom bakterii i grzybów. Na podstawie wyników prowadzonych badań zostało przygotowane i przedstawione doniesienie zjazdowe oraz opublikowana praca na łamach Postępów Fitoterapii.

Krzyściak P., Krośniak M., Gąstoł M., **Krzyściak W.**: Działanie antymikrobiotyczne wyciągów z derenia i suchodrzewu jadalnego. XIV Meeting Toxicology and Environmental Health Warszawa 18-19 maja 2009

Krzyściak, P., Krośniak, M., Gąstoł, M., Ochońska, D., **Krzyściak, W.**: Antimicrobial activity of Cornelian cherry. *Postępy Fitoterapii*. 2011, 4: 227-231.

Jako wykonawca w grantie finansowanym przez Unię Europejską (program Innowacyjna Gospodarka, POiG) dr hab. Ryszarda Grybosia *Kompleksy wanadu – innowacyjne metalofarmaceutyki w leczeniu cukrzycy*, wraz z dr hab. Mirosławem Krośniakiem określałam wpływ wyselekcjonowanych związków wanadu na wybrane parametry oksydacyjno-antyoksydacyjne w modelach komórkowych i w zwierzęcym modelu cukrzycy. Wyniki badań zostały opublikowane na łamach *Acta Biol Crac Ser Zool* oraz stały się częścią rozprawy habilitacyjnej dr hab. Mirosława Krośniaka.

M. Krośniak, **W. Krzyściak**, A. Kareta, R. Gryboś. Activities of glutathione peroxidase and catalase in organs from vanadium-treated rats. *Acta Biol. Crac., Ser. Zool.* 2009: Vol. 51, s. 39-48.

6. Rola stresu oksydacyjnego u pacjentów z liszajem płaskim jamy ustnej

Od 2015 r. w Zakładzie Diagnostyki Medycznej prowadzone są badania w ramach współpracy z dr n. med. Dagmarą Darczuk z Poradni Chorób Przyzębia i Błony Śluzowej UKS w Krakowie, Instytutu Stomatologii UJCM, w których jednym z etapów jest ocena wybranych parametrów oksydacyjno-antyoksydacyjnych w ślinie pacjentów z liszajem płaskim jamy ustnej. Jako wykonawca w projekcie statutowym dr Darczuk: *Analiza wybranych parametrów oksydacyjno-antyoksydacyjnych w ślinie pacjentów z liszajem płaskim jamy ustnej w połączeniu z oceną lęku i depresji* do warsztatu badawczego włączyłam ocenę wybranych wskaźników poprzez ich walidację i przygotowanie optymalnych warunków dla ww. metod w ślinie pacjentów z liszajem płaskim jamy ustnej. Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione podczas konferencji międzynarodowej, poświęconej stresowi oksydacyjnemu, odbywającej się w Paryżu w 2015 r. oraz spotkania Amerykańskiego Towarzystwa Badań w Stomatologii, odbywającego się w San Francisco, w Kalifornii, a także stały się przedmiotem publikacji.

Dagmara Darczuk, **Wirginia Krzyściak**, Barbara Kęsek, Dagmara Gałęcka-Wanatowicz, Weronika Lipska, Tomasz Kaczmarzyk, Maria Chomyszyn-Gajewska. (2015) Salivary oxidative status in patients with oral lichen planus. 15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants, Paris, France, June 22-24, 2015: abstract book. Pp. 14.

Dagmara Darczuk, **Wirginia Krzyściak**, Barbara Kęsek, Iwona Olszewska-Czyż, Weronika Lipska, Dagmara Gałęcka-Wanatowicz, Maria Chomyszyn-Gajewska. (2016). Correlation between salivary Tyrosine and GPx in oral lichenplanus. *Oral Dis.* 2016 Vol. 22, suppl. S2, abstr. B072.

Dagmara Darczuk, **Wirginia Krzyściak**, Paulina Vyhouskaya, Barbara Kęsek, Dagmara Gałęcka-Wanatowicz, Weronika Lipska, Tomasz Kaczmarzyk, Monika Głuch-Lutwin, Barbara Mordyl, Maria Chomyszyn-Gajewska (2016) Salivary oxidative status in patients with oral lichen planus. *J. Physiol. Pharmacol.* 2016 : Vol. 67, nr 6, s. 885-894, il., bibliogr. 55 poz. Impact Factor ISI: 2.883; Punktacja MNiSW: 25.000

Krzyściak W, Darczuk D, Chomyszyn-Gajewska M (2017) Glutathione Peroxidase and Superoxide Dismutase Activity in OLP patients' saliva. IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition! San Francisco, March 22-25, San Fransisco, California, USA

Planowane jest opracowanie, jak również późniejsza optymalizacja funkcjonalnych testów biochemii, służących określeniu wybranych parametrów w grupie pacjentów z liszajem płaskim jamy ustnej oraz pacjentów z diagnostyki różnicowej choroby.

7. Znaczenie stresu oksydacyjnego u pacjentów z chorobą Crohna.

Opracowany warsztat badawczy umożliwił mi przeprowadzenie kolejnych badań związanych z *Oceną peroksydacji lipidów i stężeniem wybranych antyoksydantów w ślinie i surowicy krwi pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna* w ramach realizowanego projektu statutowego, kierowanego przez dr n. med. Katarzynę Szczeklik z Zakładu Stomatologii Zintegrowanej, Wydziału Lekarskiego, Instytutu Stomatologii UJ CM w Krakowie. Z uzyskanych wyników, które wskazują, na znaczną redukcję układów antyoksydacyjnych i nasiloną peroksydację lipidów w surowicy, osoczu i ślinie pacjentów z aktywną postacią choroby Crohna w porównaniu do nieaktywnej postaci choroby i grupy kontrolnej, przygotowano 2 publikacje naukowe.

Szczeklik K, **Krzyściak W**, Domagała-Rodacka R, Mach P, Darczuk D, Cibor D, Pytko-Polonczyk J, Rodacki T, Owczarek D. (2016) Alterations in glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in plasma and saliva in relation to disease activity in patients with Crohn's disease. *J Physiol Pharmacol.* 2016 Oct;67(5):709-715. Impact Factor ISI: 2.883; Punktacja MNiSW: 25.000

8. Zmiany wybranych wskaźników obrony antyoksydacyjnej we krwi pacjentów po rutynowym badaniu tomografii komputerowej o wysokiej rozdzielczości (*high resolution computed tomography, HRCT*)

Od 2017 r. w Zakładzie Diagnostyki Medycznej prowadzone są badania w ramach współpracy z dr n. med. Amirą Bryll z Zakładu Diagnostyki Obrazowej Uniwersyteckiego Szpitala w Krakowie, w których jednym z etapów jest ocena działania promieniowania jonizującego na wybrane parametry antyoksydacyjne ludzi poddawanych rutynowemu badaniu HRCT.

9. Rola Nrf2 w regulacji stresu oksydacyjnego jako narzędzie oceny jakości nasienia w niepłodności męskiej.

W ramach współpracy z dr n. med. Jarosławem Janeczko, kierownikiem Centrum Leczenia Niepłodności PARENS planowane są badania określające przydatność m.in. genu Nrf2 jako biomarkera oceny jakości nasienia w niepłodności męskiej. Układ enzymów antyoksydacyjnych i geny z nim związane odgrywają ważną rolę w spermatogenezie człowieka. Nie jest jasne, czy ekspresja mRNA genów antyoksydacyjnych oraz układów antyoksydacyjnych jest niższa u niepłodnych mężczyzn w porównaniu do par bez cech niepłodności oraz w jakim stopniu (przy

jakich wartościach odcięcia dla wybranych parametrów) manifestuje się jako problem kliniczny. Planowane są badania genu odpowiedzialnego za drogę sygnałową wrodzonej odporności antyoksydacyjnej (Nrf2) z wybranymi parametrami antyoksydacyjnymi (m.in.: SOD, CAT, GPX, FRAP). Wybrane wskaźniki porównywane będą z określonymi parametrami funkcji plemników (m.in.: koncentracją, żywotnością, ruchliwością i morfologią). Rola oznaczeń wybranych Nrf2 i innych wskaźników antyoksydacyjnych w monitorowaniu stresu oksydacyjnego jest bezdyskusyjna, a te wydają się mieć duży wpływ na jakość nasienia, występowanie niepłodności męskiej oraz powodzenie procedur wspomaganej prokreacji.

10. Poszukiwanie nowych markerów oceny występowania i progresji próchnicy wczesnego dzieciństwa (ECC)

W ramach prowadzonej współpracy z Pracownią Stomatologii Dziecięcej Instytutu Stomatologii UJCM, kierowaną przez dr n. med. Annę Jurczak, miałam okazję uczestniczyć (jako wykonawca w projekcie dr n. med. Anny Jurczak oraz dr n. med. Doroty Kościelniak) w projektach: *Proteomika układów dynamicznych: białko-bakteria jako przydatne narzędzie diagnostyki próchnicy* (kierownik dr n. med. Dorota Kościelniak), oraz *Ocena wybranych parametrów ślinowych dzieci z próchnicą w połączeniu z oceną mikrobiologiczną jamy ustnej* (kierownik dr n. med. Anna Jurczak). Wynikiem tej współpracy było określenie wzajemnych relacji pomiędzy poszczególnymi składnikami mikroflory jamy ustnej a białkami ślinowymi dzieci z próchnicą wczesnego dzieciństwa (ECC). Określenie indywidualnych różnic składu śliny i udziału poszczególnych szczepów bakterii próchnicotwórczych może stanowić punkt wyjścia w przewidywaniu postępu choroby u dzieci.

Wyniki powyższych badań, a także problemy związane z diagnostyką i istniejącymi metodami leczenia próchnicy wczesnego dzieciństwa nasunęły pomysły użycia metod biologii molekularnej, jakim jest analiza widm w spektroskopii masowej z detektorem czasu przelotu (MALDI-TOF) oraz łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. Real Time Polymerase Chain Reaction – RT-PCR) w czasie rzeczywistym. Techniki te będą wymagały opracowania protokołów i optymalizacji warunków reakcji. W celu realizacji tych badań złożono projekt, pt.: *Ocena porównawcza wpływu materiałów kompozytowych, kompomerowych i glasonomerowych na mikrobiom jamy ustnej i podatność na tworzenie biofilmów kariogennych u dzieci z próchnicą wczesnego dzieciństwa* w ramach dotacji Narodowego Centrum Nauki na rok 2018 oraz nawiązano współpracę z Jagiellońskim Centrum Innowacji w Krakowie, które posiada odpowiedni sprzęt do przeprowadzenia tego typu analiz.

7. Plany dotyczące dalszych badań

W najbliższym czasie planowane jest zbadanie ekspresji genów związanych z enzymami katalizującymi procesy glikolizy, m.in.: *pyk*, w biofilmach

monogatunkowych, dwugatunkowych i mieszanych w różnych warunkach fizykochemicznych (m.in. w środowisku obniżonego pH<5) w obecności różnych aktywatorów i inhibitorów kinazy pirogronianowej PK. Zbadana zostanie produkcja kwasu mlekowego w ww. modelach pod wpływem zmiennych substratów odżywczych, w obecności różnych inhibitorów glikolizy, działających m.in. wobec kinazy pirogronianowej.

Planowane są badania *in vitro* i w modelu zwierzęcym, wykorzystujące preparat kombinowany, zawierający inhibitor kinazy pirogronianowej i dehydrogenazy preferenowej PDH, oceniające jego wpływ na zdolność formowania biofilmu i aktywność metaboliczną *S. mutans*.

Prowadzone będą także badania zmierzające do określenia ekspresji genów metabolizmu węglowodanów oraz genów transdukcji sygnału (m.in. *comC*) w biofilmach monogatunkowych i podwójnych, np. *S. mutans* i *C. albicans* oraz określenia wpływu testowanych związków na ww. ekspresję. Wykonana zostanie ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym oceniająca ekspresję genów kodujących glikozylotransferazy: *gtfB*, *gtfC* i *gtfD* w biofilmie monogatunkowym *S. mutans* i dwugatunkowym *S. mutans* z *C. albicans* pod wpływem *L. rhamnosus* i *L. salivarius* z HM-6.

Zaplanowano także badania oceniające wpływ stosowanych w stomatologii materiałów do wypełnień na zmiany mikrobiomu jamy ustnej (ślina i płytka nazębna), zdolności do tworzenia biofilmu oraz aktywności metabolicznej bakterii *S. mutans* w biofilmie. Prowadzone badania będą obejmować sekwencjonowanie typu NGS, oraz MALDI-TOF. Badania zdolności do tworzenia filmu biologicznego oraz analiza aktywności metabolicznej *S. mutans* w biofilmie będą wykonywane w modelach *in vitro*, po izolacji bakterii oraz w obecności naturalnych biofilmów tworzonych u pacjentów w jamie ustnej. Zbadana i porównana zostanie ekspresja genów bakteryjnych w prezentowanych modelach (w warunkach *in vitro* i *in vivo*).

8. Kierowanie i udział w projektach naukowych

Granty finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego:

- 1) Numer projektu: MNiSW/2016/DIR/181/NN - kierownik, 2016-2017. *Opracowanie i optymalizacja testów biochemicznych in vitro służących określeniu aktywności enzymatycznej wybranych białek biorących udział w regulacji szlaku glikolitycznego u Streptococcus mutans w biofilmach mieszanych*
- 2) Numer projektu: 2 P05A 162 30 - wykonawca, 2006-2008. *Analiza stanu oksydacyjnego u szczurów z modelem ostrej przeszczepialnej białaczki promielocytowej*
Rozszerzony projekt: 2 P05A 162 30 *Badanie uszkodzeń DNA, apoptozy i proliferacji komórek w śledzionie oraz szpiku kostnym szczurów z białaczką promielocytową po podaniu związków o działaniu anty- lub prooksydacyjnym*
- 3) Numer projektu: Program Operacyjny OPIE - wykonawca, Dotacja Innowacyjna Gospodarka w latach 2007-2013, konkurs nr 1/2009 w ramach

Działania 1.3, Poddziałania 1.3.1 Kompleksy wanadu - innowacyjne metalofarmaceutyki w leczeniu cukrzycy

Dotacje statutowe i własne dla młodych naukowców w ramach prac badawczych UJ CM:

1. Numer projektu: K/ZBW/000256 – kierownik, 2007-2008. *Wpływ wybranych pochodnych amin (aminoalkanoli) oraz pochodnych ksantonów o zdefiniowanej aktywności farmakologicznej (na OUN i/lub układ sercowo-naczyniowo) w badaniach in vitro, na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy oraz na stężenie malonyldialdehydu chorych przewlekle hemodializowanych*
2. Numer projektu: K/ZBW/000488 – kierownik, 2009. *Badania wybranych wskaźników układu antyoksydacyjnego w wydolnych i niewydolnych fragmentach żył, oraz próbkach krwi chorych z przewlekłą niewydolnością żył kończyn dolnych*
3. Numer projektu: K/ZBW/000599 – kierownik, 2009-2010. *Badanie uszkodzeń oksydacyjnych DNA we krwi oraz w tkankach chorych z przewlekłą chorobą żylną po podaniu flawonoidów ex vivo oraz in vitro*
4. Numer projektu: K/DSC/001959 – kierownik, 2014-2015. *Analiza metabolizmu Streptococcus mutans we wczesnej próchnicy dziecięcej*
5. Numer projektu: K/ZDS/005484 – wykonawca, 2015-2016. *Proteomika układów dynamicznych: białko-bakteria jako przydatne narzędzie diagnostyki próchnicy.*
6. Numer projektu: K/ZDS/005485 – wykonawca, 2015-2016. *Ocena wybranych parametrów ślinowych dzieci z próchnicą w połączeniu z oceną mikrobiologiczną jamy ustnej*
7. Numer projektu: K/KDU/000354 – kierownik, 2016. *Badanie właściwości antybakteryjnych HM6-Paraden – potencjalne wykorzystanie jako środek przeciwpróchnicowy*
8. Numer projektu: K/DSC/007071 – kierownik, 2016-2017. *Analiza mechanizmu degradacji białek glikolizy w metabolizmie bakterii próchnicotwórczych*
9. Numer projektu: K/ZDS/007169 – wykonawca, 2016-2017. *Ocena peroksydacji lipidów i stężenie wybranych antyoksydantów w ślinie i surowicy krwi pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna*
10. Numer projektu: K/ZDS/005515 – wykonawca, 2015-2017. *Analiza wybranych parametrów oksydacyjno-antyoksydacyjnych w ślinie pacjentów z liszajem płaskim jamy ustnej w połączeniu z oceną lęku i depresji*

9. Nagrody i wyróżnienia

2009 – wyróżnienie rozprawy doktorskiej decyzją Rady Wydziału Farmaceutycznego UJ CM

2014 - nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM za osiągnięcia naukowe

2017 – odznaka krakowskiego oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów za cenny wkład w działalność na rzecz środowiska mikrobiologów

2017 - nagroda za osiągnięcia naukowe

10. Członkostwo w towarzystwach naukowych

2008 - Polskie Towarzystwo Mikrobiologiczne

2010 - Polskie Towarzystwo Biochemiczne

11. Członkostwo w radach redakcyjnych czasopism naukowych

American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials

12. Recenzje prac

International Journal of Paediatric Dentistry (*Impact Factor: 1.532*)

(2 prace)

Plos One (*Impact Factor: 2.806*)

(1 praca)

BMC Oral Health (*2-year Impact Factor: 1.481*)

(4 prace)

Journal of Oral Microbiology (*Impact Factor: 3.723*)

(1 praca)

Folia Microbiologica (*Impact Factor: 1.521*)

(1 praca)

Archives of Oral Biology (*Impact Factor: 1.748*)

(2 prace)

Journal of Dentistry & Oral Health

(1 praca)

International Journal of Oral Science (*Impact Factor: 2.531*)

(1 praca)

Prace magisterskie (trzykrotnie)

13. Działalność dydaktyczna i organizacyjna

Od chwili zatrudnienia w Zakładzie Radioligandów i kolejno w Zakładzie Diagnostyki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM prowadzę zajęcia dydaktyczne ze studentami Farmacji i Oddziału Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego. Obejmują one zajęcia laboratoryjne ze studentami trzeciego, czwartego i piątego roku z zakresu analityki ogólnej, podstaw hematologii, serologii

grup krwi, propedeutyki diagnostyki laboratoryjnej, diagnostyki laboratoryjnej, organizacji medycznych laboratoriów diagnostycznych w ramach których studenci wykonują praktycznie analizy laboratoryjne wybranych płynów ustrojowych, poznają zasady pracy w analitycznym laboratorium medycznym, czy uczą się podstawowych technik pobierania materiałów do badań diagnostycznych. W ramach zajęć uczestniczę w opracowaniu i przygotowaniu ćwiczeń dotyczących „Badania mikroskopowego osadów moczu”, „Wykonania i podstawowej oceny mikroskopowej rozmazu krwi obwodowej ze szczególnym uwzględnieniem układu białokrwinkowego”, „Oznaczenia grup krwi układu ABO i Rh”, „Opracowania i optymalizacji wybranych metod diagnostycznych, służących ocenie wybranych biomarkerów określonych chorób”, „Badania nasienia w ocenie przyczyn niepłodności męskiej”. Ponadto ze studentami Oddziału Analityki Medycznej prowadzę zajęcia seminaryjne dotyczące opracowania standardowych procedur operacyjnych dla wybranych biomarkerów ludzkich płynów biologicznych wraz z oceną ich przydatności. Zainaugurowałam prowadzenie seminariów rachunkowych obejmujących zakres chemii nieorganicznej, fizyki, elementów logiki czy statystycznego opracowania wyników badań z wykorzystaniem otwarto źródłowych narzędzi do analizy danych, m.in. język i środowisko do obliczeń statystycznych R. Ponadto dla studentów V Roku Analityki Medycznej opracowałam i prowadzę wykłady i seminaria z zakresu organizacji medycznych laboratoriów diagnostycznych na temat walidacji metod badawczych oraz wykorzystania spektrofotometrii, fluorymetrii czy elektroforezy kapilarnej do analizy wybranych enzymów, peptydów czy białek. Prowadzę także wykład i seminarium ze studentami IV Roku Farmacji z zakresu Perspektyw biologicznej terapii nowotworów.

Byłam promotorem 13 prac magisterskich prowadzonych na kierunku Analityka Medyczna, w ramach których realizowano tematykę z obszaru moich badań. Recenzowałam prace magisterskie realizowane na Wydziale Farmaceutycznym.

Równolegle do mojej aktywności naukowej i dydaktycznej staram się ciągle podnosić swoje kwalifikacje i umiejętności. Uczestniczyłam w kursach i szkoleniach mających na celu unowocześnianie formy i sposobu przekazywania wiedzy („Zaawansowane techniki edukacyjne w naukach medycznych. E-learning” Projekt Pro bono Collegi Medici Universitatis Jagiellonicae; „Zaawansowane techniki edukacyjne w naukach medycznych. Kurs podstawowy” Projekt Pro bono Collegi Medici Universitatis Jagiellonicae. Kursy zaawansowane: „Ocenianie studentów i opracowywanie testów”, „Opracowywanie egzaminów ustnych i OSCE”, „Nauczanie w oparciu o problem”, „Nauczanie *Standaryzowany pacjent*” w ramach projektu Pro bono Collegii Medici Universitatis Jagiellonicae. Kurs „Język angielski specjalistyczny” w ramach projektu Pro bono Collegii Medici Universitatis Jagiellonicae współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Kurs bioinformatyczny organizowany przez ideas4biology.com 23-24.XI.2013 r. w Poznaniu dotyczący zagadnień analizy białek i baz danych struktur białek m.in. PDB, InterPro, przewidywania struktury drugorzędowych i trzeciorzędowych białek (PSIPRED), modelowania *AB INITIO*, homologicznego, metametod; biologicznych baz danych; analizy sekwencji; identyfikacji genów; małych regulatorowych RNA) jak również doskonalących zawodowo, poszerzających wiedzę na temat nowoczesnych

rozwiązań i technologii w diagnostyce laboratoryjnej i medycynie. Jestem członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych. Aktualnie, od maja 2012 roku, realizuję program specjalizacji z Laboratoryjnej Diagnostyki Medycznej dla Diagnostów Laboratoryjnych.

Zorganizowałam wykład otwarty *Wybrane aspekty prawne w zawodzie analityka medycznego*, który wygłosił Prezes Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych dr Henryk Owczarek 29.X.2015 na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM w Krakowie.

Brałam czynny udział w Konferencji naukowej *Konsultacja diagnosty laboratoryjnego w medycznym laboratorium diagnostycznym*, organizowanej m.in. przez Polskie Towarzystwo Diagnostów Laboratoryjnych 9 maja 2014, podczas której wygłosiłam wykład pt. *Zasadność wykonywania zleconych badań laboratoryjnych w wybranych przypadkach diagnostycznych*.

Zainicjowałam utworzenie sesji naukowej *Diagnostyka Laboratoryjna* podczas Międzynarodowej Konferencji Studentów Uczelni Medycznych odbywającej się 12-14 kwietnia 2012 roku w Krakowie. Prezentowane wyniki badań zostały opublikowane na łamach Przeglądu Lekarskiego.

Od 2012 r. jestem opiekunem naukowym Koła Naukowego Diagnostów Laboratoryjnych przy Zakładzie Diagnostyki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. W ramach badań w Kole Naukowym przygotowano szereg wystąpień ustnych, z których m.in. praca: *Analysis of salivary proteins as a diagnostic tool for assessment of dental caries* - Agaty Dziwińskiej, zdobyła nagrodę podczas International Medical Student's Conference w Krakowie, w kwietniu 2013 roku.

W latach 2013-2014 brałam czynny udział wraz z Kołem Diagnostów Laboratoryjnych (rola opiekuna koła) na Festiwalu Nauki - promowanie znaczenia badań laboratoryjnych w diagnostyce medycznej (projekt: „Od Hipokratesa do proteomiki”).

14. Literatura

¹ World Health Organisation (1962) Standardization of Reporting of Dental Diseases and Conditions. Geneva Report No. 242, 4.1 Definitions, 4.1.1 Dental Caries.

² World Health Organization (2013) Oral health surveys: basic methods. Geneva: World Health Organization 5th ed, 2013

³ Douglass JM, Clark MB. (2015) Integrating oral health into overall health care to prevent early childhood caries: need, evidence, and solutions. *Pediatr Dent.* 37(3): 266-274.

⁴ Jurczak A, Kościelniak D, Gregorczyk-Maga I, Olczak-Kowalczyk D, Kołodziej I, Ciepły Jadwiga, Bąk E, Słowik Joanna, Krzyściak W. (2014) Caries status among children residing in Cracow compared with the rest of Poland. *J. Stomatol.* Vol. 67, nr 6, s. 781-799.

⁵ Ministerstwo Zdrowia (2016) Monitorowanie stanu zdrowia jamy ustnej populacji polskiej w latach 2016-2020. Program na lata 2016 - 2020.

⁶ Wagner Y. (2017) Developmental defects of enamel in primary teeth - findings of a regional German birth cohort study. *BMC Oral Health.* 2017; 17: 10.

⁷ Ferro R, Besostri A, Olivieri A. (2017) Survey of Caries Experience in 3- to 5-year-old Children in Northeast Italy in 2011 and Its Trend 1984-2011. *Oral Health Prev Dent.* 2017;15(5):475-481. doi: 10.3290/j.ohpd.a38976.

-
- ⁸ Watanabe M, Wang DH, Ijichi A, Shirai C, Zou Y, Kubo M, Takemoto K, Masatomi C, Ogino K. (2014) The influence of lifestyle on the incidence of dental caries among 3-year-old Japanese children. *Int J Environ Res Public Health*. 2014 Dec 5;11(12): 12611-22.
- ⁹ Al-Jewair TS, Leake JL. (2010) The Prevalence and Risks of Early Childhood Caries (ECC) in Toronto, Canada. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 11(5): 1-8.
- ¹⁰ Lucas N, Neumann A, Kilpatrick N, Nicholson JM. (2011) State-level differences in the oral health of Australian preschool and early primary school-aged children. *Australian Dental Journal*. 56: 56-62.
- ¹¹ Adeniyi AA, Ogunbodede OE, Jeboda OS, Folayan OM. 2009 Do maternal factors influence the dental health status of Nigerian pre-school children? *International Journal of Paediatric Dentistry* 19: 448-454.
- ¹² Hajishengallis I, Forrest CB, Koo H. (2017) Early Childhood Caries: Future Perspectives in Risk Assessment. *JDR Clin Trans Res*. 2016; 1(2): 110-111.
- ¹³ Li Y, Tanner A. (2015) Effect of Antimicrobial Interventions on the Oral Microbiota Associated with Early Childhood Caries. *Pediatr Dent*. 2015 May-Jun;37(3):226-44.
- ¹⁴ Amin M, Nouri R, ElSalhy M, Shah P, Azarpazhooh A. (2015) Caries recurrence after treatment under general anaesthesia for early childhood caries: a retrospective cohort study. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2015 Aug;16(4):325-31. doi: 10.1007/s40368-014-0166-4. Epub 2015 Jan 27.
- ¹⁵ Fontana M. (2015) The Clinical, Environmental, and Behavioral Factors That Foster Early Childhood Caries: Evidence for Caries Risk Assessment. *Pediatr Dent*. 2015 May-Jun;37(3):217-25.
- ¹⁶ Casadevall A. (2017) The Pathogenic Potential of a Microbe. *mSphere*. 2017 Feb 22;2(1). pii: e00015-17. doi: 10.1128/mSphere.00015-17. eCollection 2017 Jan-Feb.
- ¹⁷ Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. (2017) Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol Oral Microbiol*. 2017 Feb;32(1):24-34. doi: 10.1111/omi.12152. Epub 2016 Feb 4.
- ¹⁸ Jung CJ, Yeh CY, Shun CT, Hsu RB, Cheng HW, Lin CS, Chia JS. (2012) Platelets enhance biofilm formation and resistance of endocarditis-inducing streptococci on the injured heart valve. *J Infect Dis*. 205(7): 1066-75. Epub 2012 Feb 21.
- ¹⁹ Nakano K, Ooshima T (2009) Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol*. 2009 Sep;4(7):891-902. doi: 10.2217/fmb.09.64.
- ²⁰ van Palenstein Helderman WH, Isseldijk M, Huis in't Veld JHJ. (1983) A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. *Arch Oral Biol*. 1983; 28: 599-603
- ²¹ Ritz, H.L. (1967) Microbial population shifts in developing human plaque. *Arch Oral Biol* 12, 1561-1568.
- ²² Yoo SY, Park SJ, Jeong DK, Kim KW, Lim SH, Lee SH, Choe SJ, Chang YH, Park I, Kook JK. (2007) Isolation and characterization of the *mutans streptococci* from the dental plaques in Koreans. *J Microbiol*. 2007 Jun;45(3):246-55.
- ²³ Kanasi E, Johansson I, Lu SC, Kressin NR, Nunn ME, Kent R Jr, Tanner AC. (2010) Microbial risk markers for childhood caries in pediatricians' offices. *J Dent Res*. 2010 Apr;89(4):378-83. doi: 10.1177/0022034509360010. Epub 2010 Feb 17.
- ²⁴ Tanner AC, Mathney JM, Kent RL, Chalmers NI, Hughes CV, Loo CY, Pradhan N, Kanasi E, Hwang J, Dahlan MA, Papadopoulou E, Dewhirst FE. (2011) Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2011 Apr;49(4):1464-74. doi: 10.1128/JCM.02427-10. Epub 2011 Feb 2.
- ²⁵ Brauncajs M, Sakowska D, Krzemiński Z (2001) Występowanie w jamie ustnej pałeczek kwasu mlekowego wytwarzających nadtlenek wodoru. *Med. Dośw. Mikrobiol*. 53: 331-336.
- ²⁶ Brauncajs M, Krzemiński Z, Sakowska D (2004) Porównanie flory bakteryjnej jamy ustnej u dzieci i u osób dorosłych. *Med Dosw Mikrobiol*. 56(4): 365-9.
- ²⁷ Santiago B, MacGilvray M, Faustoferrri RC, Quivey RG Jr. (2012) The branched-chain amino acid aminotransferase encoded by *ilvE* is involved in acid tolerance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*;194(8):2010-9.
- ²⁸ Lemos JA, Burne RA. (2008) A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. ;154(Pt 11):3247-55.
- ²⁹ Ku HK1, Do NH, Song JS, Choi S, Yeon SH, Shin MH, Kim KJ, Park SR, Park IY, Kim SK, Lee SJ. (2011) Crystal structure of prephenate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Int J Biol Macromol*. 2011 Nov 1;49(4):761-6. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.07.009. Epub 2011 Jul 20.
- ³⁰ Champney WS, Jensen RA. (1970) The enzymology of prephenate dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*. 1970 Aug 10;245(15):3763-70.

-
- ³¹ Ku HK, Park SR, Yang I, Kim SK. (2010) Expression and functional characterization of prephenate dehydrogenase from *Streptococcus mutans* *Pracs Bio*,45(4): 607-612.
- ³² Xia T, Zhao G, Fischer RS, Jensen RA. (1992) A monofunctional prephenate dehydrogenase created by cleavage of the 5' 109 bp of the *tyrA* gene from *Erwinia herbicola*. *J Gen Microbiol.*;138(7):1309-16.
- ³³ Ogunniyi AD, Mahdi LK, Trappetti C, Verhoeven N, Mermans D, Van der Hoek MB, Plumptre CD, Paton JC. (2012) Identification of genes that contribute to the pathogenesis of invasive pneumococcal disease by in vivo transcriptomic analysis. *Infect Immun.* 2012 Sep;80(9):3268-78. doi: 10.1128/IAI.00295-12. Epub 2012 Jul 9.
- ³⁴ Harrison GA, Stross WP, Rubin MP, Davies RM, Speller DC. (1985) Resistance in oral streptococci after repeated three-dose erythromycin prophylaxis," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 15, no. 4, pp. 471-479.
- ³⁵ Southall PJ, Mahy NJ, Davies RM, Speller DC. (1983) Resistance in oral streptococci after repeated two-dose amoxicillin prophylaxis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 12, no. 2, pp. 141-146.
- ³⁶ Süzük S, Kaşkatepe B, and Çetin M. (2016) Antimicrobial susceptibility against penicillin, ampicillin and vancomycin of viridans group *Streptococcus* in oral microbiota of patients at risk of infective endocarditis. *Le Infezioni in Medicina*. vol. 24, no. 3, pp. 190-193.
- ³⁷ Nilson B, Olaison L, Rasmussen M. (2016) Clinical presentation of infective endocarditis caused by different groups of non-beta haemolytic streptococci. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 35, no. 2, pp. 215-218.
- ³⁸ Yoo SY, Park SJ, Jeong DK, Kim KW, Lim SH, Lee SH, Choe SJ, Chang YH, Park I, Kook JK. (2007) Isolation and characterization of the mutans streptococci from the dental plaques in Koreans. *J Microbiol.* 45(3): 246-55.
- ³⁹ Facklam RR. (1974) Characteristics of *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and blood," *International Journal of Systematic Bacteriology*. vol. 24, no. 3, pp. 313-319.
- ⁴⁰ Colby SM, Harrington DJ, Russell RR. (1995) Identification and genetic characterisation of melibiose-negative isolates of *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, vol. 29, no. 5, pp. 407-412.
- ⁴¹ Hajjishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. (2017) Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol Oral Microbiol.* 2017 Feb;32(1):24-34. doi: 10.1111/omi.12152. Epub 2016 Feb 4.
- ⁴² Manton D, Drummond BK, Kilpatrick N. (2008). *Dental caries. Handbook of Paediatric Dentistry 3rd Ed, Chapter 3*, pp 39-52.
- ⁴³ Kaplan JB. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications and potential therapeutic uses. *J Dent Res*, 89(3):205-218.
- ⁴⁴ Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. (2005) Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol.* 2005 Nov;187(21):7193-203.
- ⁴⁵ Jurczak A, Kościelniak D, Skalniak A, Papież M, Vyhouskaya P, Krzyściak W. (2017) The role of the saliva antioxidant barrier to reactive oxygen species with regard to caries development. *Redox Rep.* 2017 Nov;22(6):524-533. doi: 10.1080/13510002.2017.1301625. Epub 2017 Mar 13.
- ⁴⁶ McNeill K, Hamilton IR. (2003) Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*, *FEMS Microbiol Lett*, 221(1): 25-30.
- ⁴⁷ Jalasvuori H, Haukioja A, Tenovuo J. (2012) Probiotic *Lactobacillus reuteri* strains ATCC PTA 5289 and ATCC 55730 differ in their cariogenic properties in vitro. *Arch Oral Biol.* Dec;57(12): 1633-8. Epub 2012 Sep 23
- ⁴⁸ Teanpaisan R, Piwat S, Dahlén G. (2011) Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol.* Oct;53(4): 452-9. Epub 2011 Aug 25.
- ⁴⁹ Li L, He J, Eckert R, Yarbrough D, Lux R, Anderson M, Shi W (2010) Design and characterization of an acid-activated antimicrobial peptide. *Chem Biol Drug Des.* Jan;75(1): 127-32. Epub 2009 Oct 28.
- ⁵⁰ Pletzer, D., Coleman, S. R. & Hancock, R. E. (2016) Antibiofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr. Opin. Microbiol.* 33, 35-40.
- ⁵¹ Batoni, G., Maisetta, G. & Esin, S. (2016) Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 1044-1060.
- ⁵² Guo L., McLean J.S., Yang Y., Eckert R., Kaplan C.W., Kyme P., Sheikh O., Varnum B., Lux R., Shi W., He X. (2015) Precision-guided antimicrobial peptide as a targeted modulator of human microbial ecology. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, 7569-7574.

-
- ⁵³ Stewart, P.S., Franklin M.J., Williamson K.S., Folsom J.P., Boegli L., James G.A. (2015) Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3838–3847.
- ⁵⁴ Mayahara M., Kataoka R., Arimoto T., Tamaki Y., Yamaguchi N., Watanabe Y., Yamasaki Y., Miyazaki T. (2014) Effects of surface roughness and dimorphism on the adhesion of *Candida albicans* to the surface of resins: Scanning electron microscope analyses of mode and number of adhesions. *J. Investig. Clin. Dent.* 5, 307–312.
- ⁵⁵ Moalic E., Gestalin A., Quinio D., Gest P.E., Zerilli A., Le Flohic A.M. (2001) The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Res.* 35, 149–155.
- ⁵⁶ Jørgensen M.R., Castiblanco G., Twetman S., Keller M.K. (2016) Prevention of caries with probiotic bacteria during early childhood. Promising but inconsistent findings. *Am. J. Dent.* 29, 127–131.
- ⁵⁷ Koo H., Bowen W.H. (2014) *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*: A potential synergistic alliance to cause virulent tooth decay in children. *Future Microbiol.* 9, 1295–1297.
- ⁵⁸ Casadevall A (2017) The Pathogenic Potential of a Microbe. *mSphere.* 2017 Feb 22;2(1). pii: e00015-17. doi: 10.1128/mSphere.00015-17. eCollection 2017 Jan-Feb.
- ⁵⁹ Ellepola K., Liu Y., Cao T., Koo H. (2017) Seneviratne, C.J. Bacterial GtfB Augments *Candida albicans* Accumulation in Cross-Kingdom Biofilms. *J. Dent. Res.* 96, 1129–1135.

Kraków, 12.01.2018

Wigima Jarczyk