

## Streszczenie

Oporność bakterii na antybiotyki stanowi obecnie jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny, prowadząc do wzrostu zachorowalności i śmiertelności na całym świecie. Szczególnym problemem są bakterie Gram-ujemne, których błona zewnętrzna stanowi skuteczną barierę utrudniającą przenikanie antybiotyków. Wobec ograniczonej skuteczności klasycznych terapii coraz większe znaczenie zyskują alternatywne strategie terapeutyczne oparte na białkach i nanomateriałach przeciwdrobnoustrojowych, w tym na dendrymerach. Białka takie jak endolizyny fagowe rozkładają peptydoglikan ściany komórkowej bakterii, natomiast dendrymery mogą zwiększać przepuszczalność błony zewnętrznej, wspomagając działanie endolizyn wobec bakterii Gram-ujemnych. Celem pracy było określenie wpływu kationowych dendrymerów karbokrzemowych zawierających pierścienie imidazolowe (Dend), jony srebra (DendAg), a także pierścienie pirydylowe z jonami srebra (DendCh, DendAgCh) na wrażliwość bakterii *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 oraz ocena ich zdolności do wzmacniania działania domeny CHAP endolizyny z bakteriofaga  $\Phi$ 812. Szczep *P. aeruginosa* został wybrany ze względu na wysoki poziom oporności wynikający z mutacji, modyfikacji enzymatycznych oraz zdolności do tworzenia biofilmów.

W niniejszej pracy wykazano, że kationowe dendrymery ograniczają wzrost bakterii oraz indukują permeabilizację błony zewnętrznej, co ułatwia przenikanie endolizyny do warstwy peptydoglikanu i jego degradację. Stopień permeabilizacji zależał jednak od rodzaju zastosowanego dendrymeru. Dodatkowo, aktywność enzymatyczna endolizyny względem peptydoglikanu wzrastała w obecności dendrymerów. Analiza termodynamiczna interakcji między dendrymerami a endolizyną wykazała, że związki te łączą się poprzez wiązania elektrostatyczne w procesie egzotermicznym (DendAg, DendCh, DendAgCh) w niskich temperaturach oraz endotermicznym (Dend) w wyższych temperaturach. Oceniono również synergistyczne działanie dendrymerów i endolizyny wobec bakterii – trzy spośród czterech badanych dendrymerów wykazały efekt synergii, co uzasadniło wyłączenie Dend z dalszych badań. Morfologię i wielkość dendrymerów oraz ich kompleksów z endolizyną określono za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) i dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Ze względu na hydrofobowy charakter cząsteczek zaobserwowano ich tendencję do tworzenia agregatów o wielkości 350–800 nm. W dalszym etapie badań analizowano produkcję reaktywnych form tlenu (ang. ROS/ pol. RFT). Dendrymery zawierające jony srebra zwiększały ilość RFT. Za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oceniono żywotność bakterii w obecności dendrymerów i endolizyny –

we wszystkich przypadkach stwierdzono spadek liczby komórek żywych i wzrost liczby martwych. Obserwacje wykonane metodami fluorescencyjną, SEM i TEM potwierdziły obecność licznych uszkodzeń błony komórkowej w postaci porów oraz degradację ściany komórkowej, co świadczy o działaniu litycznym badanych układów. Oceniono również wpływ dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną na złożoną strukturę biofilmu bakteryjnego. W pierwszym etapie badano zdolność dendrymerów do hamowania tworzenia biofilmu w rosnących stężeniach, a następnie – w obecności endolizyny. Wykazano, że sama endolizyna wzmacnia działanie antybiofilmowe dendrymerów, natomiast stosowanie dendrymerów pojedynczo nie dawało tego efektu. Analiza mikroskopowa wykazała zmniejszenie liczby żywych komórek i wzrost liczby martwych bakterii w biofilmie, co wskazuje na uszkodzenie struktury biofilmu i działanie bójcze kompleksów dendrymer–endolizyna. Kolejnym etapem była ocena wpływu dendrymerów i endolizyny wobec biofilmu uformowanego na skórze wieprzowej, stanowiący model zakażenia skórnoego. Badania z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej i SEM wykazały, że najskuteczniejsze działanie przeciwbiofilmowe wykazywały dendrymery DendAg i DendAgCh, a w mniejszym stopniu DendCh. Obserwowano zwiększenie liczby martwych komórek, liczne uszkodzenia ściany bakteryjnej oraz zmiany w strukturze matrycy biofilmu. Przeprowadzono również analizę histomorfologiczną skóry niezainfekowanej oraz zainfekowanej *P. aeruginosa* po zastosowaniu dendrymerów i endolizyny. W przypadku skóry niezainfekowanej wykazano, że dendrymery w różnym stopniu wpływały na struktury naskórka, prowadząc do atrofii, hipertrofii lub hiperplazji oraz miejscowego przerwania ciągłości między warstwami. W skórze zakażonej naskórek był całkowicie zdegradowany przez bakterie, z częściową degradacją skóry właściwej, co uniemożliwiało ocenę potencjalnego efektu terapeutycznego. Ostatnim etapem badań była ocena cytotoksyczności dendrymerów oraz wpływu endolizyny na łagodzenie tego efektu w hodowli fibroblastów VH10. Wykazano, że cytotoksyczność wzrastała wraz ze stężeniem dendrymerów, natomiast obecność endolizyny nieznacznie redukowała ten efekt.

Podsumowując, kationowe dendrymery karbokrzemowe, w zależności od rodzaju modyfikacji, wzmacniają aktywność endolizyny oraz wykazują działanie przeciwbakteryjne wobec *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 poprzez mechanizmy obejmujące permeabilizację błony komórkowej, degradację peptydoglikanu i generację reaktywnych form tlenu. Związki te wpływają również na redukcję biofilmu w warunkach *in vitro* i *ex vivo*. Wykazują jednak pewną cytotoksyczność, której nasilenie zależy od stężenia i rodzaju modyfikacji powierzchniowej dendrymeru.