

Katedra i Zakład Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



Załącznik nr 3a

Autoreferat
- podsumowanie osiągnięć naukowych

Jolanta Długaszewska

2019

1. **IMIĘ I NAZWISKO:** Jolanta Długaszewska

2. **POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE**

- **2010 – Dyplom specjalisty w dziedzinie Mikrobiologia Medyczna, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**
- **1998 - Dyplom specjalizacji pierwszego stopnia w zakresie mikrobiologii, Poznań.**
- **1996 - Dyplom doktora nauk farmaceutycznych.**

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Ocena bakteriologiczna środowiska Oddziału Oparzeń*”. Praca zrealizowana w Katedrze i Zakładzie Bakteriologii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, promotor: Prof. dr hab. med. Zygmunt Muszyński. Praca nagrodzona przez Rektora Akademii Medycznej w Poznaniu

- **1988 - Dyplom magistra analityki medycznej**

Tytuł pracy magisterskiej: „Ocena mikrobiologiczna dwóch nowych kompozycji antyseptycznych”. Praca zrealizowana w Katedrze i Zakładzie Bakteriologii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, promotor: Prof. dr hab. med. Zygmunt Muszyński.

3. **INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH**

2012 – nadal Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra i Zakład Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej, starszy wykładowca

2007 – 2012 Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra i Zakład Bakteriologii Farmaceutycznej, starszy wykładowca

1998 – 2007 Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra i Zakład Bakteriologii Farmaceutycznej, adiunkt

1989 – 1998 Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra i Zakład Bakteriologii Farmaceutycznej, asystent

1988 – 1989 Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra i Zakład Bakteriologii Farmaceutycznej, asystent stażysta

4. **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

„Biofilm - wyzwanie dla nauk farmaceutycznych”

Podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi cykl 7 publikacji (6 oryginalnych i 1 praca pogładowa), w których przedstawiono wyniki badań dotyczących roli biofilmu w zakażeniach przewlekłych, antybiotykooporności oraz zastosowania terapii fotodynamicznej skierowanej przeciw drobnoustrojom oraz nanocząstek, jako alternatywnej do antybiotykoterapii metody walki z drobnoustrojami i biofilmem.

b) WYKAZ PUBLIKACJI

1. Jolanta Długaszewska, Małgorzata Leszczyńska (✉), Marcin Lenkowski, Agnieszka Tatarska, Tomasz Pastusiak, Witold Szyfter, The pathophysiological role of bacterial biofilms in chronic sinusitis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2016, Vol. 273, nr 8, s. 1989-1994.

IF: 1.660; liczba punktów MNiSW: 25.0

2. Jolanta Długaszewska (✉), Marta Antczak, Izabella Kaczmarek, Renata Jankowiak, Małgorzata Buszkiewicz, Magdalena Herkowiak, Klaudia Michalak, Helena Kukuła, Magdalena Ratajczak, *In vitro* biofilm formation and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of patients with cystic fibrosis. *J. Med. Sci.* 2016, Vol. 85, nr 4, s. 245-253.

IF: 0; liczba punktów MNiSW: 10.0

3. Jolanta Długaszewska (✉), Magdalena Ratajczak, Marcelina Jaworska, Marzena Gajęcka, Biofilm i jego znaczenie w mikrobiologii medycznej i farmaceutycznej. W: Kierunki rozwoju chemii leków. Księga Jubileuszowa Profesor Marianny Zajac. Pod red.: Anny Jelińskiej i Izabeli Muszalskiej. Poznań, 2017 *Wydaw. Nauk. Uniw. Med. im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu*, s. 101-106.

IF: 0; liczba punktów MNiSW: 5.0

4. Jolanta Długaszewska, Wojciech Szczęółko (✉), Tomasz Koczorowski, Paulina Skupin-Mrugalska, Anna Taubert, Krystyna Konopka, Małgorzata Kucińska, Marek Murias, Nejat Düzgünes, Jadwiga Mielcarek, Tomasz Gośliński (✉), Antimicrobial and anticancer

photodynamic activity of a phthalocyanine photosensitizer with N-methyl morpholiniummethoxy substituents in non-peripheral positions. *J. Inorg. Biochem.* 2017, Vol. 172, s. 67-79.

IF: 3.348; liczba punktów MNiSW: 35.0

5. Jolanta Długaszewska (✉), Magdalena Ratajczak, Tomasz Koczorowski, Wojciech Szczęółko, Fotodynamiczna aktywność soli oktajodowej magnezowej ftalocyjaniny wobec biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*. *Przemysł chemiczny*, 2019, Vol.98, nr 5, s. 1000-1002;

IF: 0.399; liczba punktów MNiSW: 15

6. Renata Dobrucka (✉), Jolanta Długaszewska, Mariusz Kaczmarek, Cytotoxic and antimicrobial effect of biosynthesized SnO₂ nanoparticles using *Pruni spinosae* flos extract. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 2019, s. 1-10,

IF: 0; liczba punktów MNiSW: 5

7. Jolanta Długaszewska (✉), Renata Dobrucka, Effectiveness of biosynthesized trimetallic Au/Pt/Ag nanoparticles on planktonic and biofilm *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* forms. *Journal of Cluster Science*, przyjęto do druku, DOI:10.1007/s10876-019-01570-3

IF: 1.715; liczba punktów MNiSW: 20

Sumaryczna wartość Impact Factor dla siedmiu prac wynosi IF=6,837 oraz 115 pkt. MNiSW

* Oświadczenia współautorów wraz z określeniem indywidualnego wkładu w powstanie poszczególnych prac zamieszczono w załączniku 5. Oświadczenia habilitanta dotyczące zakresu wykonywanych prac wraz z określeniem procentowego udziału znajdują się w załączniku 4.



**c) OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO PRAC STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE,
UZYSKANYCH WYNIKÓW ORAZ POTENCJALNEGO WYKORZYSTANIA.**

Wprowadzenie w dziewiętnastym wieku przez Roberta Kocha i jego uczniów klarownych płynnych lub zestalonych agarem pożywek umożliwiło obserwację wzrostu bakterii w postaci swobodnie unoszących się komórek – planktonu lub ich skupisk na powierzchni pożywki – kolonii. Przez wiele lat naukowcy koncentrowali się na tych właśnie formach bytowania bakterii, pomimo że już w XVII wieku Anton Van Leeuwenhoek opisywał bakterie w płytce nazębnej jako pozornie stacjonarne skupiska [1]. Obecnie wiadomo, że ten osiadły tryb życia drobnoustrojów, określany jako biofilm (błona biologiczna), jest trzecią, najczęściej spotykaną formą ich bytowania [2, 3]. Biofilm może powstawać na powierzchniach biotycznych i abiotycznych. Szacuje się, że w środowisku naturalnym ponad 99,9% bakterii występuje w formie biofilmu, a od 60% do ponad 80% zakażeń u ludzi związanych jest z obecnością tej formy [4, 5].

Definicja biofilmu ciągle ewoluuje i odzwierciedla postępy w badaniach. Donlan i Costerton definiują biofilm jako „osiadłą populację drobnoustrojów, charakteryzującą się komórkami o zmiennym fenotypie i genotypie, nieodwracalnie przytwierdzonymi do podłoża lub wzajemnie do siebie, osadzonymi w macierzy pozakomórkowej zbudowanej z polimerów (EPS – ang. extracellular polymeric substances)” [6]. Zróżnicowanie w obrębie biofilmu wynika z dostępności do składników odżywczych i tlenu, różnic temperatury czy pH, co przyczynia się do heterogennej ekspresji genów, nawet w komórkach sąsiadujących. W biofilmie występują komórki o zróżnicowanym metabolizmie, od aktywnie namnażających się, do komórek w stanie anabiozy. Drobnoustroje w biofilmie egzystują we wzajemnie powiązanych korzystnych relacjach, co umożliwia bardzo efektywne wykorzystanie substancji odżywczych i jest korzystne dla całej społeczności drobnoustrojów. Istotną rolę w procesie powstawania i funkcjonowania biofilmu odgrywa zjawisko „*Quorum Sensing*” (QS), polegające na komunikowaniu się drobnoustrojów za pomocą wytwarzanych sygnałów chemicznych (autoinduktorów), których odpowiednie stężenie prowadzi do zmiany ekspresji genów i do efektywnego współdziałania całej populacji. Komórki w biofilmie mają odmienną od swoich planktonicznych odpowiedników ekspresję genów i aktywność metaboliczną [7-9].

Biofilm chroni drobnoustroje przed niekorzystnymi czynnikami fizycznymi (np. wysuszeniem, promieniowaniem UV), chemicznymi (substancjami o działaniu

przeciwdrobnoustrojowym) oraz biologicznymi (czynnikami układu odpornościowego gospodarza) [10-12].

Oporność form planktonicznych na antybiotyki oraz środki dezynfekcyjne, wynika z obecności naturalnych lub nabytych (mutacje, transfer genów) mechanizmów oporności. Cechująca biofilm, zmniejszona w porównaniu do form planktonicznych, wrażliwość na środki przeciwdrobnoustrojowe może wynikać z tolerancji lub oporności na substancje biobójcze. Na zjawiska te wpływa wiele współdziałających czynników, takich jak: (i) zróżnicowana aktywność metaboliczna komórek (obniżone tempo wzrostu lub stan zbliżony do anabiozy obniża aktywność środków działających na komórki namnażające się), (ii) obecność subpopulacji komórek przetrwałych (persister cells) bytujących w stanie spoczynku, (iii) zmiany ciśnienia parcjalnego tlenu i dwutlenku węgla (aminoglikozydy wykazują brak aktywności przy niskim poziomie tlenu) zmiany stężenia jonów wodorowych (makrolidy, tetracykliny – niższa aktywność przy obniżonym pH), (iv) obecność zewnątrzkomórkowej macierzy (ogranicza penetrację związków chemicznych mechanicznie, poprzez biosorpcję lub immobilizację; chroni przed stresem oksydacyjnym) [7, 10, 13, 14]. Ponadto, w komórkach biofilmu mogą występować mechanizmy oporności spotykane u form planktonicznych, a zagęszczenie komórek w biofilmie sprzyja transferowi genów oporności.

Oporność drobnoustrojów na stosowane w terapii zakażeń leki, stanowi zagrożenie dla zdrowia publicznego na całym świecie. Zgodnie z raportem Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2014 roku we wszystkich regionach świata, notuje się wysoki odsetek szczepów opornych spośród drobnoustrojów powszechnie izolowanych z najczęściej występujących zakażeń (np. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*) [15]. Powagę istniejącego problemu podkreśla fakt opublikowania w 2017 roku przez WHO listy patogenów najbardziej niebezpiecznych ze względu m. in. na wysoką śmiertelność i brak możliwości terapeutycznych [16]. W grupie drobnoustrojów krytycznych znalazły się: *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa* oporne na karbapenemy, pałeczki *Enterobacteriaceae* oporne na karbapenemy i cefalosporyny trzeciej generacji, a do grupy o wysokim priorytecie zaliczono między innymi *Enterococcus faecium* oporny na wankomycynę oraz meticylinooporny i oporny na wankomycynę *Staphylococcus aureus*. Wg WHO opracowanie nowych leków dla tych drobnoustrojów powinno być priorytetem w najbliższych latach.

W obliczu narastania oporności i kurczącej się liczby skutecznych leków przeciwdrobnoustrojowych, a także trudności w leczeniu przewlekłych, uporczywych zakażeń związanych z biofilmem, wzrasta zainteresowanie alternatywnymi lub komplementarnymi do

antybiotykoterapii metodami walki z drobnoustrojami. Poszukiwane są nowe metody i preparaty o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, jak i opracowywane są nowe zastosowania dla tych już znanych [17-20].

Jedną z odkrywanych na nowo metod jest terapia fotodynamiczna (PDT). Pierwsze doniesienia o skuteczność terapii fotodynamicznej przeciw drobnoustrojom (PACT) datuje się na 1900 rok, kiedy to Oskar Raab zaobserwował zahamowanie wzrostu pantofelków w obecności barwników akrydynowych i światła [21]. Terapia fotodynamiczna skierowana przeciw drobnoustrojom, nazywana jest również fotodynamiczną inaktywacją drobnoustrojów (PDI) lub dezynfekcją aktywowaną światłem. Najbardziej prawidłowym terminem jest PACT z ang. *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy* tj. Fotodynamiczna antymikrobiologiczna chemioterapia. Nazwa wynika z faktu, iż wszystkie „antymikrobiologiczne” fotouczulacze wykazują słabą aktywność w ciemności, natomiast po aktywacji światłem ich działanie potęguje się [22, 23]. Metoda PACT opiera się na reakcji fototoksycznej, której mechanizm działania wykorzystuje interakcję fotouczulacza (PS), promieniowania o odpowiedniej dla PS długości fali oraz tlenu. Fotouczulacz poddany ekspozycji na światło ulega wzbudzeniu, w wyniku czego generowane są reaktywne formy tlenu (ROS) działające toksycznie na komórki [24, 25].

Ograniczone przenikanie promieniowania w głąb tkanek, predysponuje zastosowanie PDT głównie w leczeniu chorób powierzchniowych, ale sprawdza się także w leczeniu innych schorzeń. Duże nadzieje wiąże się z możliwością zastosowania PDT w leczeniu niektórych nowotworów oraz chorób takich jak łuszczyca, rogowacenie słoneczne, reumatoidalne zapalenie stawów, degeneracja plamki żółtej, trądzik różowaty, zakażenia skóry i błon śluzowych [26-29].

Niewątpliwą zaletą PACT jest wielokierunkowy mechanizm działania RFT (reaktywne formy tlenu), co pozwala przypuszczać, że drobnoustroje nie będą zdolne do wytworzenia oporności, pomimo wielokrotnego stosowania [30, 31]. Bardzo istotny wydaje się również fakt, iż w czasie fotodynamicznej inaktywacji dochodzi do inhibicji wydzielania bakteryjnych czynników zjadliwości, takich jak endotoksyny czy enzymy oraz wzrostu wydzielania cytokin prozapalnych przez monocyty, a przez to do zmniejszenia aktywności biologicznej lipopolisacharydów (LPS) i proteaz bakteryjnych [26, 32].

Kluczowym elementem terapii fotodynamicznej jest dobór właściwego fotouczulacza, posiadającego odpowiednie właściwości takie jak: rozpuszczalność, dystrybucja, zdolność wiązania z komórkami i kumulacji w organelach, brak toksyczności ciemnej, wysoka

wydajność generowania RFT, duża absorpcja promieniowania zakresu czerwonego (600-800 nm) – najefektywniej penetrującego tkanki [33, 34, 35].

Wielkość cząsteczki PS, jego rozpuszczalność, a także ładunek wpływa na interakcję z komórkami, przenikanie do wnętrza komórki oraz gromadzenie się w strukturach komórkowych [34]. Formy kationowe (dodatnie) charakteryzuje najszersze spektrum działania. Są bowiem aktywne wobec bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich i grzybów. Związki anionowe oraz neutralne wykazują powinowactwo głównie do komórek Gram-dodatnich. Fakt ten wynika bezpośrednio z budowy ściany komórkowej drobnoustrojów. U bakterii Gram-dodatnich błona cytoplazmatyczna otoczona jest przez porowatą ścianę komórkową, co pozwala na wnikięcie fotouczulacza do wnętrza komórki. Bakterie Gram-ujemne posiadające cienką warstwę peptydoglikanu, otoczone są błoną zewnętrzną z ujemnie naładowanymi LPS, co warunkuje wiązanie do komórki wyłącznie form kationowych [36]. Komórki grzybicze posiadają relatywnie grubą warstwę β -glikanu i chityny co sprawia, że przepuszczalność dla PS, osiąga wartości pośrednie jakie obserwuje się dla bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [37].

W PDT jako PS stosowane są np. porfiryny, tetrapiole, ftalocyjaniny, porfirceny, teksafiryny, szafiryny, chloryny i purpuryny. Większość wymagań stawianych idealnym fotouczulaczom spełniają ftalocyjaniny (Pcs) i z tymi związkami wiąże się duże nadzieje na możliwość zastosowania w PACT [22, 23, 38, 39].

Kolejną dziedziną, która znajduje zastosowanie w walce z drobnoustrojami jest nanotechnologia. Istnieje wiele rodzajów nanomateriałów i nanocząstek. Nanocząstki (NPs) posiadają odmienne właściwości fizykochemiczne od większych cząstek tego samego materiału. Na zmianę właściwości np.: katalitycznych, adsorpcyjnych czy przeciwdrobnoustrojowych wpływa zwiększona powierzchnia właściwa cząstek [40]. Przeciwdrobnoustrojowe działanie NPs wynika z ich specyficznych właściwości, a szczególnie dużej powierzchni. NPs adsorbują do powierzchni komórek drobnoustrojów, powodują uszkodzenie błony komórkowej i lizę komórki, zaburzają replikację DNA, powodują dezaktywację ważnych enzymów oraz stymulują wytwarzanie RFT [40-42].

W ostatnich dekadach nanocząstki metali (np.: srebro, złoto, miedź, pallad, platyna) i ich tlenków (np.: ZnO, Al₂O₃, TiO₂, CuO), znalazły się w kręgu zainteresowań wielu zespołów badawczych. Wyniki eksperymentów wskazują, że na aktywność przeciwdrobnoustrojową NPs wpływają morfologia i właściwości fizykochemiczne cząstek [40]. Uzyskanie nanocząstek o pożądanych właściwościach uzależnione jest od zastosowanej techniki syntezy. Najczęściej nanocząstki wytwarzane są metodami fizycznymi lub chemicznymi. Metody te,

poprzez zastosowanie odpowiednich technik fizycznych, warunków reakcji chemicznych pozwalają na uzyskanie NPs o zamierzonej wielkości i kształcie. Niestety, powstające w czasie syntezy chemicznej odpady są toksyczne mogą stanowić zagrożenie dla środowiska. Dlatego na popularności zyskują metody biologiczne (stosowane w przedmiotowym Osiągnięciu) wykorzystujące bakterie, grzyby lub ekstrakty roślinne do syntezy NPs [43]. Są to metody ekologiczne, pozwalające na ograniczenie zastosowania toksycznych odczynników, mało energo- i procochłonne. Odpowiedni dobór drobnoustrojów lub ekstraktów roślinnych jako bio reduktorów oraz warunków reakcji umożliwia otrzymanie nanocząstek o dowolnej wielkości i kształcie [43, 44].

Omówienie osiągnięcia naukowego

Celem przedstawionego osiągnięcia naukowego była wielowątkowa analiza biofilmu w aspekcie zakażeń o charakterze przewlekłym oraz poszukiwanie alternatywnych do antybiotykoterapii metod walki z drobnoustrojami.

Powyższy cel badawczy realizowano wykonując następujące zadania:

1. Wykrywanie obecności biofilmu u chorych z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych, poddanych operacyjnej funkcjonalnej endoskopowej chirurgii zatok przynosowych.
2. Ocena zdolności wytwarzania biofilmu przez drobnoustroje izolowane z zakażeń przewlekłych oraz określenie wrażliwości na antybiotyki pałeczek *Pseudomonas aeruginosa* bytujących w formie biofilmu.
3. Analiza zdolności fotoinaktywacji bakterii bytujących w formie planktonicznej oraz biofilmu przy zastosowaniu nowej oktajodowej soli kompleksu 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(4-N-metylomorfolin-4-ilo)etoksy]ftalocyjaniny z magnezem(II).
4. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej nanocząstek SnO₂ oraz trimetalicznych nanocząstek złożonych ze złota, srebra i platyny, uzyskanych na drodze syntezy biogenicznej, wobec bakterii bytujących w formie planktonicznej i w biofilmie.

Omawiając rolę biofilmów w patogenezie zakażeń człowieka wymienia się głównie zakażenia przewlekłe, a szczególnie zakażenia w otolaryngologii, zakażenia dróg oddechowych u chorych na mukowiscydozę, zakażenia ran przewlekłych oraz infekcje związane ze stosowaniem różnego typu biomateriałów, takich jak protezy stawowe, różnego typu implanty, cewniki naczyniowe i urologiczne [45, 46]. Do tej grupy zakażeń należy

przewlekłe zapalenie zatok przynosowych (PZZP). Infekcja ta jest jedną z najczęstszych przyczyn zgłaszania się chorych do lekarza. Pomimo tak powszechnego występowania, wiedza dotycząca etiopatogenezy PZZP pozostaje ograniczona i niekompletna. Uważa się, że patogeneza tej choroby jest wieloczynnikowa, a jedną z najczęściej uwzględnianych przyczyn jest biofilm. Wyniki badań przedstawionych w **publikacji 1** dotyczą zagadnienia częstości występowania biofilmu u chorych cierpiących na PZZP. Ponadto, dotyczą problemu czy drobnoustroje izolowane z zatok przynosowych są zdolne do wytwarzania biofilmu *in vitro*?

Na potrzeby badań przedstawionych w pracy opracowałam koncepcje i założenia eksperymentów pozwalających na ocenę, pod względem występowania biofilmu na błonie śluzowej zatok przynosowych. Pierwszym najważniejszym etapem był pobór odpowiednich próbek do badań. Zaproponowałam schemat pobierania i przygotowania do badań bioptatów błony śluzowej od pacjentów dwóch grup eksperymentalnych. Od pacjentów grupy badanej - chorych na PZZP - pobierano błonę śluzową zatok przynosowych podczas funkcjonalnej endoskopowej chirurgii nosa i zatok sitowych przednich. Od chorych grupy kontrolnej - pacjentów ze skrzywioną przegrodą nosa i przerostowym nieżytem błony śluzowej nosa, zakwalifikowanych do septoplastyki i konchoplastyki - pobierano błonę śluzową małżowiny nosowej. W badaniach uwzględniłam kryteria wykluczające pacjentów takie jak: obniżona odporność, dyskineza rzęsek, ostra infekcja górnych dróg oddechowych oraz przyjmowanie leków sterydowych i antybiotyków w ciągu czterech tygodni przed zabiegiem. Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy UMP nr 225/13. Wszyscy pacjenci wyrazili pisemną zgodę na uczestnictwo w badaniach oraz wypełnili ankiety dotyczące stanu zdrowia (w obecności osoby biorącej udział w projekcie).

Wykrywanie biofilmu na badanych fragmentach błony śluzowej zatok, prowadzono przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Ponadto, metodami hodowlanymi określono profil drobnoustrojów występujących w pobranych materiałach. W zaproponowanym przeze mnie schemacie opracowania pobranych tkanek, uwzględniłam usuwanie niezwiązanych w biofilmie drobnoustrojów za pomocą trzykrotnego płukania bioptatu w 0,9% NaCl. Próbkę do badań mikrobiologicznych były ponadto homogenizowane, co pozwoliło na uzyskanie jednorodności próbki i większą możliwości wyhodowania drobnoustrojów bytujących wewnątrz komórek gospodarza (komórek nabłonkowych, makrofagów, neutrofili). Zdolność wyizolowanych drobnoustrojów do wytwarzania biofilmu *in vitro*, oceniłam za pomocą metody spektrofotometrycznej w formie płytki titracyjnej z użyciem fioletu krystalicznego.



Badania prowadzone za pomocą SEM wykazały obecność biofilmu w większości (76,7%) bioptatów błony śluzowej pobranych od pacjentów z PZZP oraz w 45% prób pobranych od pacjentów grupy kontrolnej. W badaniach hodowlanych obecność drobnoustrojów stwierdzono w 29 z 30 próbek pobranych od pacjentów z PZZP oraz we wszystkich próbkach pobranych od pacjentów grupy kontrolnej, jednakże odnotowano różnice w izolowanych gatunkach. Od pacjentów grupy kontrolnej izolowano głównie gronkowce koagulazo-ujemne (CNS) i *Streptococcus mitis*. Natomiast spektrum drobnoustrojów izolowanych od pacjentów grupy badanej, było bardziej zróżnicowane i oprócz CNS izolowano również pałeczki Gram-ujemne, głównie z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz bakterie beztlenowe. Większość szczepów izolowanych od pacjentów obu grup (81% grupa badana, 89,2% grupa kontrolna), wykazywała zdolność tworzenia biofilmu *in vitro*. Wyniki badań dodatkowo wskazują, że biofilm nie jest jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za PZZP, a o wystąpieniu infekcji może decydować wiele elementów.

Uważa się, że biofilm może być przyczyną niepowodzeń terapeutycznych i nawrotów choroby. Rutynowo prowadzone w laboratoriach mikrobiologicznych badania wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki, oceniają efekt leku na bakterie planktoniczne w wykładniczej fazie wzrostu. W biofilmie bytują komórki o różnej aktywności metabolicznej. Zasadnym wobec tego wydaje się pytanie - w jakim stopniu stosowane rutynowo testy oceny lekowrażliwości bakterii - ułatwiają dobór odpowiedniego antybiotyku w tego typu infekcjach?

Z tego względu w kolejnych badaniach (**publikacja 2**) podjęłam próbę oceny wrażliwości bakterii na antybiotyki w zależności od ich formy bytowania. Chronicznym, związanym z występowaniem biofilmu zakażeniem, które często prowadzi do śmierci, jest zapalenie płuc chorych na mukowiscydozę (CF). Zakażenie to najczęściej, obok *Staphylococcus aureus*, powodowane jest przez *Pseudomonas aeruginosa*. Pałeczki *P. aeruginosa* posiadają liczne czynniki oraz mechanizmy odpowiedzialne za chorobotwórczość, a ich naturalna i nabyta oporność na wiele antybiotyków powoduje trudności w eradykacji tego drobnoustroju. Ponadto, warunki środowiskowe płuc chorych na CF, indukują *P. aeruginosa* do zwiększenia produkcji biofilmu, który chroni je przed układem odpornościowym gospodarza oraz antybiotykami.

Badania prowadziłam na szczepach *P. aeruginosa* wyizolowanych z dolnych dróg oddechowych chorych na CF. Użyte do badań drobnoustroje zostały scharakteryzowane pod względem zdolności do wytwarzania biofilmu *in vitro*. W badaniach określiłam wrażliwość *P. aeruginosa* na antybiotyki oznaczając najmniejsze stężenia hamujące wzrost bakterii

bytujących w formie planktonicznej (MIC, minimal inhibitory concentration) oraz w formie biofilmu (BIC, biofilm inhibitory concentration). MIC oznaczono zgodnie z zaleceniami EUCAST [47], natomiast BIC wyznaczono zmodyfikowaną metodą spektrofotometryczną wg Moscowitz [48].

Spśród 22 użytych w badaniu szczepów, 18 (82%) należało do silnych producentów biofilmu, dwa szczepy wytwarzały biofilm w stopniu umiarkowanym, jeden w stopniu słabym, a jeden szczep nie wytwarzał biofilmu. Antybiotykiem, dla którego odnotowano największe różnice w aktywności wobec komórek planktonicznych i biofilmu, okazała się piperacylina, która zastosowana w najwyższym badanym stężeniu wynoszącym 4096 mg/L, nie hamowała wzrostu biofilmu w przypadku wszystkich ocenianych szczepów. Wysokie wartości BIC w stosunku do MIC odnotowano dla ceftazydymu, nieco mniejsze dla ciprofloksacyny i amikacyny. Otrzymane wyniki wskazują, że nie należy stosować wymienionych leków, a szczególnie piperacyliny, w zakażeniach przewlekłych powodowanych przez *P. aeruginosa*. Aktywność badanych leków wobec komórek planktonicznych, nie korelowała z aktywnością wobec biofilmu. Z przeprowadzonych badań wynika, że nie jest możliwe prognozowanie skuteczności terapii zakażeń związanych z biofilmem, na podstawie wyników oceny lekowrażliwości dla form planktonicznych. Testy oznaczające MIC czy MBC (najmniejsze stężenie działające bakteriobójczo) z dużym prawdopodobieństwem przewidują działanie leku na drobnoustroje szybko dzielące się, co ma miejsce w przypadku zakażeń ostrych. Test zastosowany do oznaczania BIC jest możliwy do wykonania w laboratoriach medycznych. Wskazaniem byłoby wdrożenie tego testu do rutynowej oceny lekowrażliwości bakterii bytujących w formie biofilmu, szczególnie w przypadku chorych na mukowiscydozę czy PZZP.

Uzupełnieniem powyższych prac jest **publikacja 3**, dotycząca roli biofilmu w medycynie i farmacji. W pracy przedstawiłam aktualną wiedzę na temat struktury, procesu tworzenia i funkcjonowania biofilmu, jego cech fenotypowych, zjawiska *Quorum Sensing* (QS) oraz tolerancji i oporności na antybiotyki. Omówiłam zakażenia związane z biofilmem, a także zagadnienia dotyczące diagnostyki i leczenia zakażeń. Ponieważ obok mikrobiologii medycznej, moje zainteresowania dotyczą także mikrobiologii farmaceutycznej, w publikacji omówiono także znaczenie biofilmu w środowisku produkcji farmaceutycznej, gdzie występowanie biofilmu na powierzchni sprzętów i urządzeń, może prowadzić do zanieczyszczenia produktów leczniczych drobnoustrojami.

Zjawisko biofilmu jest problematyczne nie tylko z powodu tolerancji i oporności na antybiotyki oraz trudności jego eradykacji. Wskazuje się także na dużą rolę biofilmu

w szerzeniu się antybiotykooporności. Fizjologia biofilmu umożliwia osadzoną w nim bakteriom przetrwanie długotrwałej ekspozycji na antybiotyki, co zwiększa szansę nabycia na dany lek oporności, a nagromadzenie komórek i ruchomych elementów genetycznych w biofilmie, sprzyja horyzontalnemu transferowi genów oporności. Ponadto, antybiotyki nie zawsze całkowicie eliminują drobnoustroje i w miejscu zakażenia mogą przetrwać pojedyncze komórki. Nieskuteczna antybiotykoterapia, możliwość przetrwania wielolekoopornych drobnoustrojów sprawiają, że coraz intensywniej poszukiwane są skuteczne, „nieantybiotykowe” metody niszczenia drobnoustrojów.

Jedną z tych alternatywnych metod jest opisana w **publikacji 4**, intensywnie rozwijająca się terapia fotodynamiczna skierowana przeciw mikroorganizmom PACT, której skuteczność w warunkach *in vitro* i *in vivo* wobec bakterii, grzybów, wirusów i pierwotniaków została wykazana przez wiele grup badawczych [49-52]. Metoda PACT, analogicznie jak w przypadku PDT, do prawidłowego działania wymaga obecności trzech elementów, tj. fotouczulacza, światła o odpowiedniej długości fali oraz tlenu. Do najczęściej wykorzystywanych grup związków spełniających rolę fotouczulaczy, należą związki makrocykliczne z grupy porfirynoidów – porfiryny, chloryny, porfirazyny oraz ftalocyjaniny.

W ramach współpracy z zespołem badawczym prof. dra hab. Tomasza Goślińskiego z Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych UMP, podjęłam ocenę fotodynamicznej aktywności związków z grupy ftalocyjanin (Pcs).

Są to makrocykliczne związki aromatyczne zawierające w centrum koordynacyjnym jony metali, charakteryzujące się dużą zdolnością generowania tlenu singletowego oraz optymalną fototrwałością [53, 54]. Duża możliwość chemicznej modyfikacji cząsteczek Pcs, umożliwia otrzymanie związków o korzystnych właściwościach fotochemicznych [55, 56]. Ze względu na hydrofobowy charakter cząsteczki, Pcs są słabo rozpuszczalne w środowisku wodnym i wykazują znaczną tendencję do tworzenia agregatów. Poprawę rozpuszczalności można osiągnąć m.in. poprzez wbudowanie do struktury podstawników peryferyjnych posiadających ładunek. Na przykład wbudowanie podstawnika obdarzonego ładunkiem dodatnim, ułatwia wiązanie z ujemnie naładowanymi komórkami bakterii, co zwiększa również aktywność przeciwdrobnoustrojową [57].

W **publikacji 4** przedstawiono wyniki badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej *in vitro* oktajodowej soli kompleksu 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(4-N-metylomorfolin-4-ilo)etoksy]ftalocyjaniny z magnezem(II) (**ftalocyjanina 2, Pc 2**).

W terapii fotodynamicznej bardzo cennym parametrem w przewidywaniu aktywności Ps wobec komórek nowotworowych i drobnoustrojów jest zdolność do wytwarzania

reaktywnych form tlenu. Wydajność kwantową tlenu singletowego **Pc 2** wyznaczono metodą porównawczą uzyskując zadowalające wyniki. Istotnym parametrem wpływającym na efektywność PACT jest zdolność wiązania się Ps z powierzchniowymi strukturami i penetracja komórek [35]. Ze względu na podobieństwo chemiczne do naturalnych fosfolipidów błonowych, syntetyczne fosfolipidy tworzące liposomy mogą służyć jako przybliżony model *in vitro*, dostarczając pewnych informacji na temat lipofilności Pcs i ich powinowactwa do błon komórkowych.

Określone w badaniach fizykochemicznych właściwości **Pc 2** wskazywały, że związek może wykazywać dobrą aktywność przeciwdrobnoustrojową po naświetleniu. W pierwszym etapie określono aktywność przeciwdrobnoustrojową **Pc 2** wobec planktonicznych form szerokiego spektrum wzorcowych i klinicznych szczepów drobnoustrojów: *Staphylococcus aureus* NCTC 4163, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49134, *Enterococcus faecalis* ATCC 49474, metycylinowrażliwego *Staphylococcus aureus* (MSSA), metycylinoopornego *Staphylococcus aureus* (MRSA), metycylinowrażliwego *Staphylococcus epidermidis* (MSSE), wankomycynoopornego *Enterococcus faecalis* (VRE), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749, *Serratia marcescens* ATCC 8100, *Candida albicans* ATCC i *Aspergillus niger* ATCC 16404. Bardzo wysoką zdolność fotoinaktywacji uzyskano po zastosowaniu **Pc 2** w stężeniu 1×10^{-4} M, w stosunku do wszystkich użytych w badaniu bakterii; uzyskano redukcję liczby żywych komórek o więcej niż 5log. Należy podkreślić, że na stopień redukcji nie wpływały stwierdzone w szczepach klinicznych mechanizmy oporności (MRSA, VRE). W niższych stężeniach (1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M) badana **Pc 2** wykazywała jedynie niewielką aktywność fotodynamiczną wobec *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49134 i *Staphylococcus epidermidis* MSSE (redukcja o 2,5log). W żadnym z zastosowanych stężeń **Pc 2** nie wykazywała aktywności przeciwgrzybiczej.

Należy podkreślić, że opisano wiele fotouczulaczy o obiecującej aktywności przeciw bakteriom Gram-dodatnim, ale tylko niektóre wykazują aktywność wobec szczepów Gram-ujemnych [58]. Pierwszym etapem PACT jest interakcja lub wiązanie się PS z powierzchnią komórki drobnoustroju. Powierzchnia bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych naładowana jest ujemnie, dlatego związki kationowe posiadające ładunek dodatni, efektywnie wiążą się do ich powierzchni. Nie mniej jednak, na wrażliwość na PACT wpływają także struktury powierzchniowe komórek. Obecny u bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych peptydoglikan jest relatywnie porowatą warstwą, przepuszczalną dla związków kationowych, anionowych i obojętnych PS [59]. Jednakże bakterie Gram-ujemne otoczone są dodatkowo błoną zewnętrzną stanowiącą barierę dla cząsteczek lipofilowych i hydrofilowych, i jedynie

cząsteczki amfipatyczne są zdolne pokonać tę barierę [60, 61]. Pomimo tego zjawiska, kationowe PS zastępują jony dwuwartościowe wiążące LPS (Ca^{2+} i Mg^{2+}), uszkadzając błonę zewnętrzną. Powstałe w ten sposób kanały w błonie zewnętrznej pozwalają na проникnięcie PS do wnętrza komórki. Fakt, że błona zewnętrzna i błona komórkowa są miejscami działania kationowych PS oraz duża zdolność generowania ROS wyjaśnia wysoką aktywność fotodynamiczną badanej ftalocyjaniny wobec bakterii Gram-ujemnych.

W przeciwieństwie do bakterii, nie stwierdzono aktywności fotodynamicznej **Pc 2** wobec grzybów. Ściana komórkowa grzybów zawiera mieszaninę polisacharydów i glikoprotein. Obecność steroli w błonie komórkowej sprawia, że ta struktura jest szczelnie upakowana i mniej przepuszczalna, co utrudnia wiązanie się i penetrację PS, czyniąc grzyby bardziej opornymi na PACT niż bakterie [37].

Ważnym problemem współczesnej medycyny jest lekooporność drobnoustrojów. Bakterie mogą rozwijać oporność praktycznie na każdy z obecnie stosowanych antybiotyków. [62, 63]. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że skuteczność PACT była niezależna od oporności na antybiotyki. Odpowiedź szczepów wielolekoopornych (MRSA, VRE) na inaktywację fotodynamiczną, była podobna do odpowiedzi szczepów nie posiadających żadnych mechanizmów oporności (MSSA, MSSE, szczepy referencyjne). Należy podkreślić, że w trakcie prowadzenia badań nie stwierdzono nabycia oporności na PACT [64]. Zazwyczaj leki penetrują komórki drobnoustrojów jedną z dwóch dróg: kontrolowanej dyfuzji lub aktywnego wiązania się z powierzchnią komórki. Jedną z przyczyn oporności drobnoustrojów na antybiotyki są zmiany w przepuszczalności i późniejsza niezdolność leku do dotarcia do miejsca działania. W przypadku PACT przenikanie fotouczulacza do komórki nie zawsze jest wymagane do uzyskania efektu toksycznego. Według Hamblin i in. [65], jeśli wystarczająca ilość tlenu singletowego może być wytworzona w pobliżu komórek bakteryjnych, to będzie zdolna do zabicia bakterii. Powyższa obserwacja może być jedną z przyczyn braku oporności na PACT.

Wysoka aktywność **Pc 2** wobec komórek planktonicznych bakterii, była impulsem do rozszerzenia badań o ocenę skuteczności PACT wobec biofilmu bakteryjnego. Skuteczność PACT wobec biofilmu bakteryjnego była znacznie niższa niż wobec komórek planktonicznych, pomimo zastosowania wyższego stężenia **Pc 2** ($1 \times 10^{-3} \text{M}$) i wydłużenia czasu preinkubacji. Należy zakładać, że obecność w biofilmie EPS może utrudniać absorpcję PS i utrudniać penetrację światła, a tym samym obniżać skuteczność PACT. Zadowalający stopień redukcji drobnoustrojów (>3 log) uzyskano dla bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus* NCTC 4163, MRSA). Niższe współczynniki redukcji odnotowano dla wzorcowych

i klinicznych szczepów *P. aeruginosa*. Nie odnotowano fototoksycznego działania wobec biofilmu *C. albicans*.

Oporność biofilmu na środki przeciwdrobnoustrojowe jest dużym problemem nie tylko w obszarach medycznych ale również w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i innych dziedzinach, gdzie biofilm tworzy się na powierzchni urządzeń i w systemach wodnych (**publikacja 5**). Aby przybliżyć możliwość zastosowania PACT w tym aspekcie, jako modelu badawczego do oceny inaktywacji fotodynamicznej biofilmu *P. aeruginosa* wykorzystałam **Pc2** i zastosowałam krążki ($\varphi=23\text{mm}$) różnych powszechnie stosowanych materiałów: tworzywo sztuczne, szkło, stal nierdzewna. Po naświetlaniu odnotowałam znaczną redukcję liczby komórek *P. aeruginosa* w biofilmie wytworzonym na powierzchni krążków. Uzyskane współczynniki redukcji przekraczały wartość 3 log dla wszystkich powierzchni i szczepów, z wyjątkiem biofilmu wzorcowego szczepu *P. aeruginosa* wytworzonym na powierzchni ze stali. Na podstawie uzyskanych wyników można uznać badaną ftalocyjaninę Pc2, za potencjalny czynnik przeciwko biofilmom *P. aeruginosa*.

Poszukując środków przeciwdrobnoustrojowych nowej generacji zainteresowałam się również nanocząstkami będącymi nanokrystalitami metali i tlenków metali. Wykorzystywanie metali jako czynników antybakteryjnych znane jest od wieków, natomiast w ostatnich dekadach uwagę wielu naukowców przyciągają ich nanocząstki (NPs). NPs charakteryzują się całkowicie nowymi lub ulepszonymi, w stosunku do większych cząstek czy materiałów litych właściwościami, które zawdzięczają swoim rozmiarom i morfologii [40]. NPs otrzymywane są za pomocą różnych metod chemicznych, fizycznych, fizykochemicznych i biologicznych. W czasie syntezy chemicznej i wytwarzania NPs metodami fizycznymi, wykorzystywane są toksyczne związki lub promieniowanie, a co więcej, stosowane odczynniki mogą osadzać się na wytwarzanych NPs. Osadzone na otrzymanych nanocząstkach związki toksyczne mogą wywoływać niepożądane skutki, zwłaszcza w przypadku preparatów do zastosowań medycznych. W związku z powyższym poszukuje się alternatywnych biogenicznych metod otrzymywania NPs. W **publikacji nr 6** przedstawiono biologiczną syntezę nanocząstek tlenku cyny przy użyciu ekstraktu z kwiatu tarniny (*Pruni spinosae flos*). Obecność NPs potwierdzono wykorzystując spektroskopię UV-Vis oraz IR z transformacją Fouriera. Kształt i wielkość NPs określono z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego, a morfologię powierzchni oceniono za pomocą mikroskopu sił atomowych, skaningowej mikroskopii elektronowej oraz wysokorozdzielczej skaningowej mikroskopii elektronowej. Aktywność przeciwdrobnoustrojową NPs SnO₂ określono wobec klinicznych i wzorcowych szczepów bakterii: *Staphylococcus aureus* NCTC 4163, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas*

aeruginosa NCTC 4749, *Staphylococcus aureus* K1, *Escherichia coli* K1, *Pseudomonas aeruginosa* K1 i grzybów: *Candida albicans* ATCC 6749, *Candida albicans* K1, *Aspergillus niger* ATCC 16404 i *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. Zastosowano metodę rozcieńczeniową lecz ze względu na charakter próbki (zmętnienie), oznaczono jedynie aktywność bójczą. Wykazałam wysoką aktywność bakteriobójczą (MBC od 0,012 mg/mL do 0,06 mg/mL) i grzybobójczą (MFC – najmniejsze stężenie grzybobójcze od 0,024 mg/mL do 0,03 mg/mL) badanych NPs SnO₂. Na podkreślenie zasługuje fakt odnotowania wyższej aktywności przeciwgrzybiczej niż przeciwbakteryjnej (z wyjątkiem *E. coli* ATCC 25922) badanych NPs, a zwłaszcza wysokiej aktywności wobec *A. niger* ATCC16404 (MFC=0,024 mg/mL) – drobnoustroju niewrażliwego na wiele czynników przeciwdrobnoustrojowych. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że syntezowane metodą biologiczną nanocząstki SnO₂ są obiecującym kandydatem jako czynnik przeciwdrobnoustrojowy.

Działanie przeciwdrobnoustrojowe monometalicznych nanocząstek metali znajduje szerokie zastosowanie, szczególnie nanocząstki srebra są najbardziej skomercjalizowanymi nanocząstkami metali i wchodzi w skład kilkuset produktów, począwszy od antybakteryjnych opatrunków, po artykuły gospodarstwa domowego. Znacznie mniej liczne są doniesienia o stosowaniu nanocząstek bimetalicznych, czy trimetalicznych. Wieloskładnikowe nanocząstki metali ujawniły spotęgowane i kumulatywne właściwości poszczególnych składników. W ramach badań oceniających aktywność przeciwdrobnoustrojową nanocząstek metali (**publikacja 7**), poddałam ocenie trimetaliczne nanocząstki zbudowane ze złota, srebra i platyny (Au/Pt/Ag NPs), uzyskane na drodze syntezy biologicznej z wykorzystaniem ekstraktu z kwiatu jasnoty białej (*Lamii albi flos*). Tożsamość trimetalicznych nanocząstek Au/Pt/Ag potwierdzono kilkoma metodami analitycznymi m.in. spektroskopii UV-Vis oraz IR, skaningowej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej, a także mikroskopii sił atomowych.

Badania mikrobiologiczne wykazały aktywność bakteriostatyczną (MIC=10%) i bakteriobójczą (MBC od 16,7±5,8) trimetalicznych nanocząstek Au/Pt/Ag wobec bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus* NCTC 4163, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) i Gram-ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 25922) oraz grzybostatyczną (MIC=20%) i grzybobójczą (MFC=40%) wobec *Candida albicans* ATCC 10231. Ponadto, badane Au/Pt/Ag NPs wykazały silne działanie bakteriostatyczne (MIC=10%) i bakteriobójcze (MBC=20%) wobec ośmiu klinicznych szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* izolowanych z krwi i moczu. Aktywność bójczą Au/Pt/Ag NPs wobec enterokoków potwierdzono wyznaczając logarytmiczny współczynnik redukcji liczby drobnoustrojów, po ekspozycji bakterii

na działanie NPs w stężeniu równym MBC. Oceniane Au/Pt/Ag NPs wykazały szybkie działanie bójcze, redukując liczbę żywych komórek o więcej niż 5 log w czasie 5 min.

Jednym z czynników wirulencji enterokoków jest zdolność tworzenia biofilmu. Połowa z użytych w badaniu szczepów wykazała w badaniach *in vitro*, z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej, zdolność do wytwarzania biofilmu. Oznaczona w badaniach ilościowych liczba komórek w biofilmie wzrastała w czasie i po 72 h inkubacji wahała się od $>10^4$ CFU/ml do $>10^7$ CFU/ml, zależnie od szczepu. W badaniach oceniono wpływ Au/Pt/Ag NPs na dojrzwały (72h), wytworzony przez bakterie z rodzaju *Enterococcus* biofilm, w stężeniach równych MIC, MBC i 2xMBC wyznaczonych dla komórek planktonicznych w czasie 5 min, 2 h, 6 h, 12 h i 24 h. Wykazano, że redukcja liczby żywych komórek wzrastała wraz ze wzrostem stężenia Au/Pt/Ag NPs i czasem działania. Niewielkie działanie bójcze oceniane NPs wykazywały już w stężeniu równym MIC (współczynnik redukcji po 2 h działania wynosił ok. 0,5 log, a po 24 h nieco poniżej 3 log w odniesieniu do prób kontrolnych, niepoddanych działaniu NPs), silniejsze w stężeniu równym MBC. Natomiast po zastosowaniu NPs w stężeniu równym dwukrotności MBC liczba komórek w biofilmie obniżyła się o ok. 4 log już po 2 h i o ok. 5 log po 6 h działania.

Podsumowanie

W przedstawionych pracach:

- Wykazano obecność biofilmu na błonie śluzowej zatok przynosowych u chorych z PZZP oraz u osób nie cierpiących na PZZP. Stwierdzono, że mikrobiota zatok przynosowych osób z PZZP charakteryzowała się większym zróżnicowaniem w stosunku osób bez PZZP.
- Odnotowano wysoką oporność biofilmów *Pseudomonas aeruginosa* na leki stosowane w terapii zakażeń powodowanych przez ten drobnoustrój. Wskazano, że wyniki stosowanych rutynowo w laboratoriach diagnostycznych testów oceny lekowrażliwości, nie pozwalają na poprawne prognozowanie skuteczności leczenia w przypadku zakażeń związanych z biofilmem. Wysoka oporność na antybiotyki bakterii bytujących w formie biofilmu wskazuje na konieczność opracowania nowych „nieantybiotykowych” metod walki z drobnoustrojami.
- Wykazano wysoką aktywność fotodynamiczną soli oktajodowej magnezowej ftalocyjaniny wobec form planktonicznych bakterii Gram-dodatnich i bakterii Gram-ujemnych, niezależnie od posiadanych przez te drobnoustroje mechanizmów oporności.
- Oktajodowa sól magnezowej ftalocyjaniny, w badaniach prowadzonych w formacie płytki titracyjnej, wykazywała niską lub nieznaczną aktywność fotodynamiczną wobec biofilmów *S. aureus* i *P. aeruginosa*, natomiast znaczące działanie fototoksyczne odnotowano wobec

biofilmów *P. aeruginosa* wytworzonych na powierzchniach z tworzywa sztucznego, stali nierdzewnej, szkła. Na uzyskane wyniki mogły wpłynąć charakter powierzchni, na której wytworzony był biofilm oraz ułatwiony dostęp światła, w przypadku zastosowania krążków.

- Wykazano że 1,4,8,11,15,18,22,25-octakis[2-(4-N-metylomorfolin-4-ium-4-ilo)etoksy] ftalocyjanina magnezu(II) może być dobrym kandydatem do opracowania nowej metody walki z drobnoustrojami opartej na fotodynamicznej inaktywacji.
- Wykazano dobrą aktywność bójczą wobec bakterii i grzybów nanocząstek SnO₂ zsyntezowanych za pomocą nowej biologicznej metody z użyciem ekstraktu z kwiatu tarniny (*Pruni spinosae flos*).
- Odnotowane w badaniach właściwości fizykochemiczne i biologiczne nanocząstek SnO₂ wskazują że można je uznać za potencjalny czynnik przeciwko szerokiemu spektrum drobnoustrojów.
- Wykazano wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową trimetalicznych nanocząstek Au/Pt/Ag, zsyntezowanych za pomocą nowej biologicznej metody z użyciem ekstraktu z kwiatu jasnoty białej (*Lamii albi flos*) wobec szerokiego spektrum drobnoustrojów (bakterii Gram-dodatnich, bakterii Gram-ujemnych i grzybów).
- Badania wykazały silne działanie bójcze trimetalicznych nanocząstek Au/Pt/Ag wobec komórek bytujących w formie planktonicznej, jak i w postaci biofilmu, co wskazuje że Au/Pt/Ag NPs są dobrym kandydatem do opracowania nowej metody walki z biofilmem bakteryjnym.

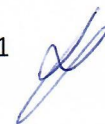
W badaniach podkreślono rolę biofilmów i oporności na antybiotyki jako jedną z przyczyn trudności w zwalczaniu zakażeń i eradykacji drobnoustrojów. Wskazano trzy „nieantybiotykowe” czynniki, które mogą być zastosowane do opracowania nowych metod przeciwdrobnoustrojowych.

Plany na przyszłość

Dalsze badania planuję rozszerzyć o poszukiwanie substancji/metod pozwalających na zwiększenie skuteczności PACT wobec biofilmów bakteryjnych, poprzez zwiększenie zdolności penetracji fotouczulaczy w biofilmie, zaburzenie struktury biofilmu, zwiększenie dostępności i penetracji światła. W tym celu do grupa fotosensybilizatorów dołączyłam pochodne porfirynoidowe. Przeprowadziłam badania pilotażowe z użyciem wyciągów roślinnych i substancji powierzchniowo-czynnych. Planuję również poszerzyć badania nad bi- i trimetalicznymi nanocząstkami o nowe nanomateriały i grupy drobnoustrojów, szczególnie o pałeczki *P. aeruginosa* izolowane od chorych na mukowiscydozę.

- [1] Leewenhoeck A. An Abstract of a Letter from Mr. Anthony Leewenhoeck at Delft, Dated Sep. 17. 1683. Containing Some Microscopical Observations, about Animals in the Scurf of the Teeth, the Substance Call'd Worms in the Nose, the Cuticula Consisting of Scales. *Phil. Trans.* 1684, 14.
- [2] Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.J. How bacteria stick. *Sci. Am.* 1978, 238: 86-95.
- [3] Costerton, J.W., Cheng K. J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., Marrie T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 1987, 41: 435-464.
- [4] Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999, 284: 318-322.
- [5] Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 2000, 182: 26752-679.
- [6] Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15: 167-193.
- [7] Stewart P.S., Franklin M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008, 6: 199-210.
- [8] Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol.* 1995, 49: 711-745.
- [9] Archer N.K., Mazaitis M.J., Costerton J.W., Leid J.G., Powers M.E., Shirtliff M.E. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence.* 2011, 2: 445-59.
- [10] Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008, 322: 107-31.

- [11] Flemming H-Crt., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8: 623-633.
- [12] Zhurina M.V., Gannesena A.V., Zdrovenkob E.L., Plakunova V.K. Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms. *Microbiology.* 2014, 83: 713-722.
- [13] Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010, 35: 322-332.
- [14] Van Acker H. , Van Dijck P., Coenye T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends Microbiol.* 2014, 22: 326-33.
- [15] World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. WHO Document, Geneva, Switzerland, 2014. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/surveillancereport/en/>; data dostępu 24.04.2019
- [16] World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO Document, Geneva, Switzerland, 2017. <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>; data dostępu 24.04.2019
- [17] Yan J., Mao J., Xie J. Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications. *Bio Drugs.* 2014, 28: 265-274.
- [18] Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.O. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Med. Chem.* 2015, 7: 647-71.
- [19] Maciejewska M., Bauer M., Dawgul M. Nowoczesne metody zwalczania biofilmu bakteryjnego. *Post Mikrobiol.* 2016, 55: 3-11.
- [20] Ranita R., Monalisa T., Gianfranco D., Vishvanath T. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence.* 2018, 9: 522-554.



- [21] Daniell M.D., Hill J.S. A history of photodynamic therapy. *Aust. N. Z. J. Surg.* 1991, 61: 340-8.
- [22] Sobotta Ł., Skupin-Mrugalska P., Piskorz J., Mielcarek J. Non-porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. *Dyes Pigment.* 2019, 163: 337-355.
- [23] Wainwright M. Photoantimicrobials and PACT: what's in an abbreviation? *Photochem Photobiol Sci.* 2019, 18: 12-14.
- [24] Hamblin M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr.Opin. Microbiol.* 2016, 33: 67-73.
- [25] Mahmoudi H., Bahador A., Pourhajibagher M., Alikhani M.H. Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Bacterial Infections. *J. Lasers Med. Sci.* 2018, 9:154.
- [26] Tianhong D., Ying-Ying H., Hamblin R.M. Photodynamic therapy for localized infections- state of the Art. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 2009, 3-4.
- [27] Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowiz D., Piette J., Willson B.C., Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an Update. *CA Cancer J. Clin.* 2011, 61: 250-281.
- [28] Choromańska A., Kulbacka J., Saczko J. Terapia fotodynamiczna – założenia, mechanizm, aplikacje kliniczne. *Borgis - Nowa Medycyna.* 2013, 1: 26-30.
- [29] Mohanty N., Jalaluddin M.D., Kotina S., Routray S., Ingale Y. Photodynamic therapy: The Imminent Milieu For Treating Oral Lesions. *J. Clin. Diagn. Res.* 2013, 7: 1254-1257.
- [30] Tseng S.P., Teng L.J., Chen C.T., Lo T.H., Hung W.C., Chen H.J., Hsueh P.R.,

Tsai J.C., Toluidine blue O photodynamic inactivation on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers Surg. Med.* 2009, 41: 391-397.

[31] Kussovski V., Mantareva V., Angelov I., Orozova P., Schnurpfeil G., Borisova E., Avramov L., Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009, 294: 133-140.

[32] Sivieri-Araujo G., Queiroz I.O.A., Fabbro R.D., et al. Rat tissue reaction and cytokine production induced by antimicrobial photodynamic therapy. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2017, 18: 315-318.

[33] Jonathan F., Tracy W.B., Chen L.L., ZhengG. Activatable Photosensitizers for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* 2010, 110: 2839-2857.

[34] Liu Y., Qin R., Zaat S.A.J., Breukink E., Heger M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *J. Clinic. Transl. Res.* 2015, 1: 140-167.

[35] Cieplik F., Dongmei Deng D., Crielaard W., Buchalla W., Hellwig E., Al-Ahmad A., Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. *Crc. Rev. Microbiol.* 2018, 44: 571-589.

[36] Tyler G.D., Michael R., Hamblin R. An Introduction to Photoantimicrobials: Photodynamic Therapy as a Novel Method of Microbial Pathogen Eradication. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas(Ed.) *FORMATEX*. 2011, 675-683.

[37] Demidova T.N., Hamblin M.R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49: 2329-2335.

[38] Ormond A.B., Freeman H.S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*. 2013, 6: 817.

- [39] Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 2016, 4: 473-347.
- [40] Hoseinzadeh E., Makhdoumi P., Taha P., Hossini H., Stelling J., Amjad M., Ashraf G. A Review on Nano-Antimicrobials: Metal Nanoparticles, Methods, and Mechanisms. *Curr. Drug Metab.* 2017, 18: 120-129.
- [41] Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomed.* 2017, 12: 1227-1249.
- [42] Slavin Y.N., Asnis J., Häfeli U.O., Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnol.* 2017, 15:65.
- [43] Kumar Das R. Biological synthesis of metallic nanoparticles: plants, animals and microbial aspects. *Nanotechnol. Environ. Eng.* 2017, 2:18.
- [44] Singh J., Dutta T., Kim H., Rawat M., Samddar R. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int. J.Nanomed.* 2017, 12: 1227-1249.
- [45] Trafny E.A. Rola biofilmu w patogenezie zakażeń człowieka. *Post. Mikrobiol.* 2008, 47: 353-357.
- [46] Bjarnsholt T. The Role of Bacterial Biofilms in Chronic Infections. *APMIS.* 2013, 121: 1-51.
- [47] EUCAST (2016) MIC determination of non-fastidious and fastidious organisms. www.eucast.org
- [48] Moskowitz S.M., Foster J.M., Emerson J., Burns J.L. Clinically Feasible Biofilm Susceptibility Assay for Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42:1915-1922.



- [49] Jori G., Fabris C., Soncin M., Ferro S., Coppelotti O., Dei D., Fantetti L., Chiti G., Roncucci G., Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg. Med.* 2006, 38: 468-481.
- [50] Ryskova L., Buchta V., Slezak R. Photodynamic antimicrobial therapy. *Cent. Eur. J. Biol.* 2010, 5: 400-406.
- [51] Vatansever F., Melo W.C.M.A., Avci P., Vecchio D., Sadasivam M., Gupta A., Chandran R., Karimi M., Parizotto N.A., Yin R., Tegos G.P., Hamblin M.R. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond, *FEMS Microbiol. Rev.* 2013, 37: 955-989.
- [52] Sobotta L., Skupin – Mrugalska P., Mielcarek J., Goslinski T., Balzarini J. Photosensitizers mediated photodynamic inactivation against virus particles. *Mini Rev. Med. Chem.* 2015, 15: 503-21.
- [53] Trytek M., Makarska M., Polska K., Radzki S., Fiedurek J. Porfiryry i ftalocyjaniny. Cz. I Właściwości i niektóre zastosowania. *Biotechnologia.* 2005, 4: 109-127.
- [54] Ranyuk E., Cauchon N., Klarskov K., Gue B., Lier van J.E. Phthalocyanine – peptide conjugates: receptor-targeting bifunctional agents for imaging and photodynamic therapy, *J Med Chem.* 2013, 56: 1520-1534.
- [55] Kudrevich S.V., Lier van J.E. Azaanalogs of phthalocyanine: syntheses and Properties. *Coord. Chem. Rev.* 1996, 156: 163-182.
- [56] Mack J., Kobayashi N. Low symmetry phthalocyanines and their analogues. *Chem. Rev.* 2011, 111: 281-321.
- [57] Merchat M., Spikes J.D., Bertoloni G., Jori G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1996, 35:149-157.

- [58] Nyamu, S.N., Ombaka, L., Masika, E., Ng'ang'a, M. (2018) Antimicrobial Photodynamic Activity of Phthalocyanine Derivatives. *Adv. Chem.* Article ID 2598062.
- [59] Pucelik B., Paczyński R., Dubin G., Pereira M.M., Arnaut L.G., Dąbrowski J.M. Properties of halogenated and sulfonated porphyrins relevant for the selection of photosensitizers in anticancer and antimicrobial therapies. *PLOS ONE*. 2017, 10: 1/22-22/22.
- [60] Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003, 67: 593-656.
- [61] Liu Y., Qin R., Zaat S.A.J., Breukink E., Heger M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *J. Clinic. Transl. Res*. 2015, 1: 140-167.
- [62] Leekha S., Terrell C.L., Edson R.S. General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clin. Proc*. 2011, 86: 156–167.
- [63] Acar I., Moulin G. Antimicrobial resistance: a complex issue. *Rev Sci Tech*. 2012, 31: 23-31.
- [64] Giuliani F., Martinelli M., Cocchi A., Arbia D., Fantetti L., Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2010, 54: 637–642.
- [65] Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci*. 2004, 3: 436-450.



5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH (ARTYSTYCZNYCH).

5.1. OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA NAUK FARMACEUTYCZNYCH

Jestem absolwentką Oddziału Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Pracę magisterską pt. „Ocena mikrobiologiczna dwóch nowych kompozycji antyseptycznych” wykonałam w Katedrze i Zakładzie Bakteriologii Farmaceutycznej pod kierunkiem dr hab. Zygmunta Muszyńskiego. Praca ta była fragmentem prowadzonych w Katedrze badań dotyczących opracowywania nowych preparatów dezynfekcyjnych i antyseptycznych. Bezpośrednio po ukończeniu w 1988 roku studiów zostałam zatrudniona w Katedrze i Zakładzie Bakteriologii Farmaceutycznej, kierowanej przez prof. dr hab. Włodzimierza Kędzię.

W moich badaniach kontynuowałam tematykę związaną z **dezynfekcją i antyseptyką**. Prace badawcze dotyczyły oceny aktywności środków antyseptycznych, tak prowadzonej *in vitro*, jak i *in vivo* na ochotnikach (sztuczne zanieczyszczenie rąk) oraz w warunkach praktycznych w czasie ich stosowania przez personel oddziałów szpitalnych. Brałam udział w opracowaniu i ocenie nowych kompozycji dezynfekcyjnych i antyseptycznych.

Wyniki badań zostały zaprezentowane na zjazdach krajowych [II.K.17, III.B.99] oraz opublikowane w pracy oryginalnej [II.D.12].

Najważniejsze osiągnięcia jakie uzyskałam w tym obszarze są następujące:

- Opracowanie i ocena preparatu Septo - Clean skomponowanego na bazie czwartorzędowych soli amoniowych i alkoholu izopropylowego. Preparat ten wykazywał silne działanie bakteriobójcze i bakteriostatyczne wobec ziarniaków Gram-dodatnich i pałeczek Gram-ujemnych, w tym wobec *P. aeruginosa*. Ponadto, szybko i w krótkim czasie niszczył drobnoustroje flory przejściowej i stałej skóry rąk oraz na powierzchniach użytkowych, co wskazuje na możliwość zastosowania w antyseptyce oraz dezynfekcji powierzchni.
- Opracowanie i ocena preparatu Dishand (pierwotna nazwa Chirurgina) zawierającego jako substancje aktywne glukonian chlorheksydyny, bromek benzalkoniowy, izopropanol. Preparat wykazywał silne działanie bakteriobójcze wobec ziarniaków Gram-dodatnich i pałeczek Gram-ujemnych, w tym wobec *P. aeruginosa*.

Brałam również udział w badaniach dotyczących **skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej** wyrobów perfumeryjno-kosmetycznych. Badania te prowadzone

były na etapie opracowywania receptury produktu, jak i dotyczyły wyrobów gotowych. Oceniano preparaty z grupy nipagin, glukonian chlorheksydyny, bromek benzalkoniowy, Kathon CG, Euxyl K-400 i Sepicide Cl.

Najważniejsze osiągnięcia jakie uzyskałam w tym obszarze są następujące:

- Wykazałam skuteczność konserwacji za pomocą: preparatu Kathon CG - dla kremów typu W/O, preparatu Kathon w mieszaninie z Nipaginami - dla kremów typu O/W, preparatu Sepicide Cl - dla past do zębów pojedynczo lub w mieszaninie z Nipaginami.

Wykazałam przydatność do konserwacji emulsji w układzie O/W preparatów Euxyl K-400 i Kathon CG. Część z tych badań była prowadzona w ramach współpracy z przemysłem kosmetycznym i wyniki zostały opracowane w formie raportów z badań. Wyniki badań zostały również zaprezentowane na zjazdach krajowych [III.B.96, III.B.97] i opublikowane w pracy oryginalnej [II.D.10].

Swoje zainteresowania naukowe rozszerzyłam o aspekty związane z **profilaktyką i zwalczaniem zakażeń szpitalnych**. W ramach współpracy z klinikami Uczelni i poznańskimi szpitalami (np. Klinika Chirurgii Urazowej, Klinika Chirurgii Ogólnej Instytutu Chirurgii, Klinika Neonatologii, Klinika Chirurgii Ogólnej Instytutu Chirurgii) uczestniczyłam w badaniach dotyczących profilu zakażeń szpitalnych, oceny wrażliwości bakterii izolowanych z zakażeń na antybiotyki stosowane w leczeniu, skuteczności antybiotykoterapii, np. noworodków sztucznie wentylowanych, wpływu stosowania antybiotyków szeroko wachlarzowych na selekcję szczepów opornych, częstości wytwarzania klinicznie ważnych mechanizmów oporności przez drobnoustroje izolowane z zakażeń (np. wytwarzanie przez pałeczki Gram-ujemne betalaktamaz o szerokim spektrum substratowym), profilaktyki zakażeń szpitalnych.

Wyniki badań zostały zaprezentowane na konferencjach naukowych krajowych [II.K.14], oraz opublikowane [II.D.14].

Najważniejsze wyniki jakie uzyskano w tym obszarze są następujące:

- Wykazano, że leczone na Oddziale Neonatologicznej Intensywnej Terapii noworodki były skolonizowane szczepami o wielorakiej oporności na antybiotyki: MRSA, MRCNS, *Enterococcus* spp. o wysokiej oporności na aminoglikozydy (HLAR), *E. coli* ESBL+
- Udowodniono, że wysoki odsetek izolowanych od noworodków pałeczek *E. coli* wytwarzających betalaktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, wskazuje na epidemiczne występowanie tych szczepów na oddziale.
- Wykazano, że stosowanie u większości noworodków (90%) cefalosporyn III generacji sprzyja selekcji szczepów opornych.

- Wykazano, że stosowanie Fortum w profilaktyce i leczeniu zakażeń u noworodków, zarówno w monoterapii, jak i w połączeniu z amikacyną, powinno być monitorowane mikrobiologicznie w celu wczesnego wykrycia szczepów opornych.

Ważnym obszarem moich zainteresowań były **zakażenia ran oparzeniowych**. W tym celu prowadziłam badania oceniające profil zakażeń ran oparzeniowych oraz czystość mikrobiologiczną środowiska Oddziału Oparzeń. Izolację drobnoustrojów z ran prowadziłam metodą jakościową (wymazy) oraz opracowaną własną metodą ilościową (biopłaty). W ramach prowadzonych badań określiłam profil drobnoustrojów wywołujących zakażenia ran i szczepów środowiskowych oraz ich lekooporność. Przeprowadziłam typowanie biochemiczne, serologiczne i plocynowe wyizolowanych szczepów *P. aeruginosa*.

Wyniki badań przedstawiono na zjazdach krajowych [II.K.13, II.K.15, II.K.16, II.K.18, II.K.19], oraz opublikowano jako prace oryginalne [II.D.13, II.D.15, II.D.16]

Najważniejsze osiągnięcia jakie uzyskałam w omawianym obszarze są następujące:

- W profilu drobnoustrojów izolowanych zarówno z ran oparzeniowych, jak i ze środowiska odnotowano wzrost znaczenia ziarniaków Gram-dodatnich z rodzaju *Staphylococcus* z równoczesnym zmniejszeniem się roli pałeczek Gram-ujemnych z rodzajów *Acinetobacter* i *Pseudomonas*.
- Poważny problem epidemiologiczny i terapeutyczny stanowiły szczepy wielooporne, szczególnie MRSA i pałeczki wytwarzające nowy typ betalaktamaz.
- Szerzenie się zakażenia w ranach oraz rozwój sepsy są ściśle związane z liczbą drobnoustrojów w tkance rany. Jakościowe i ilościowe monitorowanie rany oparzeniowej jest czułym i niezbędnym przy podejmowaniu decyzji o chemioterapii i/lub przeszczepie wskaźnikiem stopnia rozwoju infekcji.
- Wykazałam istotną rolę personelu oddziału w rozprzestrzenianiu się zakażeń szpitalnych.
- Wśród szczepów izolowanych z ran oparzeniowych wykazałam wysokie odsetki szczepów wrażliwych na amikacynę (od 92-100% zależnie od szczepu), niższe na cefoperazon (78-100%), ceftazydim (72-94%) i gentamicynę (67-100%).
- W leczeniu zakażeń u chorych oparzonych stosowano nie tylko antybiotykoterapię ale również chirurgiczne opracowanie rany, leczenie miejscowe (maść Dermazin, maść Polseptol jodofory), immunizację szczepionką *Pseudovac*, w związku z tym nie była możliwa jednoznaczna ocena skuteczności działania antybiotyków.
- W typowaniu epidemiologicznym *P. aeruginosa* wykazałam dominację serotypu 06 oraz typu plocynowego A, tak wśród szczepów izolowanych z ran oparzeniowych, jak i ze środowiska.

Uczestniczyłam również w opracowaniu i ocenie **nowych technik stosowanych** do kontroli czystości mikrobiologicznej środowiska żywnościowego i nieżywnościowego. Wyniki badań przedstawiono na zjazdach krajowych [III.B.98] oraz opublikowane w pracy oryginalnej [II.D.11]

Najważniejsze osiągnięcia jakie uzyskałam w omawianym obszarze są następujące:

- Wykazałam, że wyniki uzyskane za pomocą zaproponowanego próbnika Dermomedium są porównywalne do tradycyjnej metody wymazów, a jest to metoda szybka, prosta i tańsza od metody tradycyjnie stosowanej.
- Wykazałam przydatność próbnika Dermomedium do kontroli zanieczyszczeń mikrobiologicznych powierzchni użytkowych i skóry.

Część wyników z tych badań było podstawą mojej pracy doktorskiej pt.: „Ocena bakteriologiczna środowiska Oddziału Oparzeń”, którą obroniłam na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w 1996 r, otrzymując w 1997 roku dyplom doktora nauk farmaceutycznych.

5.2.OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA NAUK FARMACEUTYCZNYCH

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam i rozwijałam tematykę badawczą dotyczącą **dezynfekcji, antyseptyki i sterylizacji**. Przedmiotem moich zainteresowań były preparaty na bazie związków utleniających, czwartorzędowe sole amoniowe oraz antyseptyki na bazie alkoholu etylowego i izopropylowego. Prowadziłam badania laboratoryjne oraz badania oceniające skuteczność prowadzonych zabiegów antyseptycznych i dezynfekcyjnych na oddziałach szpitalnych.

W ramach współpracy z doktorem Bogumiłem Bryckim z Wydziału Chemii UAM, prof. dr hab. Juliuszem Pernakiem z Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej oraz firmami przemysłowymi brałam udział w pracach badawczych, których celem była ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowo zsyntezowanych związków, głównie z grupy czwartorzędowych soli amoniowych oraz ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej substancji i preparatów dezynfekcyjnych, zgodnie z wymogami PZH, przed ich wprowadzeniem do obrotu.

W ramach współpracy z Prof. dr hab. Barbarą Marciniak z Katedry Chemii Farmaceutycznej UMP uczestniczyłam w badaniach dotyczących możliwości zastosowania promieniowania jonizującego do sterylizacji antybiotyków i innych substancji stosowanych w lecznictwie.

Wyniki prac zaprezentowane zostały na zjazdach krajowych [II.K.9, III.B.82, III.B.83, III.B.84, III.B.89, III.B.92, III.B.93, III.B.94] i międzynarodowych [III.B.19] oraz przedstawione w publikacji [II.D.6].

Najważniejsze osiągnięcia jakie uzyskałam w omawianym obszarze są następujące:

- Wykazałam wysoką aktywność i szeroki zakres przeciwdrobnoustrojowego działania soli magnezowej kwasu monoperoksyftalowego, brak narastania oporności drobnoustrojów na związek oraz tolerancję na obecność substancji organicznych
- Wykazałam dobre właściwości bójcze preparatu Ftaloxid oraz jego skuteczność w warunkach praktycznych.
- Oceniłam aktywność przeciwdrobnoustrojową kompozycji zawierających tenzydy amfoteryczne, chlorek didecyldimetyloamoniowy, kwas mlekowy, jodofory.
- Wykazałam, że działanie przeciwdrobnoustrojowe nowo zsyntezowanych soli benzimidazoliowych należących do pochodnych alkoksymetylowych, cykloalkoksymetylowych i alkilometylowych jest zależne od liczby atomów węgla w podstawniku alkilowym. Najbardziej aktywne były związki o łańcuchu zawierającym 10-12 atomów węgla.
- Wykazałam, że aktywność biologiczna nowych soli dialkilodimetyloamoniowych - pochodnych alkoksymetylowych, alkilodimetylowych, alicykloksymetylowych, aryloksymetylowych chloru dialkilodimetyloamoniowego zależy od ich struktury chemicznej. Stwierdzono, że najistotniejszy wpływ na aktywność bójczą wywiera łańcuch alifatyczny o 12 atomach węgla, przyłączony do czwartorzędowego atomu azotu. Optymalne działanie biologiczne wykazywały związki z łańcuchem dodecyłowym i krótkimi podstawnikami n-alkilowymi połączonymi z heteroatomem (X=O lub S). Związki zawierające tlen wykazywały wyższą aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich i grzybów, natomiast związki z atomem siarki wobec bakterii Gram-ujemnych.
- Wykazałam, że sterylizacja radiacyjna w dawce 25 kGy jest skuteczną i bezpieczną metodą sterylizacji takich substancji jak penicylina, gramicydyna i neomycyna bez negatywnego wpływu na ich aktywność przeciwdrobnoustrojową.

Kontynuowałam również badania związane z **profilaktyką i zwalczaniem zakażeń szpitalnych**. W tym obszarze oceniałam skuteczność wykonywanych zabiegów higieniczno-sanitarnych w oddziałach szpitalnych, ze szczególnym uwzględnieniem oddziałów intensywnej terapii. Badania były wykonywane we współpracy z zespołem

prof. dr hab. Laury Wołowickiej, kierownika Kliniki Intensywnej Terapii i Leczenia Bólu Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Poznaniu.

Wyniki prac zaprezentowane zostały na zjazdach krajowych [II.K.11, II.K.12, II.K.13, III.B.95], międzynarodowym [III.B.23] oraz opublikowane [II.D.7].

Najważniejsze osiągnięcia jakie uzyskałam w omawianym obszarze są następujące:

- Wykazałam, że pomimo stosowania na Oddziale właściwych środków dezynfekcyjnych, w niektórych obszarach po przeprowadzonych zabiegach higieniczno-sanitarnych, nie odnotowano zadowalającego obniżenia liczby drobnoustrojów. Wskazuje to na pominięcie tych obszarów w czasie mycia i dezynfekcji, a miejsca te mogą być źródłem/rezerwuarem szczepów chorobotwórczych.
- Wykazałam, że ciągły nadzór i kontrola nad przestrzeganiem planu higieny i prawidłowym wykonywaniem zabiegów sanitarnych są konieczne w celu uzyskania bezpiecznego dla pacjenta środowiska.

Ważnym obszarem mojej działalności naukowo-badawczej były drobnoustroje z rodzaju *Enterococcus* izolowane od chorych oraz ze środowiska. Przeprowadzałam analizę wrażliwości tych szczepów na antybiotyki oraz środki dezynfekcyjne. Oceniałam występowanie różnych czynników zjadliwości u tej grupy drobnoustrojów oraz mechanizmów oporności. Oceniałam także wpływ enterokoków i gronkowców na śmierć ludzkich komórek mezotelium. Oceniałam zdolność do wytwarzania biofilmu i adherencji do różnych biomateriałów szczepów *Enterococcus* spp.

Wyniki powyższych badań zaprezentowano w czasie zjazdów krajowych [II.K.3, II.K.8, II.K.10, III.B.28, III.B.30, III.B.44, III.B.57, III.B.72, III.B.81, III.B.86] i międzynarodowych [III.B.3, III.B.14, III.B.18, III.B.20, III.B.21, III.B.22] oraz zostały opublikowane w pracy oryginalnej [II.D.8].

Najważniejsze osiągnięcia jakie uzyskałam w omawianym obszarze są następujące:

- Określiłam profil i lekooporność ziarniaków z rodzaju *Enterococcus* izolowanych z zakażeń.
- Wykazałam występowanie w wysokich odsetkach szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* wysoce opornych na streptomycynę i gentamicynę. Wykazałam, że wysokiej oporności enterokoków na aminoglikozydy często towarzyszy oporność na leki z innych grup chemicznych.
- Nie stwierdziłam wśród badanych szczepów oporności na glikopeptydy.
- Wykazałam, że preparaty takie jak Aldevir (aldehyd glutarowy), Ftaloxid (sól magnezowa kwasu monoperoksyftalowego), Terralin (czwartorzędowe sole amoniowe) oraz alkohol etylowy i izopropylowy wykazują wymaganą aktywność wobec bakterii z rodzaju

Enterococcus. Natomiast wodne roztwory glukonianu chlorheksydyne nie wykazują wobec klinicznych szczepów enterokoków wymaganej dla preparatów dezynfekcyjnych aktywności bakteriobójczej, a ich stosowanie w placówkach opieki zdrowotnej do dezynfekcji skóry rąk nie zabezpiecza przed transmisją zakażeń enterokokowych.

- Wykazałam brak znaczących różnic w częstości występowania takich czynników zjadliwości jak: cytolizyny, żelatynaza, lipaza wśród szczepów enterokoków izolowanych z zakażeń i od zdrowych ochotników.
- Wykazałam zdolność do adherencji do różnych biomateriałów oraz wytwarzania biofilmu przez enterokoki.
- Wykazałam, że zarówno szczepy enterokoków izolowane z zakażeń, jak i pozyskane od zdrowych ochotników intensywnie tworzyły biofilm na powierzchni cewników wykonanych z różnych materiałów. Pomimo modyfikacji powierzchni cewników (np. zastosowanie silikonu) nie odnotowano znaczących różnic w adhezji enterokoków do różnych materiałów.

Głównym obszarem moich badań było omówione w Osiągnięciu **poszukiwanie nowych nie-antybiotykowych metod walki z drobnoustrojami**, w tym z drobnoustrojami opornymi na antybiotyki oraz nowych metod walki z **biofilmem** bakteryjnym. W prowadzonych badaniach określałam zdolność do wytwarzania biofilmu drobnoustrojów izolowanych z różnych zakażeń, zdolność adhezji drobnoustrojów do biomateriałów, wrażliwość na antybiotyki bakterii bytujących w formie biofilmu, występowanie biofilmu w zakażeniach przewlekłych.

Ten obszar zainteresowań obejmuje takie aspekty jak **terapia fotodynamiczna skierowana przeciw drobnoustrojom (PACT)** oraz przeciwdrobnoustrojowe działanie **nanocząstek (NPs)**. Badania dotyczące PACT prowadzone są w ramach współpracy z zespołami badawczymi prof. dr hab. Jadwigi Mielcarek z Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej UMP i prof. dra hab. Tomasza Goślińskiego z Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych UMP. Natomiast badania dotyczące nanocząstek prowadzę w ramach współpracy z dr hab. Renatą Dobrucką z Katedry Towaroznawstwa i Ekologii Produktów Przemysłowych Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. Część uzyskanych wyników została wyodrębniona i weszła w skład osiągnięcia naukowego przedstawionego w prezentowanym postępowaniu habilitacyjnym pt.: „Biofilm - wyzwanie dla nauk farmaceutycznych”.

Wyniki badań przedstawiono na licznych zjazdach międzynarodowych [II.K.1, III.B.4, III.B.5, III.B.6, III.B.9, III.B.10, III.B.11, III.B.12, III.B.13, III.B.17] i krajowych [II.K.4, II.K.5, II.K.7, III.B.24, III.B.25, III.B.27, III.B.43, III.B.53, III.B.60] oraz opublikowano jako prace oryginalne [II.A.1, II.A.8, II.A.9, II.A.10, II.A.13, II.A.114, II.A.16, II.A.18, II.A.4, II.A.6, II.A.11, II.A.12, II.A.17, II.D.1].

Najważniejsze wyniki jakie uzyskałam w omawianym powyżej obszarze, a których nie omówiłam w Osiągnięciu naukowym są następujące:

- Określono aktywność fotodynamiczną wobec *E. faecalis* fotouczulaczy z grupy chloryn, porfirazyn i ftalocyjanin. Wyselekcjonowano porfiryroidy o najkorzystniejszych właściwościach w fotodynamicznej inaktywacji *Enterococcus faecalis*. Wykazano, że badanie związku nie wykazują działania wobec *Escherichia coli*.
- Wykazałam wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową nanocząstek tlenku cynku, syntezowanych metodą biologiczną z użyciem wyciągu z kwiatu koniczyzny łąkowej (*Trifolium pratense* flower). Nanocząstki scharakteryzowano metodami instrumentalnymi i wykazano, że metoda biologiczna może być metodą alternatywną dla syntezy chemicznej.
- Wykazałam wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową nanocząstek srebra syntezowanych metodą biologiczną z użyciem wyciągu z kwiatu arniki (*Arnicae anthodium*), które scharakteryzowano metodami instrumentalnymi i wykazano, że metoda biologiczna może być metodą alternatywną dla syntezy chemicznej.
- Wykazałam wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową nanocząstek złota syntezowanych metodą biologiczną z użyciem wyciągu z owocu czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* fruit). Wykazano również działanie cytotoksyczne wobec komórek raka płuc. Zsyntezowane nanocząstki scharakteryzowano metodami instrumentalnymi. Wykazano, że metoda biologiczna może być metodą alternatywną dla syntezy chemicznej.
- Wykazałam wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową nanocząstek tlenku cynku syntezowanych metodą biologiczną z użyciem wyciągu z glistnika jaskółcze ziele (*Chelidonium majus*). Oceniono właściwości fizyko-chemiczne i działanie przeciwnowotworowe zsyntezowanych nanocząstek. Wykazano, że metoda biologiczna może być metodą alternatywną dla syntezy chemicznej.
- Wykazałam wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową nanocząstek bimetalicznych Cu@Pt typu rdzeń-powłoka, syntezowanych z wykorzystaniem ekstraktu z ziela rzepiku. W badaniach fizykochemicznych potwierdzono obecność bimetalicznych nanocząstek, w których powierzchnia sferycznego rdzenia Cu pokryta była warstwą nanocząstek Pt.

Właściwości fizyko-chemiczne nanocząstek wykazały, że metoda biologiczna może być metodą alternatywną dla syntezy chemicznej.

Obecnie wciąż prowadzę badania w tym obszarze skupiając się na analizie mechanizmów działania NPs oraz PACT na drobnoustroje planktoniczne i bytujące w biofilmie, zwłaszcza *P. aeruginosa* izolowane z płuc chorych na mukowiscydozę i *Enterococcus* spp. Poszukuję metod pozwalających na zwiększenie aktywności fotodynamicznej zsyntetyzowanych fotouczulaczy wobec biofilmów bakterii Gram-ujemnych, zwłaszcza *P. aeruginosa*.

Ponadto, brałam udział w badaniach dotyczących poszukiwania, innych niż wymienione powyżej, związków i substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, zarówno syntetycznych, jak i pochodzenia naturalnego. Prace te prowadzone były we współpracy z zespołami badawczymi prof. dr hab. Wiesławy Bylki z Katedry i Zakładu Farmakognozji UMP, dr hab. Barbary Thiem z Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin UMP, dra hab. Marka Bernarda i dr hab. Anny Katrusiak z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej UMP.

Wyniki tych badań zostały zaprezentowane na zjazdach międzynarodowych [III.B.7, III.B.8, III.B.15, III.B.16] i krajowych [III.B.41, III.B.42] oraz opublikowane w pracach oryginalnych [II.A.5, II.A.7, II.A.15, II.A.19, II.D.2, II.D.4]

Najważniejsze wyniki jakie uzyskałam w tym obszarze są następujące:

- Z ocenianych wyciągów z *Myosotis arvensis* L. (niezapominajka polna) najsilniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe wykazywał wyciąg etanolowy
- Wykazałam przeciwdrobnoustrojową aktywność wyciągów z różnych gatunków *Eryngium* L., (różne gatunki miłka) *Chaenomeles japonica* (pigwowiec japoński)
- Wykazałam przeciwdrobnoustrojowe działanie wyciągów z *Galinsoga parviflora* herb (ziele żółtlicy drobnokwiatowej) i *Aesculus hippocastanum* flowers (kwiat kasztanowca pospolitego)
- Wykazałam przeciwdrobnoustrojowe działanie olejków oraz wyciągów z liści i kwiatów *Succisa pratensis* Moench (czarcikęs łąkowy)

Duży obszar mojej działalności naukowej dotyczy **jakości preparatów farmaceutycznych**, tak wytwarzanych przemysłowo, jak i leków recepturowych oraz surowców stosowanych w przemyśle farmaceutycznym i suplementów diety. Prace te dotyczą zagadnień związanych z jakością (czystością i jałowością) mikrobiologiczną tych produktów

oraz metod stosowanych w badaniach ilościowych i jakościowych, w tym zagadnień związanych z walidacją metod.

Ważnym obszarem badawczym są badania oceniające jakość **środowiska produkcji leków** przemysłowych, leków recepturowych i aptecznych. Prace w tym zakresie prowadzę we współpracy z wytwórniami farmaceutycznymi oraz Wojewódzkim Inspektorem Farmaceutycznym w Poznaniu.

Wyniki badań dotyczące powyższego obszaru zostały zaprezentowane na zjazdach międzynarodowych [II.K.2, III.B.2], krajowych [II.K.6, III.B.26, III.B.40, III.B.45, III.B.46, III.B.50, III.B.54, III.B.59, III.B.63, III.B.66, III.B.67, III.B.69, III.B.70, III.B.71, III.B.73, III.B.73, III.B.74, III.B.75, III.B.76, III.B.77, III.B.79, III.B.80, III.B.81, III.B.85, III.B.87, III.B.88, III.B.90, III.B.91] oraz opublikowane jako prace oryginalne [II.A.2, II.A.3, II.A.20, II.D.3, II.D.5]

Najważniejsze osiągnięcia jakie uzyskałam w tym obszarze są następujące:

- Wykazałam, że posiew powierzchniowy jest wiarygodną techniką ilościowego badania czystości mikrobiologicznej produktów leczniczych i surowców farmaceutycznych.
- Wykazałam przydatność metody bezpośredniego posiewu do oceny jakości mikrobiologicznej leków doustnych.
- Wykazałam niski stopień zanieczyszczenia mikrobiologicznego przestrzeni pracy w ocenianych wytwórniach farmaceutycznych. Wykryte nieliczne uchybienia w jakości badanego środowiska wskazują na celowość prowadzenia monitoringu mikrobiologicznego w pomieszczeniach produkcji farmaceutycznej.
- Wykazałam, że wytwarzane przemysłowo leki doustne, w przeciwieństwie do leków recepturowych, w zdecydowanej większości spełniają wymagania Farmakopei Polskiej.
- Wykazano, że odnotowanie wśród ocenianych próbek leków niejałowych, przypadków przekroczenia dopuszczalnych limitów zanieczyszczeń, wskazuje na konieczność prowadzenia monitoringu mikrobiologicznego na każdym etapie ich produkcji.
- Wykazałam, że odnotowanie wśród przebadanych próbek - suplementów diety, o niewłaściwej jakości mikrobiologicznej, wskazuje na konieczność bieżącej kontroli i wprowadzenia uregulowań prawnych dotyczących tej grupy produktów.
- Odnotowałam, że w niektórych aptekach nie są zapewnione właściwe warunki do wytwarzania leków recepturowych i aptecznych, co może wpływać na jakość sporządzanych leków.

Poznań 29.09.2019 Jolanta Augustyniak