

UNIWERSYTET JANA KOCHANOWSKIEGO W KIELCACH

SZKOŁA DOKTORSKA
SEKCJA NAUKI ŚCISŁE I PRZYRODNICZE
DYSCYPLINA NAUKI BIOLOGICZNE

mgr Karolina Lach

**BADANIE WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWBAKTERYJNYCH
NANOCZĄSTEK DENDRYTYCZNYCH WZMACNIAJĄCYCH
DZIAŁANIE ENDOLIZYN FAGOWYCH PRZECIWKO BAKTERIOM
GRAM-UJEMNYM – OCENA AKTYWNOŚCI
PRZECIWBAKTERYJNEJ I DZIAŁANIA CYTOTOKSYCZNEGO W
BADANIACH *IN VITRO***

**Praca doktorska napisana pod kierunkiem
Promotora głównego dr hab. Karola Cieplucha, prof. Urad,
Uniwersytet Radomski im. Kazimierza Pułaskiego i
Promotora pomocniczego dr Małgorzaty Łysek-Gładysińskiej
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach**

KIELCE 2025

*

*Na samym początku pragnę wyrazić moją najgłębszą wdzięczność mojemu Promotorowi, **Panu Profesorowi dr hab. Karolowi Ciepluchowi**, a także Promotorowi pomocniczemu, **Pani Doktor Małgorzacie Łysek-Gładysińskiej**, za okazaną życzliwość, cierpliwość oraz wsparcie w procesie powstawania niniejszej rozprawy doktorskiej.*

Dziękuję za cenne wskazówki merytoryczne, inspirujące rozmowy, zaangażowanie i nauki, które pozwoliły mi nie tylko rozwijać warsztat badawczy, lecz także kształtować umiejętność krytycznego i odpowiedzialnego podejścia do nauki.

Jestem szczególnie wdzięczna za stworzenie atmosfery otwartości i zaufania, która dawała mi poczucie swobody w poszukiwaniu własnych ścieżek badawczych, a jednocześnie motywowała do ciągłego podnoszenia poprzeczki i doskonalenia efektów pracy. Bez Państwa wsparcia, życzliwego prowadzenia i wiary w moje możliwości niniejsza praca nie mogłaby powstać.

*

Składam również najszczerze podziękowania prof. Javierowi Sanchez-Nieves i Jego Zespołowi z Uniwersytetu Alcala w Alcala de Henares, za udostępnienie do badań dendrymerów, owocną współpracę i opiekę podczas stażu naukowego.

*

Pragnę również podziękować Koleżankom i Kolegom z Zakładu Mikrobiologii i Biologii Medycznej za codzienne wsparcie, cenne uwagi, a także przyjazną atmosferę, która sprzyjała zarówno pracy naukowej, jak i osobistemu rozwojowi. Wspólna praca i życzliwość, jaką od Was otrzymałam, miały ogromne znaczenie w trakcie realizacji badań i przygotowywania niniejszej rozprawy.

*

Szczególne słowa wdzięczności kieruję do mojego Narzeczonego, za nieustanne wsparcie, cierpliwość i wiarę we mnie w chwilach zwątpienia, a także za zrozumienie i motywację do dalszych starań.

Twoja obecność była dla mnie bezcennym źródłem siły.

*

Dziękuję również moim Rodzicom i Rodzinie, którzy od zawsze otaczali mnie miłością, troską i bezgranicznym wsparciem. To dzięki Wam mogłam rozwijać swoje pasje, dążyć do realizacji marzeń i ostatecznie podjąć się trudu stworzenia niniejszej pracy doktorskiej.

Karolina

Badania zrealizowano w ramach projektu:

SONATA-17, 2021/43/D/NZ6/00560 *Nanocząstki dendrytyczne jako czynnik wzmacniający właściwości przeciwbakteryjne endolizyn pochodzenia fagowego przeciwko bakteriom Gram-ujemnym. Ocena właściwości przeciwbakteryjnych*

Kierownik: dr hab. Karol Ciepluch

Część wyników zawartych w rozprawie została opublikowana w pracach:

1. Kinga Skrzyniarz, Samuel Takvor-Mena, **Karolina Lach**, Małgorzata Łysek-Gładysińska, Óscar Barrios-Gumiel, Jesús Cano, Karol Ciepluch, Molecular mechanism of action of imidazolium carbosilane dendrimers on the outer bacterial membrane – From membrane damage to permeability to antimicrobial endolysin, *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 665, **2024**, Pages 814-824, ISSN 0021-9797, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2024.03.130>
Punkty MNiSW: 100, IF=9,7, IF 5-letni: 8,9
2. **Karolina Lach**, Kinga Skrzyniarz, Samuel Takvor-Mena, Małgorzata Łysek-Gładysińska, Piotr Furmańczyk, Oscar Barrios-Gumiel, Javier Sanchez-Nieves, Karol Ciepluch, Endolysin CHAP domain-carbosilane metallodendrimer complexes with triple action on Gram-negative bacteria: Membrane destabilization, reactive oxygen species production and peptidoglycan degradation, *International Journal of Biological Macromolecules* 278 (**2024**) 134634, ISSN 0141-8130
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134634>
Punkty MNiSW: 100, IF=8,5, IF 5-letni:8,7

Spis treści

Wykaz skrótów i oznaczeń	8
Streszczenie	9
Summary.....	11
1. Wprowadzenie	13
1.1 Budowa błony i ściany bakterii Gram-ujemnych	15
1.1.1 Błona zewnętrzna (ang. <i>outer membrane</i> OM) bakterii Gram- ujemnych.....	15
1.1.2 Ściana komórkowa	17
1.2 Charakterystyka bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
1.3 Czynniki wirulencji bakterii	18
1.4 Charakterystyka biofilmu bakteryjnego	19
1.5 Charakterystyka tkanki skórnej i infekcji bakteryjnej	22
1.6 Alternatywy dla antybiotyków	25
1.7 Dendrymery kationowe	26
1.8 Endolizyna bakteriofagowa	28
1.9 Synergistyczne działanie dendrymerów i białek przeciwbakteryjnych.....	30
2. Cel pracy.....	32
3. Materiały i metody	33
3.1 Materiały.....	33
3.2 Metody.....	34
3.2.1 Gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i> OD ₆₀₀)	34
3.2.2 Degradacja peptydoglikanu – <i>Remazol Brilliant Blue R</i>	34
3.2.3 Permeabilizacja zewnętrznej błony bakteryjnej	35
3.2.4 Termodynamiczne parametry interakcji dendrymerów z endolizyną.....	35
3.2.5 Dynamiczne rozpraszanie światła (ang. <i>Dynamic Light Scattering</i> DLS).....	36
3.2.6 Morfologia dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM)	36
3.2.7 Produkcja reaktywnych form tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i> ROS).....	37
3.2.8 LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit	37
3.2.9 Znakowanie peptydoglikanu barwnikiem HADA.....	38
3.2.10 Morfologia bakterii – Transmisyjna mikroskopia elektronowa TEM.....	38
3.2.11 Morfologia bakterii – Skaningowa mikroskopia elektronowa SEM.....	39
3.2.12 Test hamowania biofilmu z użyciem fioletu krystalicznego	39

3.2.13	FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit – <i>in vitro</i>	40
3.2.14	Preparatyka skóry z ucha wieprzowego – badania <i>ex vivo</i>	40
3.2.15	FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit – <i>ex vivo</i>	41
3.2.16	Morfologia biofilmu bakteryjnego – SEM.....	41
3.2.17	Histomorfologia skóry wieprzowej niezainfekowanej i zainfekowanej <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 po traktowaniu dendrymerami i kompleksami z endolizyną.....	42
3.2.18	Test żywotności komórek eukariotycznych MTS	42
4.	Wyniki	43
4.1	Aktywność przeciwbakteryjna dendrymerów	43
4.1.1	Ocena wzrostu bakterii metodą pomiaru gęstości optycznej (OD ₆₀₀)	43
4.1.2	Oznaczenie zdolności dendrymerów do permeabilizacji błony zewnętrznej (test fluorescencyjny NPN)	44
4.1.3	Ocena zdolności endolizyny do degradacji peptydoglikanu w obecności dendrymerów – test <i>Remazol Brilliant Blue</i>	45
4.2	Interakcje pomiędzy dendrymerami a endolizyną.....	46
4.2.1	Określenie parametrów termodynamicznych kompleksowania dendrymerów z endolizyną.....	46
4.2.2	Analiza morfologii dendrymerów oraz ich kompleksów z endolizyną.....	48
4.2.3	Pomiar wielkości cząstek i stopnia agregacji dendrymerów oraz ich kompleksów z endolizyną (DLS)	49
4.3	Analiza właściwości przeciwbakteryjnych dendrymerów i endolizyny.....	50
4.3.1	Ocena efektu synergistycznego kompleksów dendrymer–endolizyna w hamowaniu wzrostu bakterii (OD ₆₀₀).....	50
4.3.2	Oznaczenie produkcji reaktywnych form tlenu (RFT/ROS) przez bakterie w obecności dendrymerów i endolizyny	51
4.3.3	Analiza żywotności komórek bakteryjnych po działaniu dendrymerów i endolizyny (LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit).....	52
4.3.4	Obserwacja degradacji peptydoglikanu w bakteriach po zastosowaniu dendrymerów i endolizyny (HADA).....	53
4.3.5	Ocena zmian morfologii komórek bakteryjnych po działaniu dendrymerów i endolizyny (SEM i TEM).....	54
4.4	Analiza wpływu dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną na tworzenie biofilmu bakteryjnego w badaniach <i>in vitro</i>	56
4.4.1	Oznaczenie ilości biofilmu za pomocą barwienia fioletem krystalicznym	56
4.4.2	Analiza żywotności komórek bakteryjnych w biofilmie (FilmTracer™ LIVE/DEAD™)	58

4.5	Wpływ dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną na biofilm bakteryjny w modelu <i>ex vivo</i>	60
4.5.1	Analiza żywotności komórek bakteryjnych w biofilmie (FilmTracer™ LIVE/DEAD™)	60
4.5.2	Obserwacja morfologii biofilmu i komórek bakteryjnych po działaniu dendrymerów i endolizyny - SEM	62
4.5.3	Ocena wpływu dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną na histomorfologię skóry niezakażonej i zakażonej <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	64
4.6	Ocena cytotoksyczności dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną wobec ludzkich fibroblastów	69
5.	Dyskusja	71
6.	Wnioski.....	78
7.	Bibliografia.....	79
8.	Spis rycin i tabel	88
9.	Dorobek naukowy	90
10.	Oświadczenie	95

Wykaz skrótów i oznaczeń

AgNPs	Nanocząstki srebra (ang. <i>silver nanoparticles</i>)
AMP	Białko przeciwdrobnoustrojowe (ang. <i>antimicrobial protein</i>)
AMR	Oporność bakterii (ang. <i>antimicrobial resistance</i>)
CDC	Amerykańskie Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorobom (ang. <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CHAP	Cysteino- i histydyno-zależna aminopeptydaza/hydrolaza
DCFH-DA	Diacetylo-dichlorofluoresceina
Dend	Dendrymer
DTR	Trudna do leczenia oporność (ang. <i>difficult-to-treat resistance</i>)
ECDC	Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>)
EPS	Pozakomórkowe substancje polimerowe – egzopolisacharyd
FBS	Płodowa surowica bydlęca (ang. <i>fetal bovine serum</i>)
HADA	propyl (2E)-2-cyano-3-(3,4-dihydroksy 5-nitrofenyl)
IDSA	Amerykańskie Towarzystwo Chorób Zakaźnych (ang. <i>Infectious Diseases Society of America</i>)
IM	Błona wewnętrzna (ang. <i>inner membrane</i>)
LPS	Lipopolisacharyd
MDR	Wielolekooporność (ang. <i>multidrug-resistance</i>)
MIC	Minimalne stężenie hamujące (ang. <i>minimal inhibitory concentration</i>)
NPN	N-fenyl-1-naftyloamina
OM	Błona zewnętrzna (ang. <i>outer membrane</i>)
PBS	Buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej (ang. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PDR	Szczepy odporne na wszystkie dostępne środki przeciwdrobnoustrojowe (ang. <i>pandrug-resistant</i>)
PEG	Polietylenoglikol
PG	Peptydoglikan
RFT/ROS	Reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
TSB	Bulion sojowy Tryptone (ang. <i>Tryptone Soya Broth</i>)
UTI	Zakażenie układu moczowego (ang. <i>urinary tract infection</i>)
XDR	Rozległa oporność na leki (ang. <i>extensively drug-resistance</i>)

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 Φ 812. Szcep *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 skórno. 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.

Summary

Bacterial resistance to antibiotics is currently one of the most serious challenges in modern medicine, leading to increased morbidity and mortality worldwide. Gram-negative bacteria are a particular concern, as their outer membrane constitutes an effective barrier that limits antibiotic penetration. Due to the limited efficacy of conventional therapies, alternative therapeutic strategies based on antimicrobial proteins and nanomaterials, including dendrimers, are gaining increasing importance. Proteins such as phage-derived endolysins degrade the peptidoglycan layer of the bacterial cell wall, whereas dendrimers can increase outer-membrane permeability, thereby supporting the activity of endolysins against Gram-negative bacteria. The aim of this study was to determine the effect of cationic carbosilane dendrimers containing imidazole rings (Dend), silver ions (DendAg), as well as pyridyl rings with silver ions (DendCh, DendAgCh) on the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, and to evaluate their ability to enhance the activity of the CHAP domain of an endolysin derived from bacteriophage Φ 812. The *P. aeruginosa* strain was selected due to its high level of resistance resulting from mutations, enzymatic modifications, and its ability to form biofilms.

In this work, it was demonstrated that cationic dendrimers inhibit bacterial growth and induce outer membrane permeabilization, which facilitates endolysin penetration to the peptidoglycan layer and its degradation. However, the degree of permeabilization depended on the dendrimer type. In addition, the enzymatic activity of the endolysin toward peptidoglycan increased in the presence of dendrimers. Thermodynamic analysis of the interactions between dendrimers and the endolysin showed that these compounds associate via electrostatic interactions in an exothermic process (DendAg, DendCh, DendAgCh) at low temperatures and an endothermic process (Dend) at higher temperatures. The synergistic activity of dendrimers and the endolysin against bacteria was also evaluated – three of the four dendrimers exhibited synergistic effects, which justified excluding Dend from further studies. The morphology and size of dendrimers and their complexes with the endolysin were determined using transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS). Due to the hydrophobic nature of the molecules, a tendency to form aggregates with sizes of 350–800 nm was observed. In the next stage, the production of reactive oxygen species (ROS) was analyzed. Dendrimers containing silver ions increased ROS levels. Bacterial viability in the presence of dendrimers and the endolysin was assessed by fluorescence microscopy – in all cases, a decrease in the number of live cells and an increase

in dead cells were observed. Observations by fluorescence microscopy, SEM, and TEM confirmed numerous membrane disruptions in the form of pores as well as cell wall degradation, indicating the lytic activity of the studied systems. The effects of dendrimers and their complexes with the endolysin on the complex structure of bacterial biofilms were also assessed. First, the ability of dendrimers to inhibit biofilm formation at increasing concentrations was examined, and subsequently the same experiments were performed in the presence of the endolysin. It was shown that endolysin alone enhanced the antibiofilm activity of dendrimers, whereas dendrimers used individually did not produce this effect. Microscopic analysis revealed a decrease in the number of live cells and an increase in dead bacteria within the biofilm, indicating disruption of biofilm structure and bactericidal activity of the dendrimer–endolysin complexes. The next stage involved evaluating the effects of dendrimers and the endolysin on biofilms formed on porcine skin, used as an *ex vivo* model of skin infection. Fluorescence microscopy and SEM analyses showed that the most pronounced antibiofilm activity was observed for DendAg and DendAgCh, and to a lesser extent for DendCh. An increased number of dead cells, numerous bacterial cell wall disruptions, and changes in the biofilm matrix structure were observed. Histomorphological analysis of non-infected and *P. aeruginosa*-infected skin after application of dendrimers and the endolysin was also performed. In non-infected skin, dendrimers affected epidermal structures to varying degrees, leading to atrophy, hypertrophy, or hyperplasia and local disruption of continuity between layers. In infected skin, the epidermis was completely degraded by bacteria, with partial degradation of the dermis, which prevented assessment of a potential therapeutic effect. Finally, the cytotoxicity of dendrimers and the effect of endolysin on mitigating this toxicity were evaluated in VH10 fibroblast cultures. Cytotoxicity increased with dendrimer concentration, whereas the presence of endolysin slightly reduced this effect.

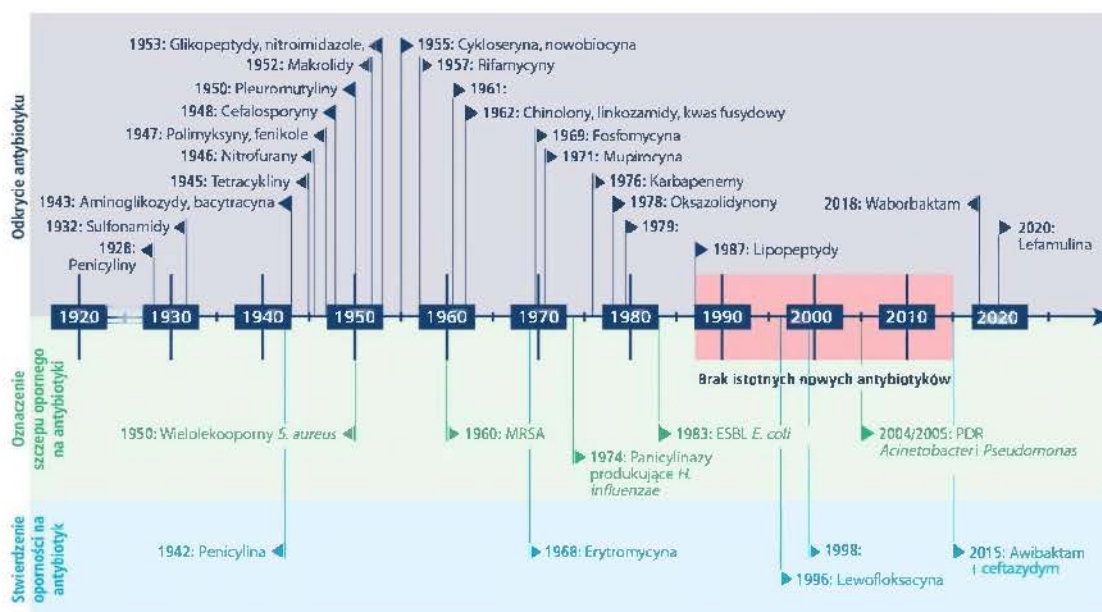
In summary, cationic carbosilane dendrimers, depending on the type of modification, enhance endolysin activity and exhibit antibacterial effects against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 through mechanisms involving membrane permeabilization, peptidoglycan degradation, and the generation of reactive oxygen species. These compounds also contribute to biofilm reduction under *in vitro* and *ex vivo* conditions. However, they display a certain degree of cytotoxicity, the extent of which depends on concentration and the type of dendrimer surface modification.

1. Wprowadzenie

W 2028 roku będzie obchodzona 100. rocznica odkrycia pierwszego antybiotyku, penicyliny, przez Alexandra Fleminga, która pozytywnie zmieniła perspektywy walki z bakteriami. Nie przewidywano jednak, że w ciągu tych 100 lat bakterie rozwiną tak daleko posuniętą oporność na antybiotyki, wiele z nich stanie się nieskutecznych, a zwalczanie patogenów niemal niemożliwe [1–5]. Skutkiem niekontrolowanego stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt i rolnictwie, nadmierne przepisywanie i nieodpowiedzialne stosowanie czy przedwczesne kończenie przyjmowania leków antybakteryjnych, było pojawienie się bakterii wielolekoopornych (ang. *multi-drug resistance* MDR) [6]. Według doniesień, zakażenia związane z bakteriami antybiotykoopornymi (ang. *antimicrobial resistance* AMR) oszacowano na 4,95 miliona w 2019 roku, a przybliżona liczba zgonów wynosi 1,27 miliona. Niepokojące jest to, że liczba zgonów spowodowanych przez AMR może znacząco wzrosnąć do 10 milionów rocznie do 2050 roku [7]. Niektóre gatunki bakterii, ze względu na swoją wyjątkową oporność na antybiotyki zostały zakwalifikowane jako szczególnie niebezpieczne, w związku z czym utworzono tzw. grupę ESKAPE (od *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterobacter* spp.) [8]. Nazwa ta podkreśla ich zdolność do „ucieczki” (ang. *escape*) przed działaniem dostępnych terapii przeciwdrobnoustrojowych. Grupa ESKAPE stanowi obecnie jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny, które stoi przed poważnym wyzwaniem związanym z opornością bakterii, powodujące każdego roku śmierć milionów ludzi [9–15]. Problem ten pogłębia spadek produkcji nowych i skutecznych antybiotyków, co ogranicza możliwość efektywnego leczenia infekcji (Rycina 1).

Szczególną uwagę należy zwrócić na bakterie Gram-ujemne w kontekście zachorowalności i śmiertelności wśród ludzi, ze względu na łączenie w sobie szeregu cech znacznie utrudniających skuteczne leczenie zakażeń. W odróżnieniu od bakterii Gram-dodatnich, których gruba warstwa peptydoglikanu jest łatwo dostępna dla wielu antybiotyków, bakterie Gram-ujemne posiadają dodatkową zewnętrzną błonę z wyróżniającym się lipopolisacharydem (LPS) [16,17]. Struktura ta stanowi wyjątkowo skuteczną barierę dla leków, ograniczając ich przenikanie i sprzyjając rozwojowi wielolekooporności. Dodatkowo endotoksyna LPS wywołuje silną odpowiedź zapalną, zwiększając ryzyko wstrząsu septycznego, którego powikłania znacznie rzadziej obserwuje się w zakażeniach bakteriami Gram-dodatnimi. Ponadto bakterie Gram-ujemne cechują się wysoką zdolnością do nabywania

i przekazywania genów oporności, co odbywa się szybciej i skuteczniej niż u bakterii Gram-dodatnich [18].



Rycina 1 Oś czasu odkrycia antybiotyków i rozwój oporności bakterii [19].

Bakterie Gram-ujemne charakteryzują się także wysoką zdolnością do tworzenia biofilmu, który stanowi dodatkową warstwę ochronną przed antybiotykami i układem odpornościowym [20]. Choć bakterie Gram-dodatnie również mogą tworzyć biofilm, struktury te w przypadku patogenów Gram-ujemnych są zwykle bardziej odporne i trudniejsze do pokonania [21]. Wszystkie te właściwości sprawiają, że bakterie Gram-ujemne stanowią jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny, przewyższając pod tym względem większość patogenów Gram-dodatnich i wymagając intensywnych poszukiwań nowych strategii terapeutycznych.

Wśród bakterii Gram-ujemnych należących do grupy ESKAPE, *Pseudomonas aeruginosa* stanowi jeden z najbardziej niepokojących i wymagających patogenów. Jego wyjątkowa zdolność adaptacji, szybkie nabywanie oporności na antybiotyki oraz agresywny przebieg zakażeń sprawiają, że stanowi poważne zagrożenie. Jego lekooporność wynika z wielopoziomowych mechanizmów obronnych – od nieprzepuszczalnej zewnętrznej błony, poprzez wydajne pompy wypływowe, po zdolność tworzenia wysoce odpornego biofilmu [22]. W efekcie *P. aeruginosa* często prezentuje fenotypy MDR, XDR, a nawet PDR, co znacząco ogranicza skuteczność dostępnych terapii [23,24]. Z tych powodów patogen ten uznawany jest za priorytetowy cel badań nad nowymi antybiotykami i alternatywnymi metodami leczenia, które mogłyby skutecznie przełamać jego wysoki poziom oporności.

1.1 Budowa błony i ściany bakterii Gram-ujemnych

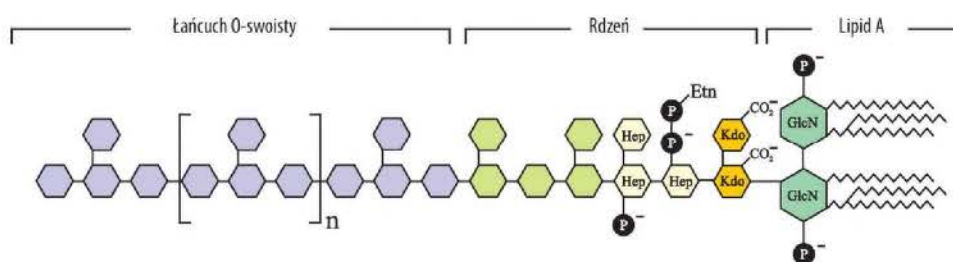
Ściany komórkowe bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wykazują istotne różnice zarówno w budowie, jak i składzie chemicznym. U bakterii Gram-dodatnich grubość ściany komórkowej wynosi przeciętnie około 20 nm, a u niektórych gatunków może dochodzić nawet do 50 nm. Struktura ta jest jednorodna i zdominowana przez peptydoglikan, który stanowi od 50 do 90 % jej masy i może tworzyć do około 40 warstw [25]. Oprócz mureiny ściana zawiera również kwasy tejchojowe, zbudowane z polirybitolofosforanu połączone kowalencyjnie z peptydoglikanem, oraz kwasy lipotejchojowe, oparte na glicerolofosforanie zakotwiczone w glikolipidach błony cytoplazmatycznej. W jej skład wchodzi także różnorodne polisacharydy, takie jak mannoza, ramnoza, glukoza czy arabinoza oraz białka powierzchniowe [26]. Zarówno kwasy tejchojowe i lipotejchojowe, jak i liczne białka adhezyjne, odgrywają kluczową rolę w przyczepianiu się bakterii do różnych powierzchni, zarówno biologicznych, jak i abiotycznych. W przeciwieństwie do Gram-dodatnich, bakterie Gram-ujemne posiadają znacznie cieńszą ścianę komórkową, liczącą około 10–15 nm. Jest ona złożona z dwóch głównych warstw zlokalizowanych na zewnątrz od błony cytoplazmatycznej. Pierwszą stanowi cienka warstwa peptydoglikanu – zwykle pojedyncza warstwa mureiny, umieszczona w przestrzeni periplazmatycznej i stanowiąca jedynie 5–10% masy ściany. Drugą, bardziej zewnętrzną, tworzy dwuwarstwa lipidowa, której zewnętrzna część zbudowana jest z lipopolisacharydu (LPS), zastępującego typowe fosfolipidy [27].

1.1.1 Błona zewnętrzna (ang. *outer membrane* OM) bakterii Gram- ujemnych

Błona zewnętrzna, pokrywająca peptydoglikan, cechuje się asymetrycznym układem dwuwarstwy lipidowej o zupełnie innej budowie niż błona komórek eukariotycznych oraz negatywnym ładunkiem. Zbudowana jest z wewnętrznej warstwy tworzonej przez fosfolipidy, takie jak fosfatydyloglicerole (PG), kardiolinę (CL) oraz fosfatydyloetanolaminę (PE), występujące w różnych proporcjach w zależności od szczepu bakterii, specyficzne białka – lipoproteiny i β -baryłkowe, tworzące kanały dyfuzyjne oraz lipopolisacharyd (LPS) stanowiącego zewnętrzną część. Błona zewnętrzna, dzięki obecności lipoproteiny Brauna, niewielkiemu białku, połączonemu kowalencyjnie z peptydem w peptydoglikanie i częścią lipidową z warstwą fosfolipidową, tworzy zwartą strukturę [28,29].

Opisując błonę zewnętrzną, należy zwrócić szczególną uwagę na wspomniany lipopolisacharyd (Rycina 2). Jest to charakterystyczny, o złożonej budowie glikolipid, występujący tylko wśród bakterii Gram-ujemnych. Składa się on z:

- lipidu A, cechującego się hydrofobowością i najgłębszym położeniem, zbudowany z cząsteczek N- i O-acylowanego bifosforanu diglukozaminy (Glc) połączonych wiązaniem $\beta(1\rightarrow6)$ glikozydowym wraz z zmienną ilością (od 4 do 7) łańcuchów acylowych i kwasów tłuszczowych, warunkujący toksyczność LPS,
- krótkim, 8 – 12 cukrowym hydrofilowym rdzeniem oligosacharydowym, w rejonie wewnętrznym, połączonym kowalencyjnie z lipidem A za pomocą karboksylowanego kwasu D-manno-okto-2-ulozonowego (KDO), z dodatkową obecnością dwóch reszt L-glicero-D-manno-heptozy, natomiast region zewnętrzny zbudowany z heksoz, na przykład glukozy, galaktozy, glukozaminy,
- polisacharydu *O*-swoistego, zwany również antygenem *O*, znajdujący się w zewnętrznie położonej części, unikatowy dla danych szczepów i określający swoistość serologiczną, zbudowany z kilkunastu do kilkudziesięciu podjednostek oligosacharydowych, na które składa się 1 – 8 reszt węglowodanowych, z możliwym występowaniem, poza cukrami obojętnymi takimi jak heksozy czy heksozaminy, kwasów uronowych i deoksyheksoz, czy innych składników nie cukrowych, na przykład aminokwasy, fosforan, glicerol [30,31].



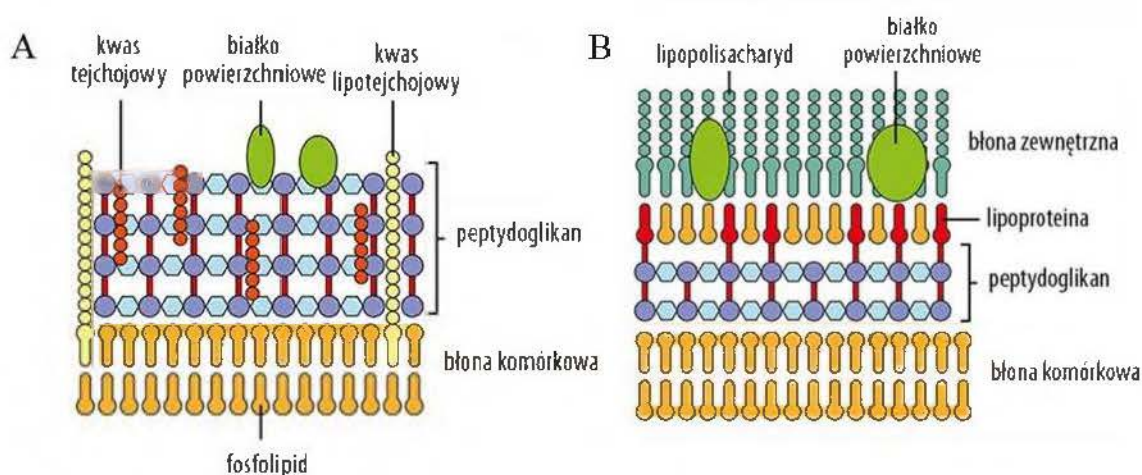
Rycina 2 Schemat budowy LPS [30].

Budowa LPS w zależności od szczepów bakteryjnych różni się. LPS ze względu na wysoką sztywność i stabilizację przez wiązania krzyżowe między kationami dwuwartościowymi a grupami fosforanowymi, stanowi nieprzepuszczalną barierę dla toksyn, detergentów, lizozymu czy antybiotyków. Dodatkowo, podczas lizy bakterii, LPS staje się endotoksyną,

która w większej ilości powodując wszelkiego rodzaju objawy chorobowe, często ze śmiertelnym skutkiem. Obecna jest także błona wewnętrzna/komórkowa (ang. *inner membrane* IM) odpowiadająca za transport produktów biosyntezy [32,33].

1.1.2 Ściana komórkowa

W skład ściany komórkowej wszystkich znanych bakterii wchodzi peptydoglikan, nazywany również mureiną. Jest on podstawowym składnikiem ściany, który nadaje jej sztywność i determinuje kształt komórek bakteryjnych. Jako heteropolimer, składa się z łańcuchów cukrowych utworzonych z dwóch dwucukrów: *N*-acetylo-glukoزامiny (GlcNAc) oraz kwasu *N*-acetylmuraminowego (MurNAc), które połączone są wiązaniem β -1,4-glikozydowym, oraz peptydów, przyłączonych do reszt kwasu muraminowego, które zawierają od trzech do pięciu aminokwasów (Rycina 3) [34,35].



Rycina 3 Porównanie budowy ściany komórkowej bakterii (A) Gram-dodatnich i (B) Gram-ujemnych [36].

1.2 Charakterystyka bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

Pałeczka ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* jest jednym z najczęstszych i „krytycznych” patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne [37,38]. Jest to szeroko rozpowszechniona w środowisku wodnym i glebowym, oportunistyczna, otoczona błoną zewnętrzną, wysoce adaptacyjna bakteria Gram-ujemna, zdolna do wzrostu zarówno w warunkach tlenowych, jak i ograniczonej dostępności tlenu (fakultatywnie beztlenowa). Jej niezwykła elastyczność metaboliczna pozwala przetrwać w różnych warunkach [39,40]. *P. aeruginosa* jest szczególnie niebezpieczna dla pacjentów z obniżoną odpornością, u których może prowadzić do przewlekłych i szpitalnych zakażeń, trudnych do leczenia zakażeń dróg

moczowych (ang. *urinary tract infections* UTI) i ran, oraz jest związana z zapaleniem płuc, zakażeniami krwi i miejsc operowanych [41,42]. Grupa badawcza Eid'a (2025) zwraca uwagę, że bakterie *Pseudomonas aeruginosa* można podzielić na różne fenotypy w zależności od profilu oporności na leki, zgodnie z kryteriami opracowanymi przez Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. *European Centre for Disease Prevention and Control* ECDC) oraz Amerykańskie Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorobom (ang. *Centers for Disease Control and Prevention* CDC):

- wielolekowa oporność na antybiotyki (ang. *multidrug-resistant* MDR),
- rozległa oporność na leki (ang. *extensively drug-resistance* XDR),
- szczepy odporne na wszystkie dostępne środki przeciwdrobnoustrojowe (ang. *pandrug-resistant* PDR) [43],

a Amerykańskie Towarzystwo Chorób Zakaźnych (ang. *Infectious Diseases Society of America* IDSA) zaproponowało termin:

- trudna do leczenia oporność (ang. *difficult-to-treat resistance* DTR)

w celu opisanie szczepów *Pseudomonas aeruginosa* charakteryzujących się niezwykle złożonym i zaawansowanym profilem oporności, nie reagujących na większość lub wszystkie standardowe antybiotyki [44], sklasyfikowane według ich budowy [23]:

- karbapenemy
 - imipenem-cylastatyna
 - meropenem
 - doripenem
- cefalosporynę
 - ceftazydym
 - cefepim
- fluorochinolony
 - cyprofloksacyna
- lewofloksacyna
- aminoglikozydy
 - amikacyna
 - gentamycyna
 - tobramycyna
- ureido odporne na penicylinę
 - piperacylina
 - piperacylina-tazobaktam.

1.3 Czynniki wirulencji bakterii

Aby umożliwić rozwój zakażenia w organizmie gospodarza oraz skuteczne namnażanie się, bakterie wykorzystują różnorodne struktury, substancje i mechanizmy określane wspólnie mianem czynników wirulencji. Do najważniejszych czynników wirulencji należy zaliczyć:

- zdolność do przemieszczania się bakterii, dzięki obecności odpowiednich struktur, takich jak rzęski,
- zdolność do wytwarzania form przetrwalnikowych, na przykład endospor w wyniku sporulacji,
- obecność adhezyn rozpoznających receptory gospodarza i kolonizację danego miejsca, oraz czynników uszkadzających komórki i tkanki,
- zdolność do produkcji toksyn,
- zdolność do wytwarzania otoczek, w tym złożonego biofilmu [45].

Oprócz wspomnianych powyżej czynników wirulencji bakterii, należy także zwrócić szczególną uwagę na możliwe sposoby reagowania bakterii na podawane leki, takie jak antybiotyki. Wskutek niewłaściwych stosowaniach związków antybakteryjnych, bakterie wykształciły różnego rodzaju szlaki oporności, do których zalicza się:

- zmiany celu działania antybiotyku, czyli struktur komórkowych/białek, na które ma działać antybiotyk,
- zahamowanie transportu antybiotyku wskutek, na przykład zmiany budowy błony zewnętrznej,
- inaktywacja antybiotyku poprzez niszczenie lub zmianę jego struktury,
- aktywne usuwanie antybiotyku z komórki dzięki obecności pomp wypływowych (ang. *efflux pump*),
- zdolność do mutacji, rekombinacji czy horyzontalnego transferu genów, zawierających fragmentów z genami oporności [42,46–48].

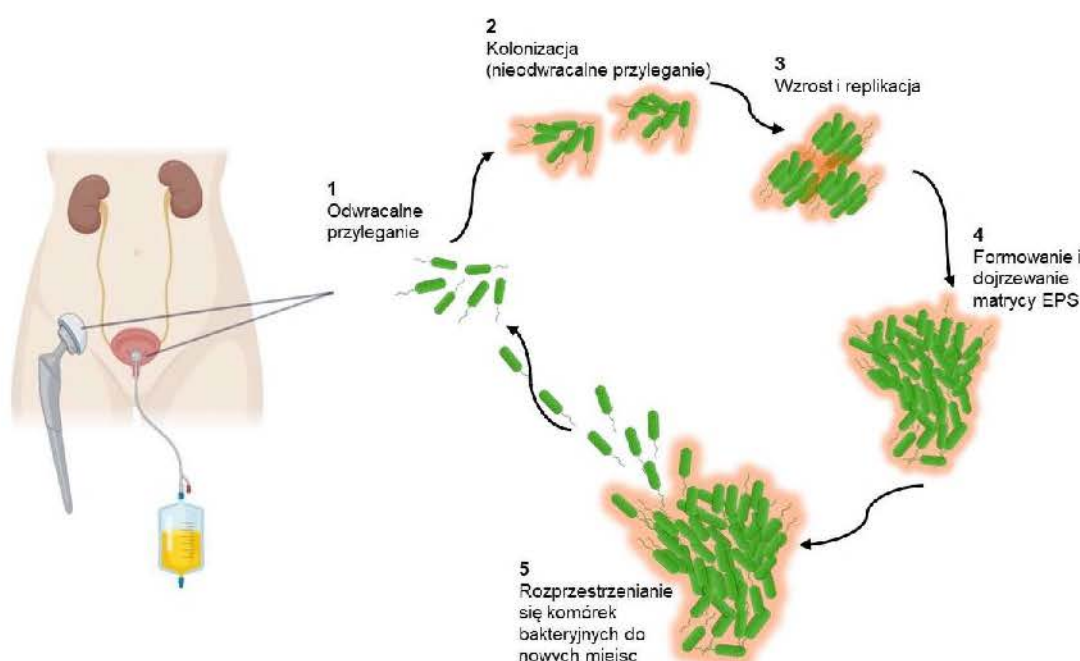
1.4 Charakterystyka biofilmu bakteryjnego

Tworzenie biofilmu znacząco zwiększa zdolność bakterii do przetrwania zarówno w niesprzyjających warunkach środowiskowych, jak i podczas infekcji, skutecznie ograniczając penetrację oraz działanie leków przeciwbakteryjnych. Z tego względu biofilm stanowi jeden z kluczowych celów współczesnych badań i strategii terapeutycznych, a zarówno zapobieganie jego powstawaniu, jak i skuteczne leczenie już uformowanych struktur biofilmowych, jest niezwykle istotne dla zwalczania zakażeń bakteryjnych [22].

Biofilm bakteryjny to wysoce zorganizowana trójwymiarowa społeczność mikroorganizmów osadzonych w pozakomórkowych substancjach polimerowych (ang. *extracellular polymeric substances* EPS), składających się głównie

z egzopolisacharydów, w przypadku *P. aeruginosa* – alginian, białka i kwasy nukleinowe [49,50]. Polisacharydy zewnątrzkomórkowe wykazują silne właściwości kompleksowania jonów metali dwuwartościowych, takich jak wapń, magnez czy cynk, co zwiększa adhezję mikroorganizmów do powierzchni, nadając biofilmowi większą spójność strukturalną. Białka obecne w macierzy pełnią zarówno funkcje strukturalne, jak i biologiczne – uczestniczą w utrzymaniu integralności biofilmu, inicjowaniu reakcji zapalnych oraz mogą działać jako enzymy hydrolityczne, ułatwiające uwalnianie komórek bakteryjnych i formowanie nowych struktur biofilmowych [51]. Lipidy stanowią jedynie niewielki procent całkowitej masy biofilmu, ich zdolność do tworzenia kompleksów z białkami w postaci lipoprotein jest istotna dla zachowania stabilności błon komórkowych, rozpoczęcia procesu infekcji i dalszego rozwoju biofilmu. Ponadto lipidy nadają macierzy pozakomórkowej charakter hydrofobowy, co zwiększa odporność biofilmu na działanie czynników środowiskowych [52]. Ważnym składnikiem biofilmu jest również pozakomórkowe DNA (eDNA), pochodzące z kontrolowanej autolizy części komórek, pełni funkcję strukturalną, stabilizującą i wspierającą proces adhezji bakterii w obrębie biofilmu [53]. Komórki wchodzące w skład biofilmu różnią się fizjologicznie i morfologicznie od wolno żyjących komórek tego samego gatunku. Bakterie ściśle przylegają do siebie nawzajem i/lub do niebiologicznych powierzchni stałych, takich jak cewniki lub endoprotezy, lub biologicznych, takich jak rany, oparzenia, wrzody, czy w mukowiscydozie [44,47]. Bakterie posiadają wiele cech, które pomagają im przylegać do powierzchni, takich jak hydrofobowość ściany komórkowej, potencjał powierzchniowy, rozmiar i kształt, obecność quorum sensing, pilusów/fimbrii oraz zdolność do wytwarzania adhezyn pozakomórkowych. Należy jednak zauważyć, że przyczepność bakterii do powierzchni wykazuje różny poziom w zależności od kilku czynników powierzchniowych, takich jak hydrofobowość, heterogeniczność, chropowatość, sztywność oraz potencjał ładunek powierzchniowy. Ponadto warunki środowiskowe mają kluczowe znaczenie dla przyczepności bakterii, np. pH, temperatura i siła jonowa [54–56]. Bakterie wolno żyjące/planktoniczne, po zetknięciu się z powierzchnią wyrobu medycznego lub uszkodzonej tkanki, pod wpływem sił Van der Waalsa i wyżej wymienionych przystosowań, zaczynają wytwarzać polimery pozakomórkowe, które organizują się w matrycę przestrzenną, umożliwiającą silną adhezję i rozwój biofilmu [57,58]. Proces tworzenia biofilmu składa się z kilku etapów (Rycina 4):

- 1) Pierwszym etapem jest przyleganie poszczególnych komórek bakteryjnych do powierzchni, które może odbywać się za pośrednictwem różnych struktur powierzchniowych, takich jak fimbrie, pilusy lub substancje adhezyjne.
- 2) Następnie bakterie wchodzą w fazę mikrokolonii, a ich podziały komórkowe prowadzą do wzrostu liczby komórek w obrębie struktury.
- 3) Ostatnim etapem jest dojrzewanie biofilmu, podczas którego bakterie wytwarzają macierz zewnątrzkomórkową, która zapewnia stabilność i ochronę przed czynnikami zewnętrznymi [59,60].



Rycina 4 Schemat przedstawiający formowanie się biofilmu bakteryjnego.

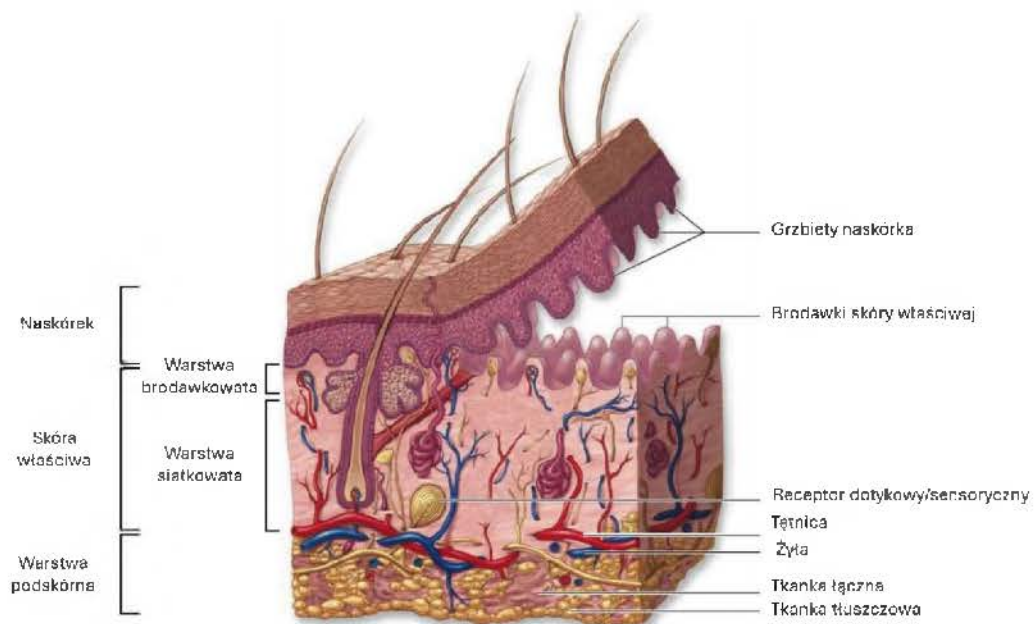
W dojrzałym biofilmie zachodzą intensywne interakcje między komórkami, a bakterie różnicują się pod względem funkcji metabolicznych, co sprzyja ich przetrwaniu w zmieniających się warunkach [61]. Z czasem następuje faza rozproszenia, w której niektóre komórki odrywają się od biofilmu i mogą kolonizować nowe środowiska, co prowadzi do przewlekłych i trudnych do wyleczenia infekcji. Struktura biofilmu sprawia, że bakterie w nim osadzone są nawet setki lub tysiące razy bardziej odporne na antybiotyki niż ich planktoniczne odpowiedniki [62,63]. Wynika to z kilku czynników, w tym ograniczonej penetracji leków w głąb biofilmu, obecności form przetrwalnikowych i zdolności bakterii do przechodzenia w stan uśpienia metabolicznego, wydzielania substancji ochronnych i wielu innych wymienionych powyżej, które zmniejszają ich podatność na leki. Biofilm zapewnia

również ochronę przed reakcją układu odpornościowego, w wyniku dynamicznych zmian w ekspresji genów, prowadzących do różnicowania antygenów powierzchniowych i przewlekłego charakteru infekcji [57]. Ze względu na te właściwości biofilmy są główną przyczyną trudnych do leczenia infekcji. Wzrost oporności na antybiotyki i zdolność bakterii do tworzenia biofilmu sprawiają, że klasyczne metody leczenia są coraz mniej skuteczne [64,65].

1.5 Charakterystyka tkanki skórnej i infekcji bakteryjnej

Skórę zasiedla około 10^{12} mikroorganizmów, takich jak bakterie, archeony, wirusy czy grzyby, z których to bakterie dominują pod względem masy. Wśród nich przeważają gatunki Gram-dodatnie, np. gronkowce – *Staphylococcus epidermidis* i *S. aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp., natomiast w mniejszej liczbie obecne są bakterie *Proteobacteria* i *Bacteroidetes* [16]. Należy podkreślić, że skład mikroflory skóry jest dynamiczny i zależy od wielu czynników, takich jak lokalizacja na powierzchni ciała, wiek oraz indywidualne predyspozycje gospodarza. Ulega on również znacznym zmianom w przebiegu chorób, środowiska, stylu życia, a także w sytuacji wniknięcia patogenów z zewnętrznych źródeł, na przykład poprzez kontakt z zakażoną osobą, skażenie rany wodą lub glebą czy inne uszkodzenia ciągłości tkanek umożliwiające kolonizację przez obce drobnoustroje [66].

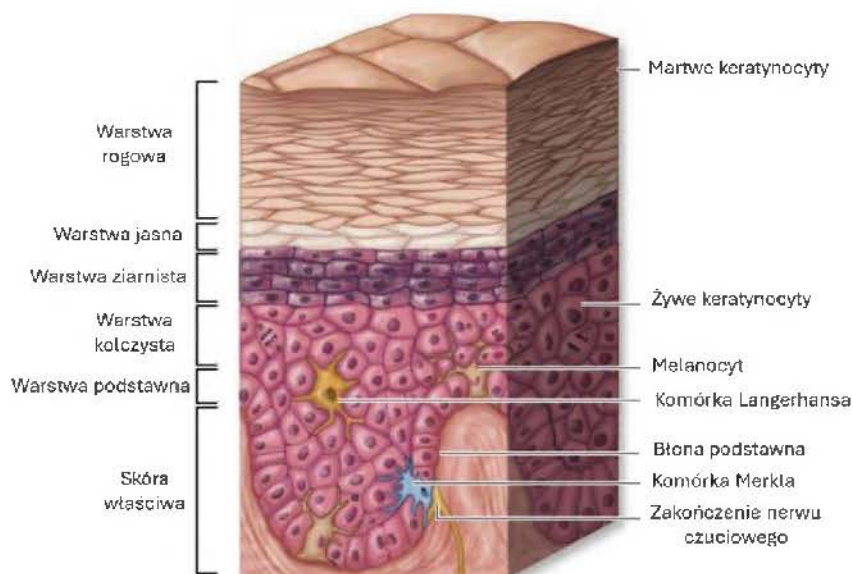
Tkanka skórna składa się z trzech głównych warstw: naskórka, skóry właściwej oraz tkanki podskórnej. Pełni ona funkcję podstawowej bariery ochronnej przed patogenami, dzięki kilku kluczowym mechanizmom, takim jak utrzymanie kwaśnego pH (około 5,5), produkcja białek przeciwbakteryjnych (lizozym, katelicydyna, β -defensyny, laktoferyna i inne) oraz obecność soli mineralnych (Rycina 5).



Rycina 5 Schemat budowy tkanki skórnej [67].

Naskórek składa się głównie z wielowarstwowego nabłonka płaskiego rogowaciejącego, zbudowanego z komórek zwanych keratynocytami. Występują w nim także trzy inne, znacznie mniej liczne typy komórek: melanocyty wytwarzające pigment, komórki Langerhansa pełniące funkcję prezentującą antygeny oraz komórki Merkla, czyli mechanoreceptory dotykowe. Naskórek nie zawiera naczyń krwionośnych – jego komórki otrzymują tlen i składniki odżywcze na drodze dyfuzji z warstwy skóry właściwej. Warstwa rogowa (ang. *stratum corneum* SC), zbudowana ze zrogowaciałych komórek, zapobiega trwałemu przyleganiu mikroorganizmów i sprzyja ich usuwaniu poprzez ciągłe złuszczenie. Choć zawiera niewiele składników odżywczych, jest bogata w keratynę, którą niektóre bakterie mogą wykorzystywać jako źródło pożywienia (Rycina 6) [68]. Warstwę jasną (ang. *stratum lucidum* SL) tworzy cienka, przezroczysta warstwa spłaszczonych, kwasochłonnych keratynocytów. Warstwa ziarnista (ang. *stratum granulosum* SG) jest zbudowana z spłaszczonych komórek z ziarnistościami keratohialinowymi i blaszkowatymi (lipidowymi), tworzące barierę przeciw utracie wody i wnikaniu substancji obcych. Warstwa kolczysta (ang. *stratum spinosum* SS) jest najgrubszą warstwą naskórka, zbudowaną z wielobocznych komórek, odpowiada za odporność mechaniczną. Bezpośrednio nad warstwą podstawną niektóre komórki nadal mogą się dzielić, dlatego obie warstwy określa się czasem wspólnie jako warstwę rozrodczą (ang. *stratum germinativum* SGe). Z kolei warstwa podstawna (ang. *stratum basale* SB) to pojedyncza warstwa zasadochłonnych, sześciennych lub walcowatych komórek, leżących na błonie podstawnej w miejscu połączenia skórno-naskórkowego, charakteryzuje

się intensywną aktywnością mitotyczną i zawiera komórki progenitorowe wszystkich warstw naskórka [67].



Rycina 6 Schemat układu tkanki skórnej z poszczególnymi warstwami [67].

Powierzchnia skóry charakteryzuje się licznymi mikroskopijnymi zagłębieniami, wypukłościami i porami odprowadzającymi wydzieliny gruczołów łojowych i potowych oraz mieszki włosowe. Struktury te stanowią dogodne miejsca kolonizacji bakterii i sprzyjają tworzeniu biofilmów zarówno w warunkach naturalnych, jak i w przebiegu infekcji. Powstała w ten sposób złożona matryca bakteryjna jest wyjątkowo odporna na mechaniczne i chemiczne metody usuwania, co znacznie utrudnia skuteczne leczenie zakażeń skóry. Ponadto, ze względu na obecność cholesterolu i innych lipidów w warstwie rogowej, powierzchnia skóry posiada ujemny ładunek elektryczny, co wpływa na proces adhezji bakterii [69,70].

Przerwanie ciągłości skóry aktywuje proces gojenia, którego celem jest regeneracja funkcjonalnego naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej. Niewłaściwy przebieg tego procesu może jednak prowadzić do infekcji skóry lub tkanek miękkich, które należą do najczęstszych zakażeń wymagających interwencji medycznej i stanowią istotną przyczynę zachorowalności oraz śmiertelności, zarówno u pacjentów ambulatoryjnych, jak i hospitalizowanych [71]. Pomimo znaczących postępów w leczeniu ran, zakażenia bakteryjne pozostają poważnym problemem klinicznym. Wynika to z faktu, że mikroorganizmy kolonizujące rany mogą rozwijać oporność na antybiotyki oraz tworzyć biofilm, w którym bakterie i grzyby otoczone są macierzą zewnątrzkomórkową zwiększającą ich odporność

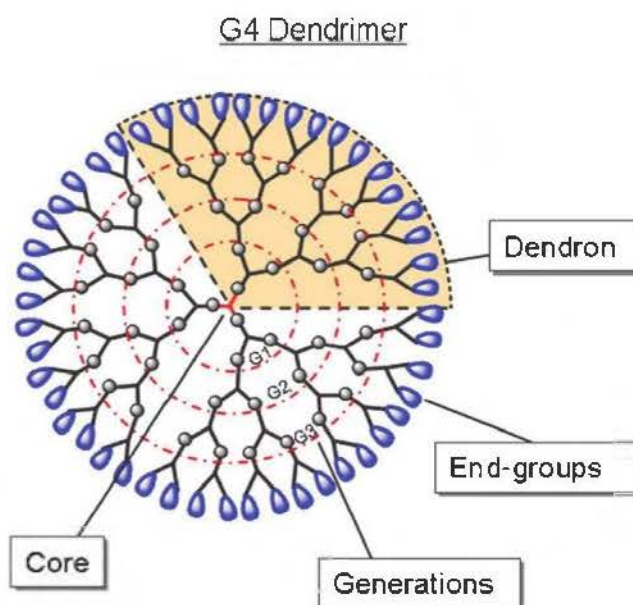
na działanie leków i utrudniającą gojenie. Przewlekłe rany często występują w przebiegu zaburzeń naczyniowych, takich jak owrzodzenia odleżynowe, zmiany niedokrwienne, owrzodzenia stopy cukrzycowej czy owrzodzenia żylnie kończyn dolnych. Naruszenie ciągłości bariery skórnej sprzyja kolonizacji przez mikroorganizmy i tworzeniu środowiska sprzyjającego rozwojowi zakażeń. Infekcje ran przewlekłych mają zwykle charakter wielogatunkowy, obejmując zarówno bakterie tlenowe, jak i beztlenowe. Wśród najczęściej izolowanych patogenów dominują *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Zakażenia z udziałem *P. aeruginosa* charakteryzują się większym nasileniem stanu zapalnego, głębszym uszkodzeniem tkanek oraz wolniejszym procesem gojenia. Wynika to z właściwości tego drobnoustroju, w tym zdolności do tworzenia wspomnianego biofilmu, obecności pilusów typu IV, ruchliwości opartej na wiciach oraz produkcji licznych czynników wirulencji, które chronią bakterie przed mechanizmami obronnymi gospodarza [57]. Dlatego skuteczniejsze metody profilaktyki i leczenia zakażeń skóry są kluczowe dla zahamowania rozwoju oporności drobnoustrojów oraz zmniejszenia liczby ciężkich przypadków wymagających hospitalizacji.

1.6 Alternatywy dla antybiotyków

Obecne terapie opierają się zazwyczaj na modyfikacjach istniejących leków, ale strategie te zapewniają jedynie tymczasowe rozwiązanie [72,73]. Wraz z utratą skuteczności konwencjonalnych antybiotyków konieczne staje się poszukiwanie alternatywnych metod leczenia, które są w stanie zwalczać patogeny wielolekooporne. Potencjalne alternatywy dla klasycznych antybiotyków obejmują szerokie spektrum strategii terapeutycznych, takich jak stosowanie probiotyków, inhibitorów czynników wirulencji patogenów oraz wytworzonych przeciwciał po szczepieniu. Ponadto coraz większe zainteresowanie budzą związki pochodzenia roślinnego, bakteriofagi i ich enzymy lityczne, w tym peptydy przeciwdrobnoustrojowe, a także zaawansowane rozwiązania nanotechnologiczne. Do najbardziej obiecujących należą nanosystemy – w tym polimery, dendrymery oraz biogenne nanocząstki metali, takie jak srebro, złoto, miedź czy platyna – które z powodzeniem zostały zastosowane przeciwko wybranym mikroorganizmom, w tym szczepom wielolekoopornym [74–76]. Niemniej jednak, metody te mogą nie być wystarczające do zahamowania infekcji lub zniszczenia bakterii, dlatego łączy się je w celu wzmocnienia działania przeciwbakteryjnego (na przykład połączenie białek przeciwbakteryjnych i kationowych nanocząstek).

1.7 Dendrymery kationowe

Nanomateriały, takie jak dendrymery, znane również jako nanocząstki modyfikowane ligandami, są powszechnie znane ze swoich właściwości przeciwbakteryjnych i stanowią obiecującą alternatywę dla stale badanych, ale nieskutecznych antybiotyków [77]. Dendrymery to syntetyczne cząsteczki o precyzyjnie kontrolowanej architekturze promieniowej i symetrycznej oraz specyficznych właściwościach fizykochemicznych, wynikających z ich wielofunkcyjnej powierzchni i wąskiego rozkładu masy cząsteczkowej [45,78,79]. Podstawową jednostką tworzącą dendrymer jest dendron – gałąź przyłączona do rdzenia – atomu pierwiastka lub złożonego związku, którego wartościowość warunkuje ilość możliwych do przyłączenia gałęzi, a każde kolejne rozgałęzienie dendronu tworzy wyższą generację dendrymeru (Rycina 7). Ponadto aktywność dendrymerów można modyfikować na wiele sposobów (np. rodzaj i liczba grup funkcyjnych, PEGylacja, rozmiar, kształt) [45,78–82]. Modyfikacje te mogą wzmacniać lub osłabiać ich właściwości antybakteryjne i toksyczność. Spośród różnych klas dendrymerów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych szczególne znaczenie mają układy zawierające atomy metali [83,84]. Łączą one mechanizm działania typowy dla dendrymerów, czyli zwiększanie przepuszczalności zewnętrznej błony bakteryjnej, z unikalnymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi metali [85–90]. Dzięki temu uzyskuje się wielokierunkowy efekt prowadzący do uszkodzeń komórki bakteryjnej.



Rycina 7 Schemat struktury dendrymeru [91].

Skuteczność antybakteryjna dendrymerów zależy jednak w dużej mierze od ich budowy i modyfikacji powierzchni. Wykazano, że dodatkowe wprowadzenie jonów metali, a także grup funkcyjnych – takich jak pochodne imidazolu czy pirymidyny – istotnie wzmacnia ich działanie biologiczne, rozszerzając zakres aktywności oraz zwiększając efektywność wobec szczepów opornych [82,92]. Dendrymery są także szeroko stosowane jako nośniki leków i genów w nanomedycynie i farmakologii celowanej [93]. Odpowiednio zaprojektowane i zmodyfikowane mogą skutecznie transportować substancje czynne bez niekorzystnego wpływu na komórki lub tkanki docelowe [94].

Metale, a zwłaszcza srebro, od wieków są wykorzystywane jako środki przeciwbakteryjne. Obecnie stosuje się je zarówno w postaci jonów i kompleksów, jak i nanocząstek. Mechanizm działania srebra obejmuje m.in. destabilizację błony komórkowej, generowanie reaktywnych form tlenu, hamowanie aktywności enzymów oraz ograniczanie tworzenia się biofilmu. Trwają intensywne badania nad udoskonaleniem tych systemów, które mają na celu zwiększenie ich stabilności, skuteczności i potencjału terapeutycznego [12,15,83].

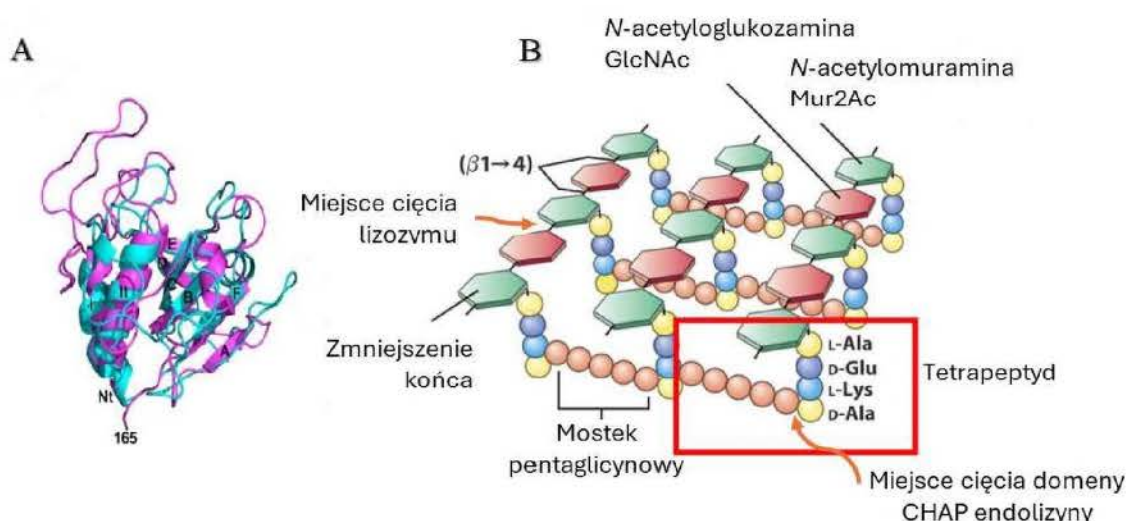
Niemniej jednak, oprócz właściwości przeciwbakteryjnych, dendrymery mogą również wywierać niekorzystny wpływ na komórki eukariotyczne, objawiający się cytotoksycznością lub genotoksycznością. Według doniesień naukowych, intensywność tych skutków może być silnie uzależniona od struktury dendrymeru, rodzaju ligandów powierzchniowych i zastosowanego stężenia [95]. Ponieważ wiadomo, że dendrymery zawierające jony srebra mogą zwiększać produkcję reaktywnych form tlenu (ROS), a dendrymery kationowe powodują permeabilizację błony zewnętrznej bakterii, istnieje duże prawdopodobieństwo, że podobny efekt wystąpi również w komórkach eukariotycznych. Może to prowadzić do zwiększonej cytotoksyczności, powodującej destabilizację błony, uszkodzenia oksydacyjne lipidów, białek i materiału genetycznego (DNA i RNA). W konsekwencji może dojść do dysfunkcji organelli komórkowych, w tym mitochondriów, a długotrwała akumulacja wolnych rodników może wywołać procesy prowadzące do śmierci komórki (enzym kaspaza-3 lub gen p53 po stresie genotoksycznym inicjuje apoptozę) [96].

1.8 Endolizyna bakteriofagowa

Niespełna dekadę temu terapia bakteriofagowa została skutecznie wdrożona do leczenia zakażeń wywołanych szczepami wielolekoopornymi u pacjentów hospitalizowanych, przynosząc przełomowe rezultaty kliniczne. Jak podaje Sawa i wsp. (2024), zastosowanie koktajlu kilku zróżnicowanych fagów skierowanych przeciwko danemu szczepowi bakteryjnemu umożliwiło uzyskanie pełnego wyleczenia w ciągu zaledwie kilku dni, bez obserwacji działań niepożądanych. Jest to szczególnie istotne w kontekście wieloletnich, nieskutecznych prób terapii antybiotykowej u tych samych pacjentów, które nie prowadziły do wyeliminowania patogenu [97]. Bakteriofagi dzieli się na dwa główne typy: lityczne oraz lizogeniczne (umiarkowane). Fagi lityczne po infekcji komórki gospodarza namnażają się w jej wnętrzu, a następnie powodują lizę komórki, prowadząc do skutecznego i szybkiego zniszczenia bakterii. W przeciwieństwie do nich fagi lizogeniczne integrują swój materiał genetyczny z genomem bakterii, nie wywołując natychmiastowej śmierci komórki. Mimo iż mogą one przejść w cykl lityczny na późniejszym etapie, zwykle nie zatrzymują infekcji bakteryjnej bezpośrednio po zakażeniu. Co więcej, ich obecność może sprzyjać horyzontalnemu transferowi genów, w tym genów oporności na antybiotyki lub toksyn, pomiędzy bakteriami. Z tych względów w zastosowaniach terapeutycznych preferuje się stosowanie fagów litycznych, które zapewniają szybkie i celowane działanie przeciwdrobnoustrojowe [98]. Bakteriofagi wytwarzają dwa enzymy, które mogą rozkładać peptydoglikan: lizyny związane z wirionami (VAL) i endolizyny. Działanie VAL opiera się na „lizie z zewnątrz” na początku infekcji fagowej, natomiast endolizyna jest hydrolazą peptydoglikanową, wytwarzaną pod koniec cyklu litycznego [99–103]. Endolizyny są w stanie specyficznie namierzać i rozkładać peptydoglikan bakteryjny poprzez rozrywanie wiązań w peptydowych połączeniach krzyżowych, takich jak tetrapeptydy i mostki pentaglicynowe (domena CHAP endolizyny) (Rycina 8) [101,102]. W bakteriach Gram-dodatnich endolizyny mogą bezpośrednio uzyskać dostęp do odsłoniętego peptydoglikanu i go rozkładać. Natomiast obecność błony zewnętrznej (OM) w bakteriach Gram-ujemnych stanowi znaczną barierę, wymagającą zastosowania środków zwiększających przepuszczalność błony, takich jak dendrymery, aby umożliwić skuteczne działanie endolizyn [104–107]. Dotychczas nie odnotowano przypadków rozwoju oporności bakterii na działanie endolizyn. Wynika to z faktu, że enzymy te oddziałują na wysoce konserwatywny i niezbędny dla przeżycia element strukturalny komórki bakteryjnej – peptydoglikan. Jakakolwiek jego modyfikacja, umożliwiająca potencjalne unikanie degradacji przez endolizynę, prowadziłyby

do utraty integralności ściany komórkowej i śmierci komórki bakteryjnej. W konsekwencji, brak zdolności bakterii do rozwinięcia skutecznych mechanizmów oporności na endolizyny stanowi ich istotną przewagę terapeutyczną, podkreślając potencjał tych enzymów jako alternatywy dla klasycznych antybiotyków [108].

Endolizyny wykazują wysoką specyficzność wobec bakterii, degradując ich ścianę komórkową poprzez rozszczepianie wiązań w peptydoglikanie, podobnie jak naturalnie występujący w organizmach ssaków lizozym. Lizozym zaś hydrolizuje wiązania glikozydowe pomiędzy *N*-acetylmuraminą (Mur2Ac) i *N*-acetylglukozaminą (GlcNAc), prowadząc do lizy komórki bakteryjnej. Stosowanie białek przeciwdrobnoustrojowych, takich jak endolizyna czy lizozym, uznaje się za bezpieczne pod względem cytotoksyczności, ponieważ komórki eukariotyczne nie zawierają peptydoglikanu – głównego substratu tych enzymów. W związku z tym czyni je obiecującymi kandydatami do zastosowań terapeutycznych [109].

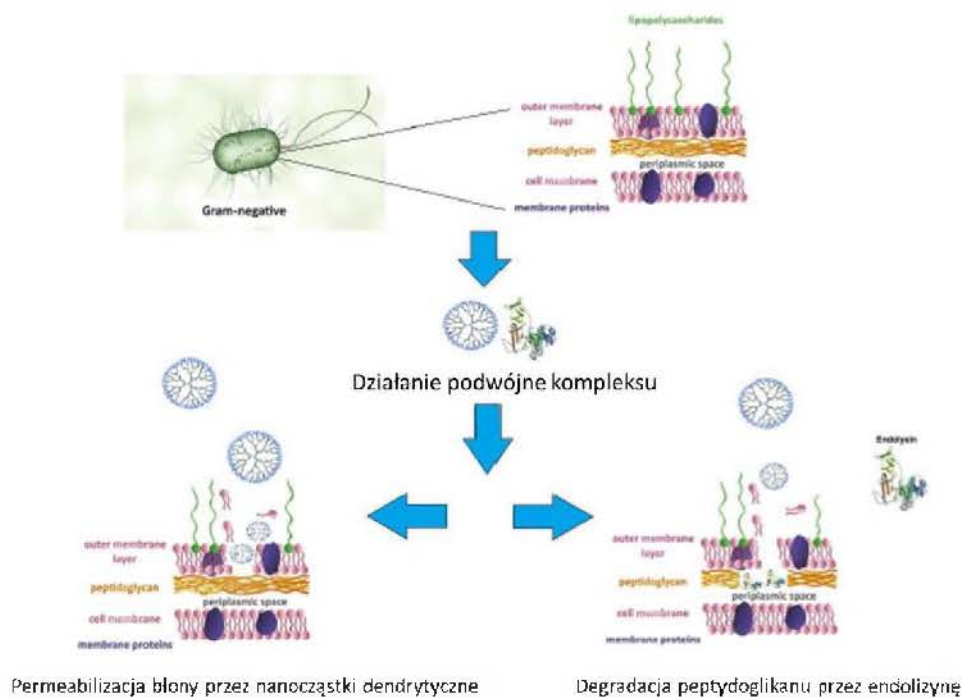


Rycina 8 (A) Struktura przestrzenna endolizyny (B) Schemat komponentów peptydoglikanu – miejsce działania endolizyny – połączenie krzyżowe tetrapeptydu i mostka pentaglicynowego oraz lizozymu – wiązanie $\beta(1\rightarrow4)$ [102,110].

Coraz więcej dowodów wskazuje na potencjał połączenia dendrymerów z bakteriofagami lub białkami przeciwdrobnoustrojowymi, takimi jak lizyny, w celu wzmocnienia działania przeciwbakteryjnego [111,112].

1.9 Synergistyczne działanie dendrymerów i białek przeciwbakteryjnych

Na podstawie licznych doniesień naukowych, stosowanie dendrymerów zawierających jony srebra, szczególnie w połączeniu z białkami przeciwbakteryjnymi, takimi jak endolizyna, stanowi obiecującą strategię skutecznego eliminowania komórek bakterii planktonicznych. Związki te wykazują działanie przeciwbakteryjne poprzez wiele mechanizmów (Rycina 9).



Rycina 9 Proponowany podwójny mechanizm działania kompleksu dendrymeru i endolizyny wobec bakterii Gram-ujemnych.

W pracy Skrzyńiarz i wsp. (2023) porównano dwa typy dendrymerowych nanocząstek srebra - DendAgNPs i PEG-DendAgNPs - pod kątem ich zdolności do transportu lizozymu i oddziaływania z bakteriami. Nie-PEGyłowane DendAgNPs silnie permeabilizowały błonę bakteryjną, tworząc pory ułatwiające wnikanie lizozymu i prowadząc do skutecznej degradacji peptydoglikanu oraz śmierci komórek. Z kolei PEG-DendAgNPs powodowały agregację bakterii i słabsze uszkodzenia błony, lecz mimo to wykazywały wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową nawet przy niskich dawkach lizozymu. Wynikało to prawdopodobnie z elektrostatycznego wiązania lizozymu przez ujemnie naładowane łańcuchy PEG i jego lokalnej koncentracji na powierzchni bakterii [113]. W pracy Lasak i wsp. (2025) oceniono aktywność nanomateriałów, takich jak nanowłókna PL- b-CL/PVP, dendrytyczne nanocząstki srebra wraz z białkiem przeciwdrobnoustrojowym - endolizyną wobec bakterii Gram-ujemnej *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 oraz komórek eukariotycznych.

Wykazano, że funkcjonalizacja nanomateriałów jonami metali lub grupami organicznymi zwiększała ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe poprzez intensyfikację permeabilizacji błony, generowanie stresu oksydacyjnego, zaburzenia integralności komórkowej czy formowania złożonej struktury biofilmu. Połączenie dendrymerów z białkami przeciwdrobnoustrojowymi, takimi jak endolizyny, wykazało działanie synergistyczne i prowadziło do zwiększenia efektywności terapii antybakteryjnej i przeciwbiofilmowej, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej żywotności komórek fibroblastów, co stanowi obiecujący aspekt biomedyczny i terapeutyczny [114]. Badania Skrzyniarz i wsp. (2024) wykazały, że aktywność kationowych dendrymerów CBS zależy od ich struktury oraz składu lipidowego błony bakterii. Dendrymer D1 działa destrukcyjnie, powodując pęknięcie dwuwarstwy, natomiast D2 jedynie permeabilizuje błonę, umożliwiając transport endolizyny bez jej całkowitego uszkodzenia. Zwiększona zawartość ujemnie naładowanych lipidów wzmacnia działanie D2, co czyni go skutecznym permeabilizatorem i nośnikiem dla enzymów antybakteryjnych. Wyniki podkreślają, że różne bakterie Gram-ujemne reagują odmiennie, co ma kluczowe znaczenie dla projektowania nowych terapii [115].

Ponieważ dendrymery i białka przeciwbakteryjne wykazują ogromny potencjał terapeutyczny, zwłaszcza jako ukierunkowane nanonośniki, ich szersze zastosowanie biomedyczne wymaga dogłębnego zrozumienia ich toksyczności i interakcji biologicznych. Pomimo obiecujących wyników uzyskanych w dotychczasowych analizach, wciąż brakuje kompleksowych danych dotyczących działania badanych związków na złożone struktury bakteryjne, takie jak biofilmy, a także ich wpływu na komórki i tkanki eukariotyczne. Konieczne są dalsze, pogłębione badania, aby uzupełnić luki poznawcze, zweryfikować mechanizmy działania oraz doprecyzować obszary, które pozostają niejasne lub niewystarczająco poznane.

2. Cel pracy

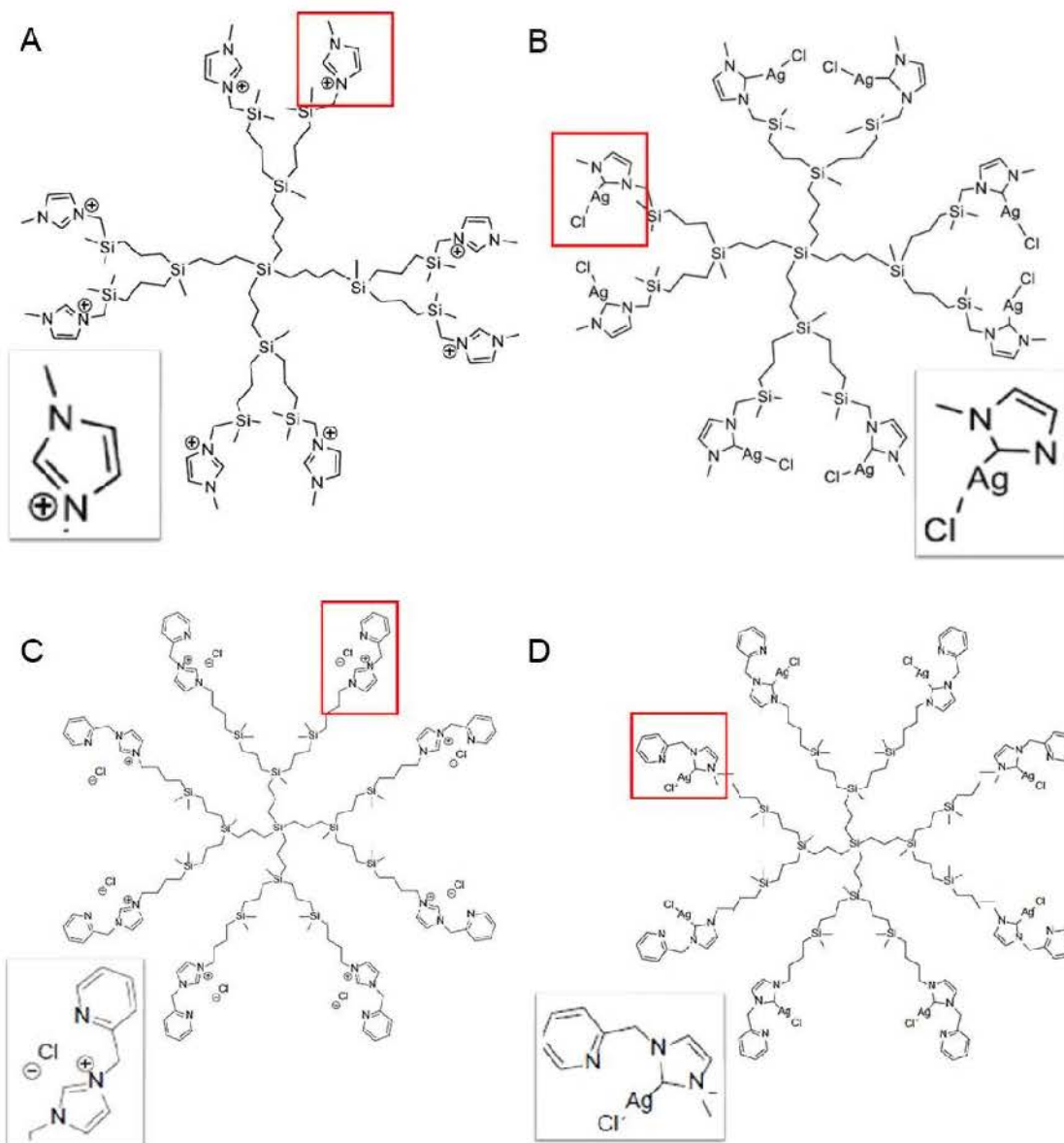
Celem niniejszej pracy jest charakterystyka mechanizmu działania antybakteryjnego dendrymerów karbokrzemowych i ich kompleksu z CHAP-domeną endolizyny fagowej wobec bakterii Gram-ujemnej – *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. W zamiarze realizacji podanego celu głównego, wyodrębniono cele szczegółowe:

- Analiza termodynamiczna interakcji pomiędzy dendrymerami a endolizyną.
- Ocena zdolności przenikania dendrymerów przez błonę zewnętrzną bakterii oraz uszkodzenia peptydoglikanu przez endolizynę.
- Ocena właściwości hamujących powstawanie biofilmu bakteryjnego przez dendrymery i ich kompleks z endolizyną w warunkach *in vitro* i z zastosowaniem modelu skóry zwierzęcej *ex vivo*.
- Ocena cytotoksyczności nanocząstek dendrytycznych i ich kompleksu z endolizyną wobec komórek eukariotycznych.

3. Materiały i metody

3.1 Materiały

W niniejszej pracy wykorzystano dendrymery karbokrzemowe, udostępnione w ramach współpracy z profesorem Javierem Sanchez-Nieves z University of Alcalá, Alcalá de Henares, Hiszpania (Rycina 10).



Rycina 10 Schemat struktury badanych dendrymerów karbokrzemowych. (A) Dend imidazolowy (B) DendAg imidazolowy z jonami srebra, (C) DendCh pirydyno-imidazolowy, (D) DendAgCh pirydyno-imidazolowy z jonami srebra.

Rekombinowany fragment endolizyny CHAP domeny katalitycznej faga Î|812 został zakupiony od firmy Protean z Czech. Domena katalityczna CHAP jest zbliżona do LysK endolizyny.

Dziki szczep bakteryjny *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) pochodził z kolekcji Zakładu Biologii Medycznej Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach

Do badań użyto linię komórkową VH10 ludzkich fibroblastów (ATCC, Manassas, VA, USA; nr katalogowy PCS-201-012) hodowaną w pożywce dedykowanej (pożywka do wzrostu fibroblastów, nr kat. 116–500, Cell Application, Inc) i prowadzono w 37 ° C i 5 % CO₂.

3.2 Metody

3.2.1 Gęstość optyczna (ang. *optical density OD*₆₀₀)

W celu określenia minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (ang. *minimum inhibitory concentration* MIC) przez dendrymery, wykorzystano szczep dziki *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Wszystkie hodowle bakteryjne były prowadzone z wykorzystaniem medium TSB (*Tryptone Soya Broth*). W przypadku badań prowadzonych dla samych dendrymerów zastosowano ich stężenia: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 oraz 128 µg/mL. Natomiast w badaniach łączonych dendrymery stosowano w stężeniu 32 µg/mL, a endolizynę w stężeniach 1 µg/mL i 2 µg/mL. Aktywność oceniano w hodowli bakterii PAO1 w fazie wykładniczego wzrostu, po 24 godzinach inkubacji, metodą spektrofotometryczną przy długości fali 600 nm, z wykorzystaniem spektrofotometru TECAN SPARK Magellan V2.2 STD (Tecan Group Ltd., Szwajcaria). Efekt wyrażano jako wartość absorbancji hodowli *P. aeruginosa* (gęstość optyczna). Eksperymenty prowadzono w trzech powtórzeniach, a dane przedstawiono jako wartości średnie. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe (*Standard Deviation*).

3.2.2 Degradacja peptydoglikanu – *Remazol Brilliant Blue R*

Wysuszony, oczyszczony peptydoglikan (PG) *E. coli* ATCC8739, wyizolowany zgodnie z metodą Gałczyńskiej i wsp. [116], zawieszono w wodzie destylowanej. *Remazol Brilliant Blue R* (Sigma-Aldrich) rozpuszczono w sterylnej wodzie destylowanej. Stosunek molowy dendrymerów do endolizyny wynosił 4:1. Eksperyment przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Cascales i Santin [117]. Zawiesinę PG zmieszano z 400 mM NaOH i inkubowano

przez 30 minut w temperaturze 37 ° C, następnie do mieszaniny dodano barwnik RBB, wymieszano w wirówce i inkubowano przez noc w temperaturze 37 ° C. Następnie dodano HCl (1 M) i wymieszano. Mieszaninę odwirowano dwukrotnie przy 16 000 ×g w temperaturze 25 ° C przez 1 godzinę. Osady peptydoglikanu zawieszono ponownie w PBS. PG znakowany RBB rozcieńczono w PBS w 12 próbkach typu Eppendorf i inkubowano w temperaturze 37 ° C przez 30 minut. Do mieszaniny dodano endolizynę, dendrymery i inkubowano w temperaturze 37 ° C przez 2 godziny. Po 2 godzinach dodano etanol w celu zatrzymania reakcji. PG odwirowano przy 16 000 × g w temperaturze 25 ° C przez 30 minut. Absorbancję supernatantu zmierzono przy 595 nm za pomocą spektrometru TECAN SPARK Magellan V2.2 STD (Tecan Group Ltd., Szwajcaria). Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie. Dane przedstawiono jako wartości średnie. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe (*Standard Deviation*).

3.2.3 Permeabilizacja zewnętrznej błony bakteryjnej

Eksperyment przeprowadzono przy użyciu testu wychwyty sondy N- fenylo- 1- naftyloaminy (NPN). Bakterie *P. aeruginosa* PAO1 hodowano w temperaturze 37 ° C w celu uzyskania odpowiedniej gęstości optycznej (OD = 0,5). Bakterie odwirowano (9000 obr./min przez 3 minuty). Osad bakteryjny zawieszono w buforze HEPES w celu uzyskania OD wynoszącej 0,1. Pomiar przeprowadzono w sterylnej czarnej płytce 96-dółkowej. Do bakterii dodano dendrymery (końcowe stężenia 16 µg/mL, 32 µg/mL i 64 µg/mL). Następnie dodano barwnik fluorescencyjny NPN i natychmiast zmierzono fluorescencję za pomocą spektrometru TECAN SPARK Magellan V2.2 STD (Tecan Group Ltd., Szwajcaria) przy długości fali emisji/wzbudzenia 420/350 nm. Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie. Dane przedstawiono jako wartości średnie.

3.2.4 Termodynamiczne parametry interakcji dendrymerów z endolizyną

Wygaszanie fluorescencji endolizyny w obecności dendrymerów przeprowadzono na 96-dółkowej płytce przy użyciu spektrometru TECAN SPARK Magellan V2.2 STD (Tecan Group Ltd., Szwajcaria) przy długościach fal wzbudzenia 340 nm i 290 nm, mierzonych w różnych temperaturach (298, 301, 304, 307 i 310 K). Stosunki molowe endolizyny i dendrymerów wynosiły (1:0, 1: ½, 1:1, 1:2, 1:4 i 1:8). Analizę Van't Hoff'a przeprowadzono w oparciu o uzyskane wyniki wykorzystując równanie:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

gdzie R to uniwersalna stała gazowa, a K_b to stała wiązania.

Stałą Stern-Volmer K_{SV}

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q]$$

gdzie F_0 i F oznaczają odpowiednio fluorescencję białka w nieobecności i obecności wygaszacza (dendrymer), K_{SV} to stała wygaszania Sterna–Volmera (SV), a $[Q]$ oznacza stężenie wygaszacza.

Energii swobodnej Gibbsa ΔG

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Wartości entalpii wskazują na wzrost energii wiązań międzycząsteczkowych, natomiast wartości entropii sugerują zmiany w nieuporządkowaniu układu podczas procesu wiązania.

3.2.5 Dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *Dynamic Light Scattering DLS*)

Do pomiaru średnicy hydrodynamicznej dendrymerów i w połączeniu z endolizyną wykorzystano analizator wielkości cząstek Anton Paar Litesizer™ 500 oparty na dynamicznym rozpraszaniu światła (DLS). Rozmiar cząstek analizowano w następujących warunkach: długość fali 658 nm, kąty pomiarowe: 15 °, 90 ° i 175 ° w temperaturze 25 ° C. Kompleksy dendrymerów z endolizyną zmierzono w stosunku molarnym 1:4.

3.2.6 Morfologia dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM)

Morfologię samych dendrymerów i w połączeniu z endolizyną, zbadano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) Tecnai G2 Spirit z kamerą CCD Morada. Do wizualizacji morfologii dendrymerów i endolizyny wykorzystano zawiesiny z analizy DLS. Pięć mikrolitrów tych roztworów umieszczono na pokrytych węglem siatkach miedzianych o gęstości 300 oczek na 10 minut, nadmiar płynu usunięto za pomocą bibuły filtracyjnej, a siatki wysuszono na powietrzu.

3.2.7 Produkcja reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species* ROS)

Bakterie w fazie wzrostu wykładniczego zostały przemyte PBS, ponownie zawieszone w 10 mM PBS i umieszczone w czarnej 96-dółkowej mikroplycie. Bakterie poddano działaniu samych dendrymerów (32 µg/mL) oraz w połączeniu z endolizyną (2 µg/mL) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie do komórek dodano 1 µM DCFH-DA (diacetylo-dichlorofluoresceina). Fluorescencję mierzono co 5 minut (50 cykli) przy długościach fal wzbudzenia/emisji 485/535 nm za pomocą spektrometru TECAN SPARK Magellan V2.2 STD (Tecan Group Ltd., Szwajcaria). Eksperymenty przeprowadzono dwukrotnie. Dane przedstawiono jako wartości średnie.

3.2.8 LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit

Żywotność bakterii zbadano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej przy użyciu zestawu LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, ThermoFisher). Martwe bakterie i bakterie z uszkodzonymi błonami wykazują czerwoną fluorescencję dzięki jodkowi propidyny, natomiast żywe komórki zieloną za pomocą SYTO 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain - zielony fluorescencyjny barwnik do kwasów nukleinowych. Eksperyment przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Dendrymery o stężeniu 32 µg/mL i 2 µg/mL endolizyny umieszczono na płytce 96-dółkowej wraz z zawiesiną bakterii. Eksperyment przeprowadzono trzykrotnie. Żywotność badano na wykładniczo rosnącej kulturze PAO1 po 24 godzinach inkubacji. Po 24 godzinach całą ciecz przelano do odpowiednich probówek Eppendorf. Ciecz odwirowano (9000 obr./min przez 10 min), usunięto supernatant i dwukrotnie przemyto 0,85 % roztworem NaCl. Barwniki zmieszano w stosunku 1:1. Na koniec osad zawieszono w 0,85 % NaCl, dodano mieszaninę barwników i inkubowano przez 15 minut w ciemności. Roztwór naniesiono na szkiełko podstawowe i przykryto szkiełkiem nakrywkowym, a następnie obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Zeiss Axio Scope.A1) i programem do analizy mikroskopowej ZEN z użyciem filtrów (zestaw zielony 44: wzbudzenie BP 475/40, FT 500, emisja BP 530/50; zestaw czerwony 20: wzbudzenie BP 546/12, FT 560, emisja BP 575-640).

3.2.9 Znakowanie peptydoglikanu barwnikiem HADA

W celu określenia wpływu samych dendrymerów i w połączeniu z endolizyną na zewnętrzną błonę bakteryjną i ścianę komórkową, a w szczególności peptydoglikan, przeprowadzono badania mikroskopem fluorescencyjnym. Stężenia dendrymerów wynosiły odpowiednio 32 µg/mL i 2 µg/mL dla endolizyny. Bakterie hodowano przez noc na wytrząsarce (37 ° C, 25 rpm) w celu napowietrzenia kultury. Kultura nocna została rozcieńczona do gęstości optycznej 0,1. Dodano dendrymery i endolizynę, a następnie inkubowano przez noc w temperaturze 37 ° C. Barwnik HADA (propyl (2E) -2-cyano-3-(3,4-dihydroksy 5-nitrofenyl) został przygotowany zgodnie z wytycznymi producenta i rozpuszczony w DMSO w celu uzyskania stężenia 100 mM. Marker dodano do każdego wariantu kultury bakteryjnej, a próbki umieszczono na wytrząsarce (37 ° C, 80 rpm) na 5 minut. Następnie do próbek dodano schłodzony etanol, aby marker mógł przeniknąć do peptydoglikanu, a próbki pozostawiono na lodzie na 1 godzinę. Następnie bakterie odwirowano (9000 obr./min, 3 minuty), usunięto supernatant, a do osadu dodano zmrożony bufor PBS i wymieszano. Po odwirowaniu usunięto supernatant i użyto PBS do wypłukania bakterii z etanolu i niezwiązanego barwnika HADA. Na koniec do osadu dodano zmrożony PBS i osad ponownie zawieszono. Powstały roztwór bakterii z wyznakowanym peptydoglikanem nakropiono następnie na szkiełko podstawowe i przykryto szkiełkiem nakrywkowym. Wizualizację przeprowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Zeiss Axio Scope. A1) i programu do analizy mikroskopowej ZEN. Próbki analizowano przy użyciu filtra niebieskiego (EX G 365 nm, BS FT 395, EM BP 445/ 50).

3.2.10 Morfologia bakterii – Transmisyjna mikroskopia elektronowa TEM

Morfologię *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 analizowano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) Tecnai G2 Spirit z kamerą CCD Morada. Bakterie PAO1 hodowano przez noc na wytrząsarce (37 ° C). Do hodowli dodano odpowiednie objętości dendrymerów o stężeniu końcowym 32 µg/mL i 2 µg/mL endolizyny. Bakterie odwirowano (9000 obr./min, 3 minuty), dwukrotnie przemyto w PBS, utrwalono w 3 % aldehydzie glutarowym w 0,2 M buforze kakodylowym przez 3 godziny, dwukrotnie przemyto w 0,1 M buforze kakodylowym, dotrwalono w 2,5 % OsO₄ w 0,1 M buforze kakodylowym przez 90 minut, dwukrotnie przemyto w 0,1 M buforze kakodylowym i odwodniono w rosnącym stężeniu etanolu (50, 60, 70, 80, 90 i 99,9 %) przez 10 minut każdy, inkubowano w roztworze etanolu i tlenku propylenu 1:1 przez 15 minut i zawieszono w czystym tlenku

propylenu. Próbki umieszczono na pokrytych węglem siatkach miedzianych o rozmiarze oczek 300 na 10 minut, pozostawiono do całkowitego wyschnięcia i obserwowano pod mikroskopem.

3.2.11 Morfologia bakterii – Skaningowa mikroskopia elektronowa SEM

Morfologię PAO1 po interakcji z dendrymerami i w połączeniu z endolizyną zweryfikowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, JEOL JSM-7100F, Japonia) przy napięciu przyspieszającym 15 kV. Bakterie PAO1 hodowano przez noc na wytrząsarce (37 ° C). Do hodowli dodano odpowiednie objętości dendrymerów o stężeniu końcowym 32 µg/mL i 2 µg/mL endolizyny. Bakterie odwirowano (9000 obr./min, 3 min), dwukrotnie przemyto w PBS, utrwalono w 3 % aldehydzie glutarowym w 0,2 M buforze kakodylowym przez 3 godziny, dwukrotnie przemyto w 0,1 M buforze kakodylowym, następnie dotrwalono w 2,5 % OsO₄ w 0,1 M buforze kakodylowym przez 90 minut, dwukrotnie przemyto w 0,1 M buforze kakodylowym i odwodniono w rosnącym stężeniu etanolu (50, 60, 70, 80, 90 i 99,9 %) przez 10 minut każdy, inkubowano w roztworze etanolu i tlenu propylenu 1:1 przez 15 minut i zawieszono w czystym tlenku propylenu. Próbki umieszczono na pokrytych węglem siatkach miedzianych o rozmiarze oczek 300, pozostawiono do całkowitego wyschnięcia, pokryto złotem za pomocą rozpylacza jonowego JEOL JFC 110E Fine Coat Ion Sputter i obserwowano pod mikroskopem.

3.2.12 Test hamowania biofilmu z użyciem fioletu krystalicznego

Hamowanie rozwoju biofilmów *P. aeruginosa* PAO1 oceniano za pomocą testu z użyciem fioletu krystalicznego (ang. *crystal violet* CV). Metoda ta pozwala na ilościowe określenie całkowitej masy biofilmu na podstawie zdolności barwnika CV do wiązania się z pozakomórkowymi substancjami polimerowymi (EPS) oraz żywymi i martwymi komórkami bakteryjnymi. Bakterie hodowane przez noc rozcieńczono w 10 mL sterylnego medium TSB i naniesiono na płytkę 96-dółkową, dodano odpowiednią objętość dendrymerów (o stężeniu końcowym 1 – 128 µg/mL i 2 µg/mL endolizyny, uzupełniono świeżym medium i pozostawiono do utworzenia biofilmu w temperaturze 37 ° C i 5 % CO₂ przez 24 godziny. Dojrzałe biofilmy delikatnie przemyto dwukrotnie PBS, w celu usunięcia niezwiązanych bakterii. Usunięto PBS i pozostawiono biofilmy do wyschnięcia. Biofilmy barwiono przez 15 minut 0,1 % roztworem fioletu krystalicznego, po tym trzykrotnie przemyto PBS w celu usunięcia nadmiaru barwnika. Następnie CV rozpuszczono w 99,9 % etanolu. Po 15 minutach inkubacji roztwór przeniesiono do nowej płytki 96-dółkowej i zmierzono absorbancję przy

570 nm za pomocą spektrometru TECAN SPARK Magellan V2.2 STD (Tecan Group Ltd., Szwajcaria). Absorbancja roztworu odbarwiającego odpowiada masie biofilmu. Eksperyment przeprowadzono trzykrotnie. Dane przedstawiono jako wartości średnie. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe SD (*Standard Deviation*).

3.2.13 FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit – *in vitro*

Znakowanie żywych i martwych komórek bakteryjnych w utworzonym biofilmie przeprowadzono przy użyciu specjalnego zestawu FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit (Invitrogen, USA). Roztwór barwnika przygotowano zgodnie z instrukcją producenta, tj. 3 µL barwnika SYTO-9 (480/500 nm) i 3 µL jodku propidyny (490/635 nm) dodano do 1 mL wody destylowanej (MiliQ, MERCK). Bakterie hodowane przez noc rozcieńczono w 10 mL sterylnego TSB i naniesiono na płytkę 24-dółkową (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd.), uzupełniono świeżym TSB i pozostawiono do utworzenia biofilmu w temperaturze 37 ° C i 5 % CO₂ przez 24 godziny. Do utworzonego biofilmu dodano odpowiednie objętości dendrymerów i endolizyny, tak aby stężenia wynosiły odpowiednio 8 i 32 µg/mL oraz 2 µg/mL, a następnie inkubowano w temperaturze 37 ° C i 5 % CO₂ przez 24 godziny. Po upływie tego czasu starą pożywkę delikatnie usunięto i dwukrotnie przemyto wodą destylowaną. Biofilm barwiono przygotowanym roztworem przez 20 minut w ciemności, barwnik wypłukano dwukrotnie przy użyciu wody destylowanej, a za pomocą metalowej skrobaczki przeniesiono biofilmy na szkiełko podstawowe, przykryto szkiełkiem nakrywkowym i obserwowano pod mikroskopem konfokalnym (NIKON Eclipse Ti/A1, Japonia) nie dłużej niż 30 minut po barwieniu.

3.2.14 Preparatyka skóry z ucha wieprzowego – badania *ex vivo*

Świeże ucho wieprzowe pochodziło z lokalnej rzeźni. Skórę zewnętrznej części ucha wieprzowego oczyszczono poprzez dokładne umycie gorącą wodą i szarym mydłem, a włosy usunięto za pomocą brzytwy. Następnie skórę wstępnie wysterylizowano, myjąc kilkakrotnie 70 % roztworem etanolu i naświetlając promieniowaniem UV przez 20 minut. Po procesie sterylizacji, w komorze laminarnej, skórę oddzielono od chrząstki za pomocą skalpela. Wypreparowany kawałek skóry podzielono na mniejsze kawałki o wymiarach około 1×1 cm i grubości 1-3 mm. Wszystkie dalsze procedury eksperymentalne przeprowadzono w dniu sterylizacji – próbek nie przechowywano ani nie zamrażano.

3.2.15 FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit – *ex vivo*

W celu analizy tworzenia się biofilmu bakteryjnego *P. aeruginosa* PAO1 na skórze wieprzowej, przygotowano pożywkę hodowlaną DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) zawierającą L-glutaminę i czerwień fenolową, z dodatkowym wzbogaceniem 10 % płodową surowicą bydlęcą (*Fetal Bovine Serum*). Do eksperymentu wykorzystano 24-dołkowe płytki hodowlane, w których umieszczono wcześniej przygotowane i sterylizowane promieniami UV krawki z bibuły filtracyjnej, dopasowane rozmiarem do średnicy dołków. Do każdego dołka dodano 250 μL pożywki DMEM, a następnie umieszczono sterylne fragmenty skóry ($1 \times 1 \text{ cm}$). 10 μL rozcieńczonych bakterii naniesiono na środek fragmentu skóry i pozostawiono do utworzenia biofilmu w temperaturze 37°C i 5 % CO_2 przez 24 godziny. Odpowiednie objętości dendrymerów (8 i 32 $\mu\text{g/mL}$) i endolizyny (2 $\mu\text{g/mL}$) oraz świeżego podłoża DMEM (łącznie 400 μL) dodano do utworzonego biofilmu na skórze i inkubowano w temperaturze 37°C i 5 % CO_2 przez 24 godziny. Po upływie tego czasu starą pożywkę delikatnie usunięto i kawałki tkanki dwukrotnie przemyto wodą destylowaną. Biofilm utworzony na skórze zabarwiono, nakrapiając 30 μL roztworu barwnika i pozostawiając na 20 minut w ciemności (przygotowanie opisano w akapicie 3.2.13). Następnie barwnik trzykrotnie spłukano wodą destylowaną, a skórę delikatnie przeniesiono pęsetą na szkiełko nakrywkowe. Tak przygotowaną próbkę obserwowano pod mikroskopem konfokalnym nie dłużej niż 30 minut po zabarwieniu.

3.2.16 Morfologia biofilmu bakteryjnego – SEM

Przygotowanie skóry do obserwacji pod mikroskopem skaningowym było takie samo jak opisano powyżej, z mniejszą powierzchnią skóry (około 5 mm x 5 mm). Po hodowli i inkubacji próbki skóry utrwalono w 3 % roztworze aldehydu glutarowego w 0,2 M buforze kakodylowym przez 3 godziny, a po 30 minutach utrwalacz zastąpiono świeżym roztworem. Następnie próbki płukano dwukrotnie w 0,1 M buforze kakodylowym. W kolejnym etapie przeprowadzono dodatkowe utrwalanie w 2,5 % czterotlenku osmu (OsO_4) w 0,1 M buforze kakodylowym przez 2 godziny. Próbki przemyto dwukrotnie w 0,1 M buforze kakodylowym. Następnie przeprowadzono dehydratację tkanek w rosnących stężeniach etanolu: 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % i 100%, przy czym każda inkubacja trwała 20 minut, aby skutecznie usunąć wodę z tkanek. Po całkowitym odwodnieniu próbki poddano prześwietlaniu w mieszaninach etanolu i tlenu propylenu w proporcjach: 3:1, 1:1 i 1:3, a na koniec zawieszono je w czystym tlenku propylenu. Próbki umieszczono na szklanych szkiełkach,

pozostawiono do całkowitego wyschnięcia, umieszczono na dyskach węglowych, pokryto złotem za pomocą JEOL JFC 110E Fine Coat Ion Sputter i przeanalizowano za pomocą SEM (JEOL JSM-7100F, JEOL Ltd., Japonia) przy napięciu przyspieszającym 15 kV.

3.2.17 Histomorfologia skóry wieprzowej niezainfekowanej i zainfekowanej *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 po traktowaniu dendrymerami i kompleksami z endolizyną

Przygotowanie do obserwacji histomorfologicznej skóry wieprzowej niezainfekowanej i zainfekowanej bakteriami po poddaniu działaniu badanych stężeń dendrymerów (8 i 32 µg/mL) i endolizyny (2 µg/mL), przeprowadzono w sposób opisany powyżej dla mikroskopii konfokalnej, ale uzupełniono preparat przez utrwalenie 10 % buforowaną formaliną przez 24 godziny. Następnego dnia tkanki przemyto dwukrotnie w PBS, zatopiono w medium mrozeniowym OTC, zamrożono w temperaturze -20 ° C, a skrawki mrozeniowe wycięto na kriotomie Leica CM1100 o grubości ~ 6 - 8 µm, przeniesiono na szkiełka SuperFrost™, które barwiono 1 % błękitem toluidyny przez 5 sekund, nakropiono mieszaninę gliceryny z PBS, przykryto szkiełkiem nakrywkowym i obserwowano pod mikroskopem świetlnym Nikon Eclipse 50i (Japonia) z aparatem cyfrowym DS-Fi1.

3.2.18 Test żywotności komórek eukariotycznych MTS

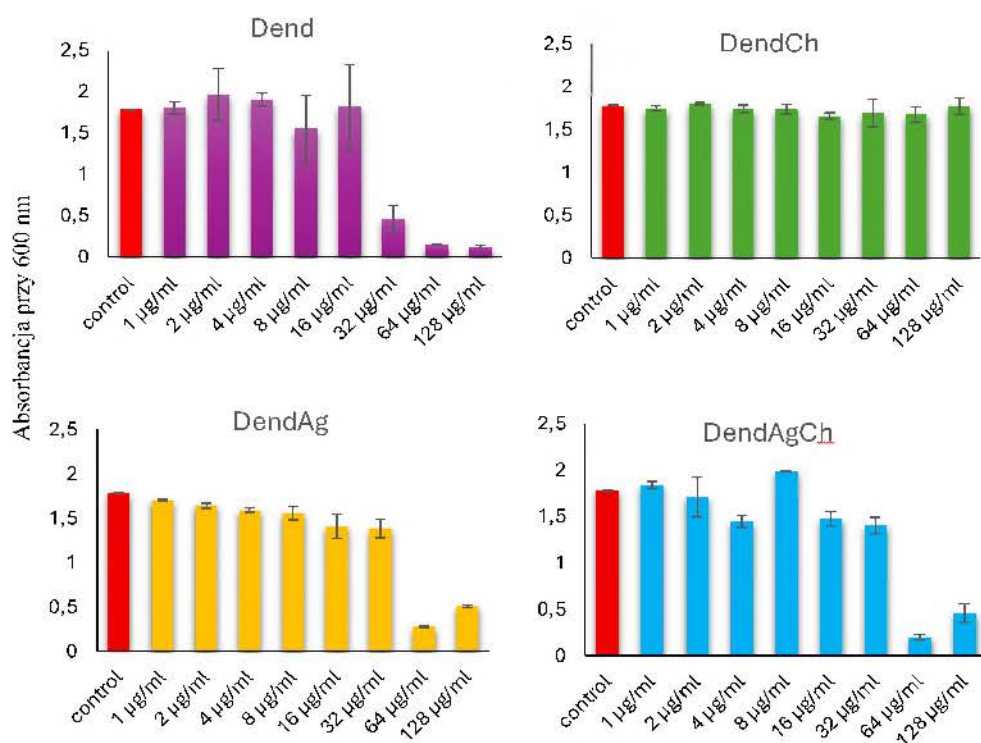
Ludzką linię komórek fibroblastów VH10 (ATCC, Manassas, VA, USA; nr katalogowy PCS-201-012) hodowano w pożywce (pożywka do wzrostu fibroblastów, nr kat. 116–500, Cell Application, Inc) w temperaturze 37 ° C w wilgotnej atmosferze z 5 % zawartością CO₂. Pożywkę hodowlaną wymieniało co 2 dni. Żywotność komórek fibroblastów poddanych działaniu dendrymerów w stężeniu 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 µg/mL oraz kompleksu z endolizyną w stężeniu 1 i 2 µg/mL, określono za pomocą testu MTS (przekształcenie soli tetrazolowej - bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo) -2,5-difenylo-tetrazolu – do barwnego formazanu przez mitochondrialną dehydrogenazę bursztynianową). Fibroblasty wysiano na płytkach 96-dółkowych. Po osiągnięciu odpowiedniej konfluencji, komórki poddano działaniu dendrymerów, endolizyny, dendrymeru z endolizyną przez 24 godziny w 37 ° C i 5 % CO₂. Zestaw do testu proliferacji komórek MTS (kolorymetryczny) (Abcam) został użyty zgodnie z zaleceniami producenta, a absorbancję przy 490 nm zmierzono za pomocą spektrometru TECAN SPARK Magellan V2.2 STD (Tecan Group Ltd., Szwajcaria).

4. Wyniki

4.1 Aktywność przeciwbakteryjna dendrymerów

4.1.1 Ocena wzrostu bakterii metodą pomiaru gęstości optycznej (OD₆₀₀)

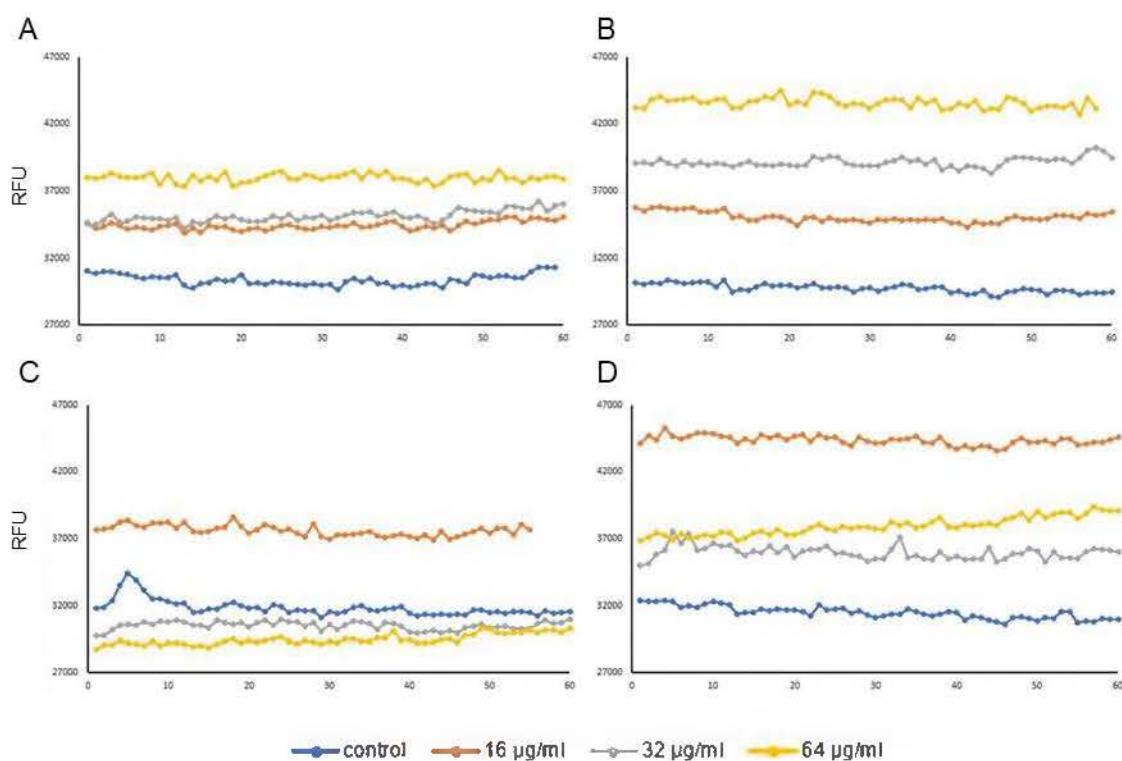
W pierwszym etapie badań, w celu określenia minimalnego stężenia hamującego (ang. *minimum inhibitory concentration* MIC) zastosowano serię stężeń dendrymerów przeciwko szczepom *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Do tego wykonano badanie gęstości optycznej OD₆₀₀ wzrostu bakterii w obecności dendrymerów, którego wyniki badanej absorbancji przedstawiono na Rycinie 11. W przypadku dendrymerów Dend, DendAg oraz DendAgCh zahamowanie wzrostu bakterii zaobserwowano przy stężeniach 32 µg/mL, 64 µg/mL i 128 µg/mL. Nieznaczny wzrost OD₆₀₀ w przypadku 128 µg/mL może również wynikać z agregacji dendrymerów i bakterii. Natomiast w przypadku zastosowania DendCh nie zaobserwowano zahamowania wzrostu bakterii (Rycina 11).



Rycina 11 Gęstość optyczna (OD₆₀₀) wzrostu bakterii w obecności rosnących stężeń dendrymerów mierzona przy długości fali 600 nm po 24 godzinnej inkubacji.

4.1.2 Oznaczenie zdolności dendrymerów do permeabilizacji błony zewnętrznej (test fluorescencyjny NPN)

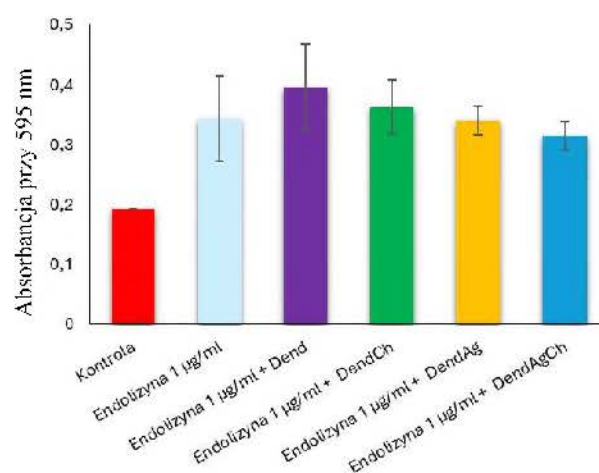
Aby określić właściwości destabilizujące błonę zewnętrzną przez dendrymery przeprowadzono badanie permeabilizacji przy użyciu barwnika fluorescencyjnego 1- N- fenyloalaniny (NPN) przy stężeniach dendrymerów 16, 32 i 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. W przypadku dendrymerów fluorescencja rosła w każdym zastosowanym stężeniu, z niewielką różnicą między 16 a 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Rycina 12A). Z ryciny wynika, iż idealnym permeabilizatorem jest DendCh, gdyż poziom RFU rósł w przypadku wzrostu stężenia (Rycina 12B), natomiast zastosowanie DendAg (Rycina 12C) spowodowało wzrost fluorescencji barwnika NPN jedynie w stężeniu 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a pozostałe były poniżej wartości kontrolnej. W przypadku DendAgCh wszystkie stężenia prowadziły do wzrostu fluorescencji, chociaż największy efekt zaobserwowano przy najniższym stężeniu (Rycina 12D), co może być skutkiem agregacji dendrymerów.



Rycina 12 Permeabilizacja zewnętrznej błony bakteryjnej przez wybrane stężenia dendrymerów. (A) Dend (B) DendCh, (C) DendAg, (D) DendAgCh. RFU - względne jednostki fluorescencji (ang. *Relative Fluorescence Units*).

4.1.3 Ocena zdolności endolizyny do degradacji peptydoglikanu w obecności dendrymerów – test *Remazol Brilliant Blue*

Aktywność enzymatyczną endolizyny w obecności dendrymerów mierzono za pomocą testu degradacji peptydoglikanu *Remazol Brilliant Blue* (Rycina 13). Wyniki wskazują, że aktywność degradacyjna peptydoglikanu przez endolizynę nie została zmniejszona, a nawet obserwuje się wzrost degradacji PG w przypadku dodatkowej obecności każdego z dendrymerów.



Rycina 13 Degradacja peptydoglikanu przez endolizynę w obecności dendrymerów mierzona przy długości fali 595 nm.

4.2 Interakcje pomiędzy dendrymerami a endolizyną

4.2.1 Określenie parametrów termodynamicznych kompleksowania dendrymerów z endolizyną

Tabela 1 Parametry termodynamiczne dendrymerów z endolizyną.

T (K)	Kb (L/mol)	ΔH_0 (kJ/mol)	ΔG_0 (kJ/mol)	ΔS (J/mol)	Ksv (10^4 mol/L)	Kb (L/mol)	ΔH_0 (kJ/mol)	ΔG_0 (kJ/mol)	ΔS (J/mol)	Ksv (10^4 mol/L)
Dend + Endolizyna					DendAg + Endolizyna					
298	0,00003		16,51		0,12	24745714		-53,766		4,6
301	2,739		7,338		0,56	322100000		-48,954		4,8
304	10,75	927,82	-1,836	3058,08	0,91	4707604	-531,707	-44,143	-1603	4,7
307	5,304		-11,01		1,65	109647		-39,331		4,7
310	510,15		-20,18		2,17	398107		-3452		4,6
DendCh + Endolizyna					DendAgCh + Endolizyna					
298	1088,178		-16,002		15,34	10909		-22,345		6,4
301	188,148		-14,745		7,21	974		-21,697		5,8
304	161,324	-140,85	-13,488	-418,94	6,97	553	-86,731	-21,049	-216	5,7
307	168,616		-12,231		7,01	19538		-20,401		5,7
310	74,079		-10,974		7,35	446		-19,753		5,6

Typ interakcji między fluoroforem (endolizyna) a wygaszczaczem (dendrymer) można rozróżnić analizą Sterna-Volmera. Siła oddziaływań zależy również od temperatury: szybsza dyfuzja wygaszacza w wyższej temperaturze wskazuje na słabe oddziaływania (wygaszanie dynamiczne), natomiast wolniejsza – na wygaszanie statyczne, gdzie możliwe jest tworzenie stabilnego kompleksu w stanie podstawowym. Interakcje dendrymerów z białkami najczęściej wynikają z mechanizmu statycznego. Jednak na typ interakcji mogą wpływać m.in. stężenie dendrymeru, stosunek molowy, modyfikacje powierzchni dendrymeru oraz typ białka (różne punkty izoelektryczne). Krzywe F_0/F w różnych temperaturach (od 298 do 310 K) dla każdej interakcji białko- dendrymer wykazują tendencję spadkową i wzrostową, co może sugerować statyczny lub mieszany (statyczny i dynamiczny) mechanizm wygaszania fluorescencji.

Określono charakter oddziaływań między dendrymerami Dend, DendCh, DendAg, DendAgCh a endolizyną CHAP. Najpierw zmierzono wewnętrzne wygaszanie fluorescencji endolizyny w temperaturze 298 K. Zwiększenie stężenia dendrymerów spowodowało spadek fluorescencji endolizyny. Można zaobserwować, że w przypadku Dend i DendAg wygaszanie fluorescencji jest bardziej płynne niż w przypadku DendCh i DendAgCh. Wyniki te sugerują, że do całkowitego wygaszenia fluorescencji wewnętrznej białka konieczne są wyższe stężenia

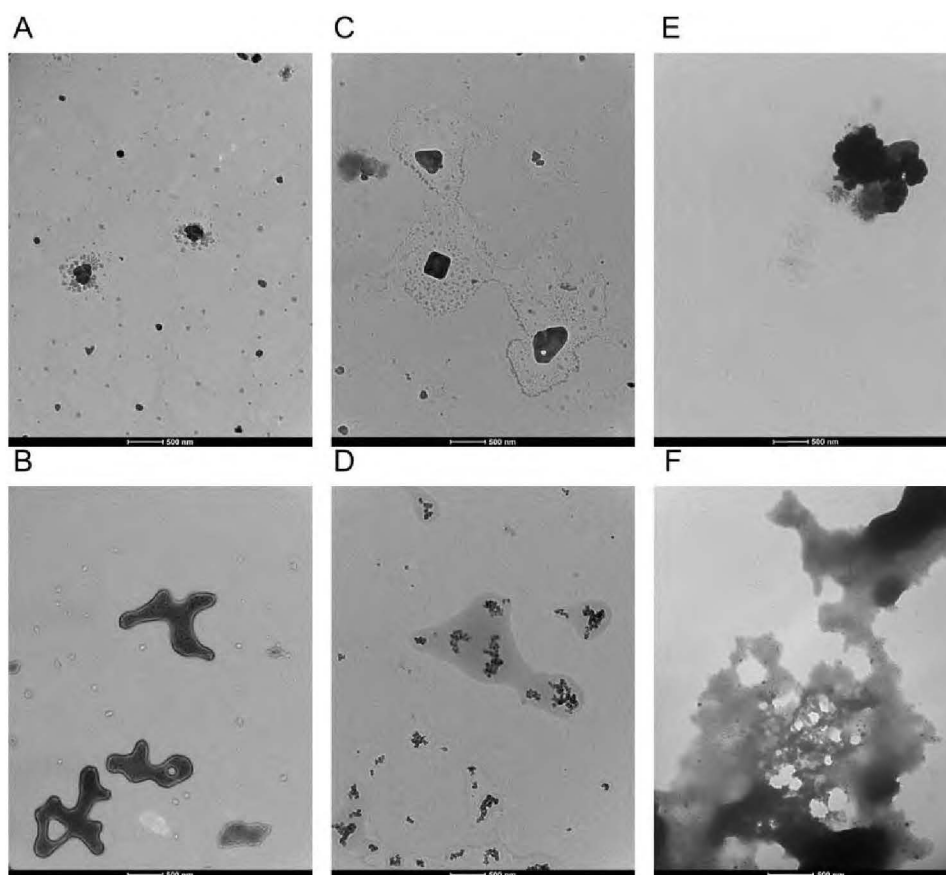
dendrymerów z grupą pirydylową. Aby opisać charakter oddziaływania między dendrymerami a endolizyną, obliczono stałą Sterna-Vomera (K_{sv}) i parametry termodynamiczne w różnych temperaturach (Tabela 1). W pH 7,4 metalodendrymery Dend i DendAg były neutralne, natomiast DendCh i DendAgCh był naładowany dodatnio z powodu grupy pirydylowej. W przeciwieństwie do większości dodatnio naładowanych białek endolizynowych, domena CHAP endolizyny jest ujemnie naładowana. Analiza termodynamiczna wykazała spadek K_{sv} dla trzech dendrymerów, chociaż dla DendCh uzyskano wyższe stałe. W przypadku DendAgCh K_{sv} spadło z 6,4 do $5,6 \times 10^4$ mol/L wraz ze wzrostem temperatury. W przypadku DendAg K_{sv} jest mniej więcej stabilne na poziomie $4,6\text{--}4,8 \times 10^4$ mol/L. Natomiast dla dendrymeru Dend obserwowano wzrost K_{sv} z wartości 0,12 do $2,17 \times 10^4$ mol/L, a DendCh obserwowano spadek z 15,34 do $7,35 \times 10^4$ mol/L.

Typ interakcji między białkami a dendrymerami można analizować także termodynamicznie. Proces wiązania śledzono metodą Van't Hoffa. Siła wiązania może zależeć nie tylko od rodzaju białka (zwłaszcza jego pI), lecz także od modyfikacji powierzchni dendrymeru. Ładunek białka powinien determinować typ oddziaływań termodynamicznych, a zmiany ΔG_0 , ΔH_0 i ΔS powinny być łatwo obserwowalne. Uzyskane wyniki sugerują głównie oddziaływania elektrostatyczne między dendrymerami a białkiem oraz wygaszanie statyczne. Parametry termodynamiczne również wykazały, że w przypadku dendrymerów z jonami srebra oraz z grupą pirydylową oddziaływanie było egzotermiczne i spontaniczne w niskich temperaturach (ΔH_0 , ΔG_0 i ΔS były ujemne), a w przypadku Dend endotermiczne i spontaniczne w wysokich temperaturach (ΔH_0 i ΔS były dodatnie). Analiza powinowactwa (K_b) wykazała, że DendAg wykazywał większe powinowactwo do endolizyn niż Dend, DendCh i DendAgCh. Było to prawdopodobnie spowodowane zdolnością protonowania jednostki pirydylowej w DendCh i DendAgCh w stosunku do podstawnika metylowego liganda NHC w DendAg.

4.2.2 Analiza morfologii dendrymerów oraz ich kompleksów z endolizyną

Ponieważ w badaniu gęstości optycznej (pkt. 4.3.1) wykazano, iż dendrymer imidazolowy „Dend” nie wykazał zwiększonych właściwości antybakteryjnych przy dodatkowej obecności endolizyny zdecydowano o pominięciu go w kolejnych eksperymentach.

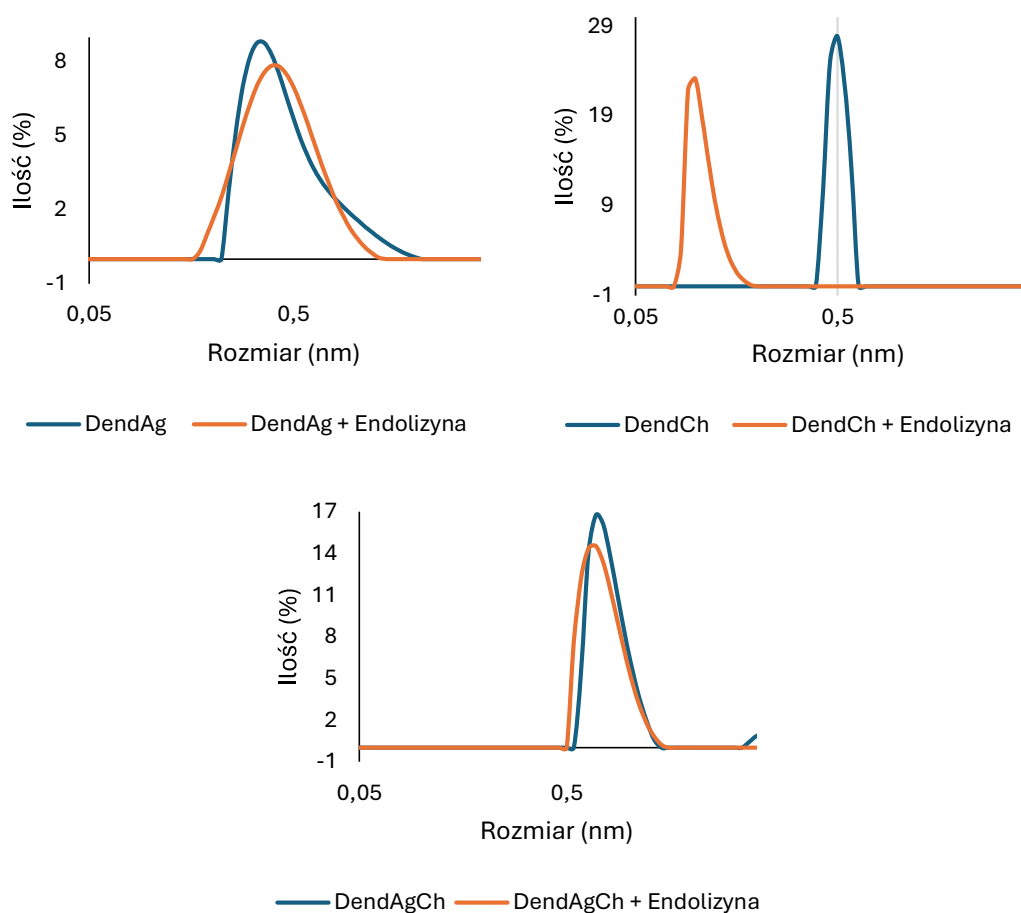
Morfologię dendrymerów DendCh, DendAg i DendAgCh zbadano za pomocą TEM (Rycina 14). W każdym przypadku technika ta wykazała znaczną agregację wynikającą z ich odpowiedniej hydrofobowości, o rozmiarach około 200 – 300 nm. Dodatkowo przeprowadzono analizę morfologiczną dendrymerów w obecności endolizyny. Uzyskane wyniki wskazują na znaczną agregację związków.



Rycina 14 Morfologia dendrymerów i w połączeniu z endolizyną w obrazie transmisyjnej mikroskopii elektronowej. (A) DendCh, (B) DendCh + endolizyna, (C) DendAg, (D) DendAg + endolizyna, (E) DendAgCh, (F) DendAgCh + endolizyna (skala 500 nm).

4.2.3 Pomiar wielkości cząstek i stopnia agregacji dendrymerów oraz ich kompleksów z endolizyną (DLS)

Metoda dynamicznego rozpraszania światła (DLS) również wykazała tworzenie się dużych agregatów dendrymerów, o mniejszym rozmiarze dla DendAg (D_h około 350 nm) niż dla DendAgCh (D_h około 800 nm) (Rycina 15). Różnicę tę można przypisać większej zdolności do oddziaływania z otoczeniem grupy pirydylowej w DendAgCh w porównaniu z prostą grupą metylową w ligandzie NHC DendAg. Dane te potwierdziły agregację ze względu na małe wartości stwierdzone dla tych dendrymerów w eksperymentach DOSY NMR, przeprowadzonych w ramach współpracy przez zespół naukowy profesora Javiera Sanchez-Nieves z Uniwersytetu Alcalá. Natomiast dla DendCh wykazano tworzenie się agregatów o pośrednim rozmiarze (D_h około 500 nm). Z kolei obecność endolizyny nie powodowała zmian w wielkości agregatów w przypadku DendAg i DenAgCh, jedynie efekt był widoczny dla DendCh, gdzie kompleks DendCh-endolizyna tworzył agregaty o rozmiarze D_h około 100 nm.

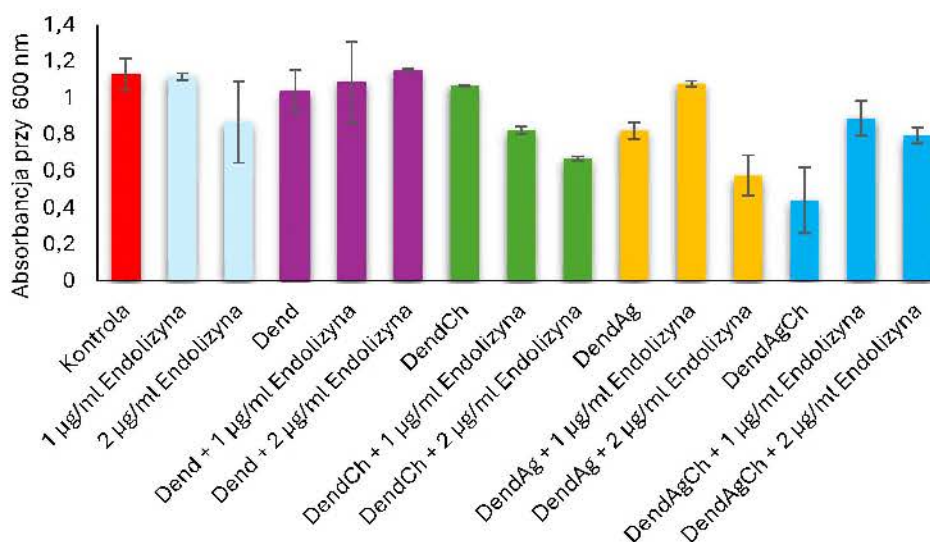


Rycina 15 Procentowy udział wielkości dendrymerów i w połączeniu z endolizyną w badanych próbach.

4.3 Analiza właściwości przeciwbakteryjnych dendrymerów i endolizyny

4.3.1 Ocena efektu synergistycznego kompleksów dendrymer–endolizyna w hamowaniu wzrostu bakterii (OD₆₀₀)

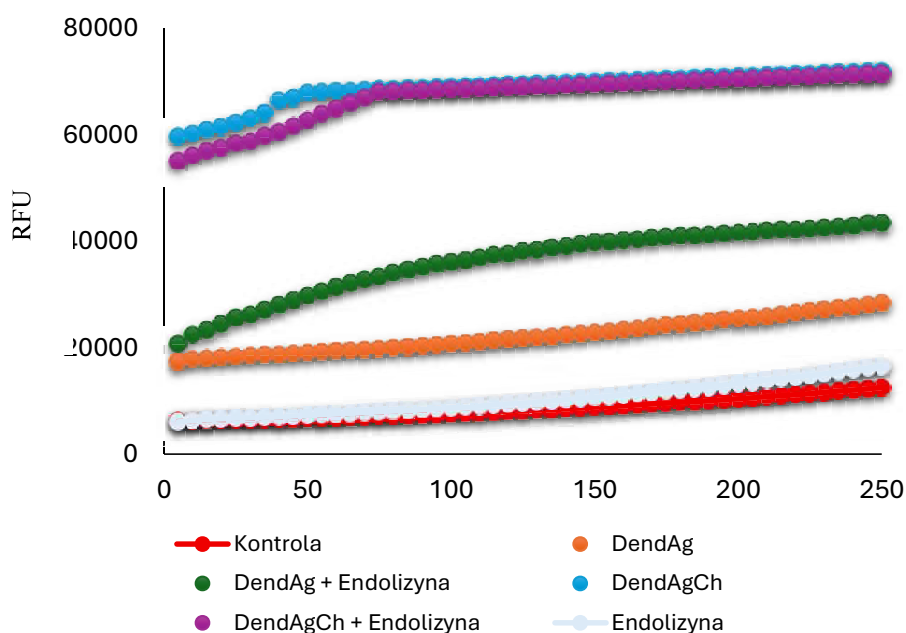
Przetestowano synergistyczne działanie przeciwbakteryjne kompleksu dendrymer-endolizyna (Rycina 16). Pomiary gęstości optycznej planktonicznych bakterii *P. aeruginosa* PAO1 przeprowadzono zarówno w obecności, jak i przy braku endolizyny. Stężenie dendrymerów wynosiło 32 µg/ml., a endolizyny odpowiednio 1 i 2 µg/ml.. Zaobserwowano synergistyczne działanie kompleksów endolizyny (w wyższych stężeniach białka) z dendrymerami DendCh, DendAg i DendAgCh, przy czym zmniejszenie OD₆₀₀ wyniosło do 50 % dla DendCh i DendAg oraz około 70 % dla DendAgCh; nie zaobserwowano znaczącego synergicznego działania przy niższym stężeniu endolizyny (1 µg/mL). Natomiast nie zaobserwowano żadnego dodatkowego efektu w przypadku dendrymeru metyloimidazolowego – Dend. Wyniki te wyraźnie sugerują, że dendrymery DendCh i DendAg muszą zmieniać płynność i przepuszczalność błony, ułatwiając przenikanie białka przeciwbakteryjnego. W rezultacie endolizyna przenika przez błonę zewnętrzną i dociera do peptydoglikanu, zwiększając w ten sposób aktywność przeciwbakteryjną.



Rycina 16 Gęstość optyczna (OD₆₀₀) wzrostu bakterii w obecności stężeń dendrymerów (32 µg/mL) wraz z endolizyną (1 i 2 µg/mL) mierzona przy 600 nm po 24 godzinnej inkubacji.

4.3.2 Oznaczenie produkcji reaktywnych form tlenu (RFT/ROS) przez bakterie w obecności dendrymerów i endolizyny

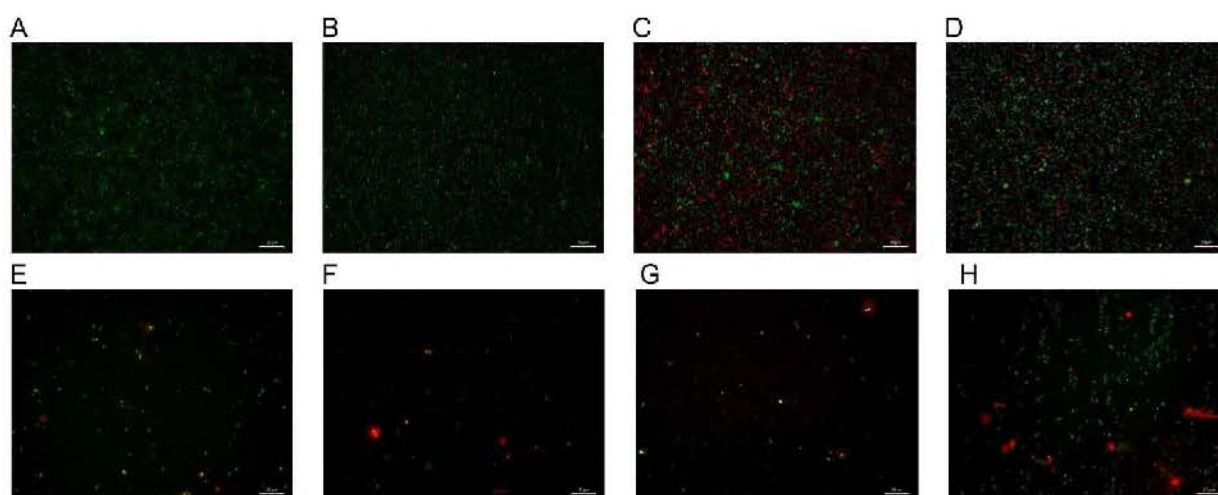
Kolejnym krokiem było określenie produkcji reaktywnych form tlenu przez metalodendrymery zawierające jony srebra – DendAg i DendAgCh i w kompleksie z endolizyną, o stężeniu końcowym dendrymerów 32 $\mu\text{g/mL}$ i 2 $\mu\text{g/mL}$ endolizyny (Rycina 17). Można zauważyć, że oba dendrymery generowały większą ilość reaktywnych form tlenu niż w przypadku grupy kontrolnej oraz po dodaniu samej endolizyny. Jednak w przypadku DendAg poziom RFT był niższy niż w DendAgCh, ale wzrósł po połączeniu z endolizyną, chociaż nadal był niższy niż poziom obserwowany dla DendAgCh. Natomiast dodanie endolizyny do DendAgCh nie zmieniło poziomu ROS.



Rycina 17 Produkcja reaktywnych form tlenu przez bakterie w obecności dendrymerów (32 $\mu\text{g/mL}$) i endolizyny (2 $\mu\text{g/mL}$). RFU - względne jednostki fluorescencji (ang. *Relative Fluorescence Units*).

4.3.3 Analiza żywotności komórek bakteryjnych po działaniu dendrymerów i endolizyny (LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit)

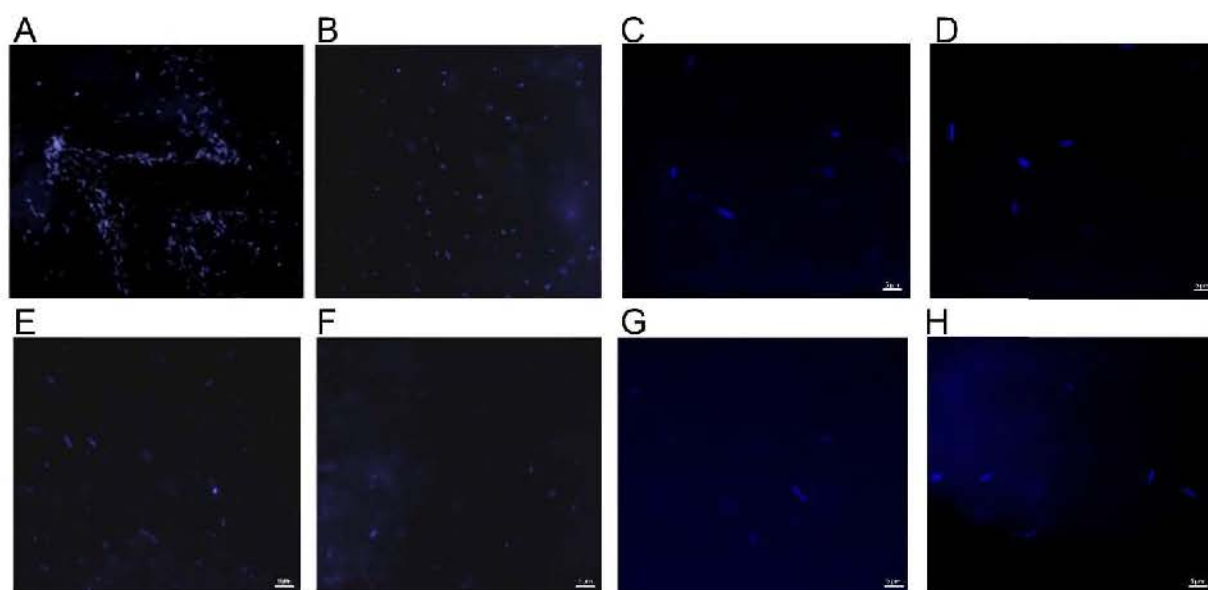
W celu zobrazowania żywych i martwych bakterii *P. aeruginosa* PAO1 po traktowaniu dendrymerami oraz endolizyną (stężenie dendrymerów 32 µg/mL i 1 µg/mL endolizyny), wykonano test LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit. Obrazy z mikroskopii fluorescencyjnej (Rycina 18) pokazują dużą liczbę żywych bakterii w grupie kontrolnej (Rycina 18A) i znacznie mniejszą w obecności DendCh (ryc. 18C i 18D – z endolizyną), DendAg (ryc. 18E i 18F – z endolizyną) i DendAgCh (ryc. 18G i 18H – z endolizyną) i endolizyny (ryc. 18B). Dodanie endolizyny prowadzi do zmniejszenia liczby żywych bakterii (zielone) i wzrostu liczby martwych bakterii (czerwone).



Rycina 18 Fluorescencyjne obrazy mikroskopowe z badania LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit bakterii po działaniu dendrymerów i endolizyny. (A) Grupa kontrolna, (B) Endolizyna, (C) DendCh, (D) DendCh + Endolizyna, (E) DendAg, (F) DendAg + Endolizyna, (G) DendAgCh, (H) DendAgCh + Endolizyna (stężenie dendrymerów 32 µg/mL i 1 µg/mL endolizyny). Skala 20 µm.

4.3.4 Obserwacja degradacji peptydoglikanu w bakteriach po zastosowaniu dendrymerów i endolizyny (HADA)

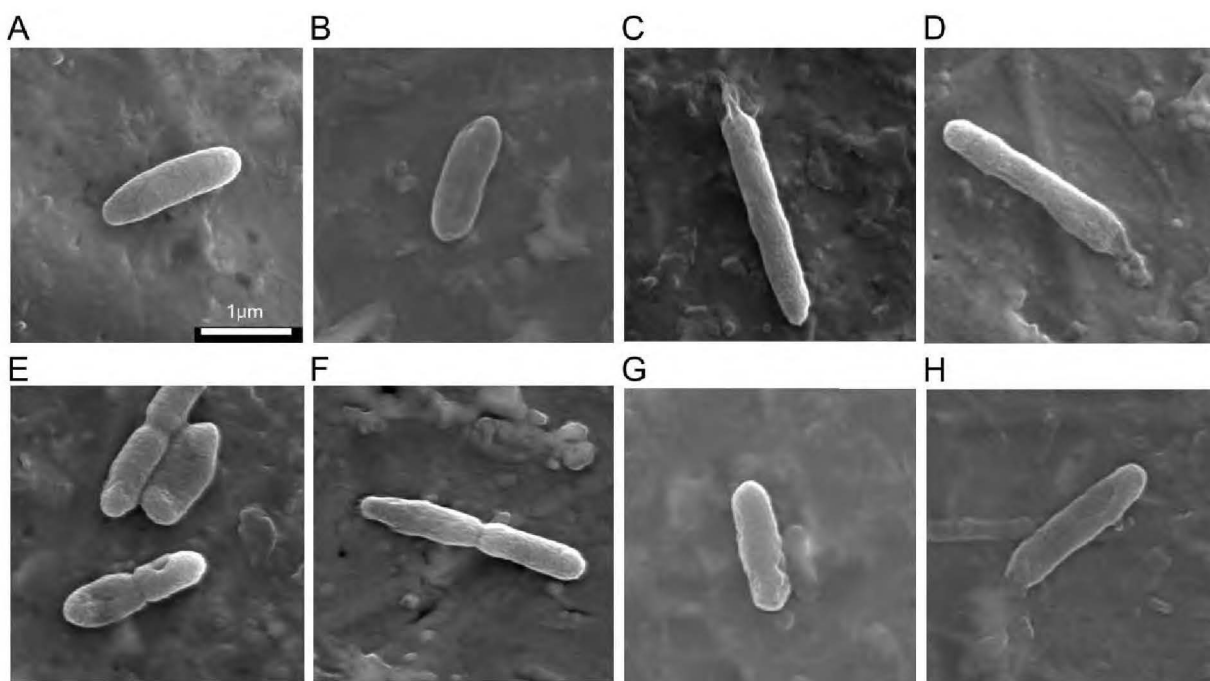
Następnie wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną do obserwacji degradacji PG w bakteriach. Bakterie, których peptydoglikan został wyznakowany barwnikiem HADA (Rycina 19) poddano działaniu endolizyny (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny) (ryc. 19B) i dendrymerów o stężeniu 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendCh (ryc. 19C), kompleksu DendCh-endolizyna (ryc. 17D), DendAg (ryc. 19E), kompleksu DendAg-endolizyna (ryc. 19F), DendAgCh (ryc. 19G) oraz kompleksu DendAgCh-endolizyna (ryc. 19H). W przypadku każdego kompleksu dendrymer/endolizyna zaobserwowano nieostry sygnał fluorescencyjny, wskazujący na degradację PG.



Rycina 19 Fluorescencyjne obrazy mikroskopowe z badania HADA (A) grupa kontrolna, (B) Endolizyna, (C) DendCh, (D) DendCh + Endolizyna, (E) DendAg, (F) DendAg + Endolizyna, (G) DendAgCh, (H) DendAgCh + Endolizyna (stężenie dendrymerów 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny). Skala 5 μm .

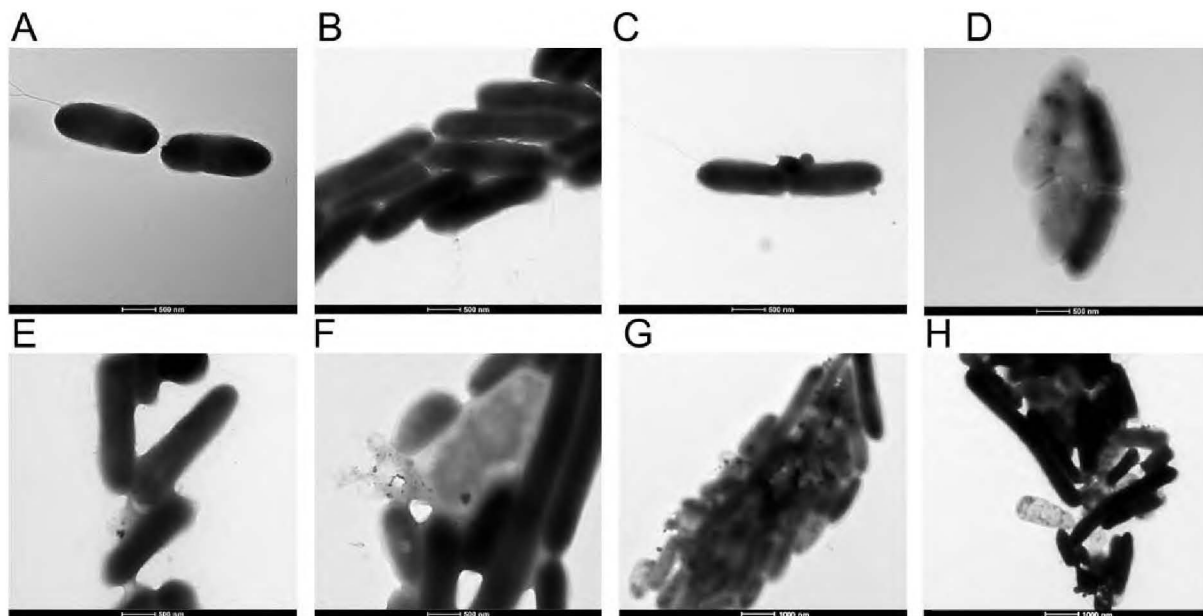
4.3.5 Ocena zmian morfologii komórek bakteryjnych po działaniu dendrymerów i endolizyny (SEM i TEM)

Do obserwacji morfologii komórek bakteryjnych traktowanych dendrymerami i kompleksem dendrymer–endolizyna (stężenie dendrymerów 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dla endolizyny) wykorzystano mikroskopię SEM (Rycina 20) oraz TEM (Rycina 21). Biorąc pod uwagę, że tworzenie porów w zewnętrznej błonie bakterii jest najczęstszą drogą eliminacji bakterii Gram-ujemnych, przeprowadzono badanie mikroskopem SEM w celu oceny, czy dendrymery wykazują podobne mechanizmy działania. Na rycinie 20A przedstawiono reprezentatywną nieuszkodzoną komórkę bakteryjną *P. aeruginosa*. Rycina 20B przedstawia bakterie po działaniu endolizyny z niewielką nieregularnością błony po traktowaniu dendrymerem DendCh oraz kompleksem z endolizyną. Zauważono uszkodzenia błony, które spowodowały wypłynięcie się zawartości komórki (ryc. 20C i 20D). Natomiast po zastosowaniu DendAg (ryc. 20E) i DendAg z endolizyną (ryc. 20F), a także DendAgCh (ryc. 20G) oraz DendAgCh z endolizyną (ryc. 20H) obserwowano liczne pory wraz ze znaczną nieregularnością w strukturze błony zewnętrznej i ściany komórkowej.



Rycina 20 Obrazy SEM morfologii bakterii. (A) grupa kontrolna, (B) Endolizyna, (C) DendCh, (D) DendCh + Endolizyna, (E) DendAg, (F) DendAg + Endolizyna, (G) DendAgCh, (H) DendAgCh + Endolizyna (stężenie dendrymerów 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny). Skala 1 μm .

Natomiast w analizie TEM można zaobserwować agregację komórek bakteryjnych w obecności kompleksów endolizyna/dendrymer.



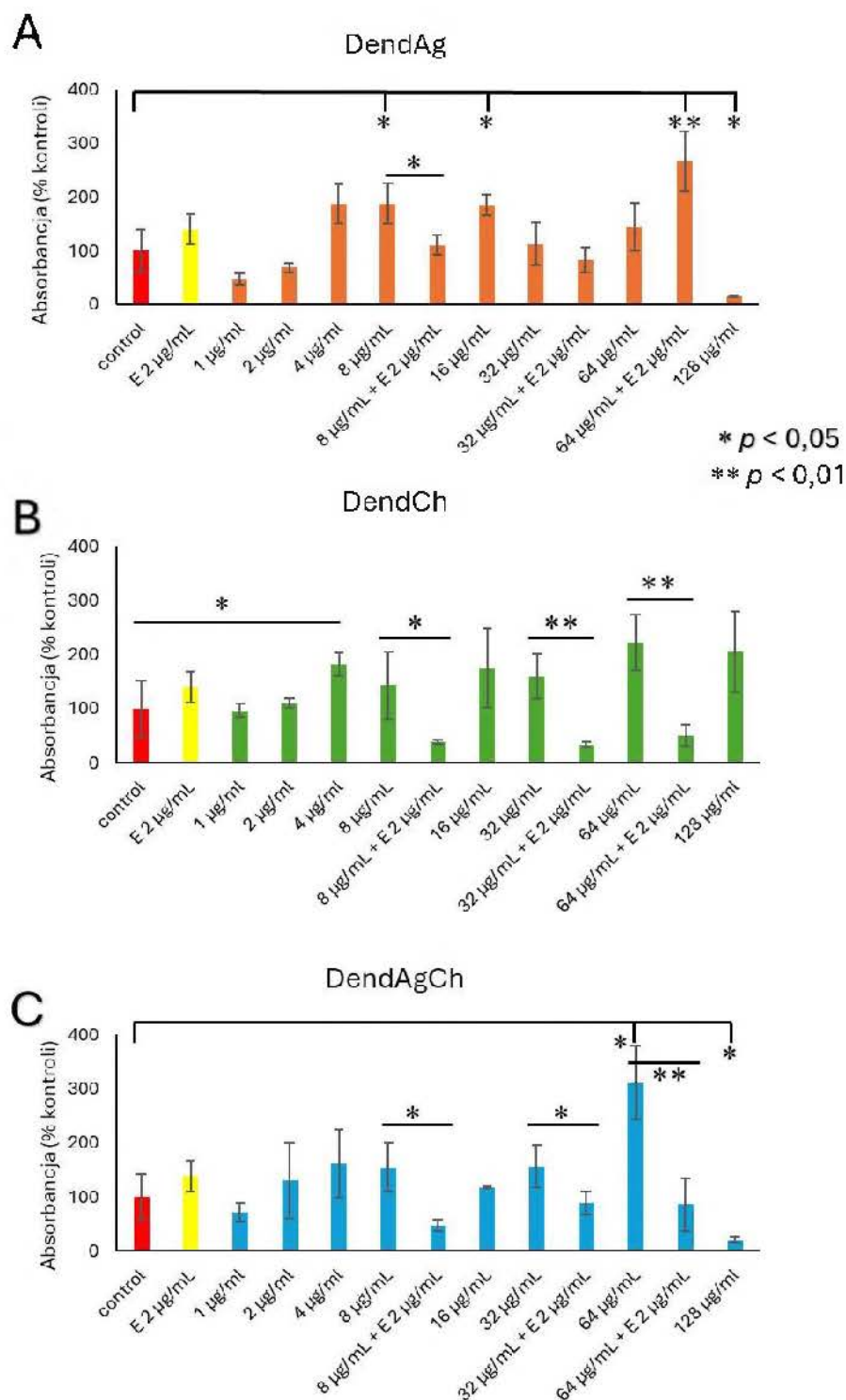
Rycina 21 Obrazy TEM morfologii bakterii po działaniu dendrymerów i endolizyny. (A) grupa kontrolna, (B) Endolizyna, (C) DendCh, (D) DendCh + Endolizyna, (E) DendAg, (F) DendAg + Endolizyna, (G) DendAgCh, (H) DendAgCh + Endolizyna (stężenie dendrymerów 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny). Skala 500 nm oraz 1000 nm.

4.4 Analiza wpływu dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną na tworzenie biofilmu bakteryjnego w badaniach *in vitro*

4.4.1 Oznaczenie ilości biofilmu za pomocą barwienia fioletem krystalicznym

Rycina 22 przedstawia wpływ badanych dendrymerów na dojrzały biofilm bakterii *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 po 24 godzinach inkubacji przy różnych stężeniach dendrymerów. W każdym z trzech analizowanych układów zaobserwowano zależność między stężeniem dendrymeru a stopniem formowania biofilmu. W przypadku samego DendAg (Rycina 22A) żadne ze stosowanych stężeń nie spowodowało zmniejszenia wielkości biofilmu, a nawet zaobserwowano wzrost jego ilości, ze średnią wartością ~ 133 % kontroli. Jedynie najwyższe stężenie dendrymerów, 128 µg/mL, spowodowało całkowitą degradację biofilmu (~ 14 %). Podobnie dodanie endolizyny w wybranych stężeniach, 8, 32 i 64 µg/mL, nie spowodowało znaczącej degradacji biofilmu (~ 133 %).

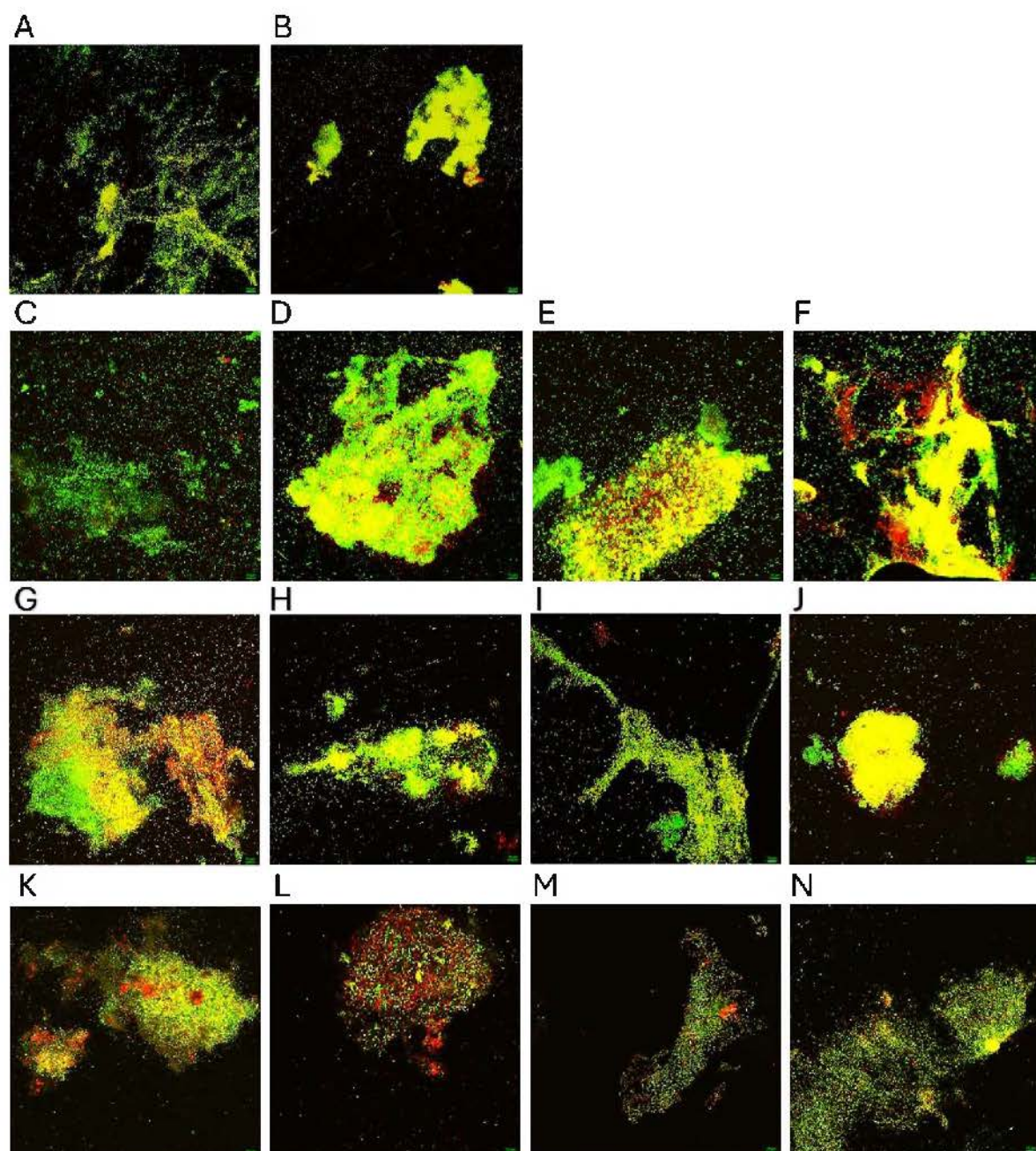
W przypadku zastosowania samego dendrymeru DendCh (Rycina 22B) nie zaobserwowano zmniejszenia ilości biofilmu, natomiast we wszystkich badanych stężeniach odnotowano wzrost jego masy, osiągając średnio ~ 161 % wartości kontrolnej. Jednak dodanie endolizyny do dendrymeru DendCh w stężeniach 8, 32 i 64 µg/mL spowodowało znaczny spadek ilości biofilmu, do średniej wartości ~ 40 %. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku dendrymeru DendAgCh (Rycina 22C). Zastosowanie samego dendrymeru nie hamowało tworzenia biofilmu; wręcz przeciwnie, zaobserwowano tendencję wzrostową dla wszystkich badanych stężeń, osiągając średnio ~ 157 %. Natomiast w obecności endolizyny zaobserwowano znaczne zmniejszenie ilości biofilmu, szczególnie przy stężeniu 8 µg/mL, gdzie wartość spadła do około 48 % oraz przy zastosowaniu najwyższego stężenia samego dendrymeru (128 µg/mL), co spowodowało dalsze zmniejszenie ilości biofilmu do około 21 %.



Rycina 22 Hamowanie tworzenia się biofilmu bakteryjnego mierzone jako absorbancję fioletu krystalicznego w obecności rosnących stężeń dendrymerów (A) DendAg, (B) DendCh, (C) DendAgCh oraz w obecności kompleksów dendrymer-endolizyna w wybranych stężeniach na podstawie poprzednich wyników po 24 godzinach inkubacji. Eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako procent kontroli.

4.4.2 Analiza żywotności komórek bakteryjnych w biofilmie (FilmTracer™ LIVE/DEAD™)

Aby potwierdzić zmniejszoną żywotność bakterii w utworzonym biofilmie spowodowaną działaniem dendrymerów i endolizyny, przeprowadzono badanie żywotności bakterii za pomocą testu FilmTracer™ LIVE/DEAD™. Rycina 23A przedstawia nietraktowany biofilm bakteryjny wykorzystany jako kontrolę. Wśród dużej liczby żywych bakterii i niezmienionej struktury biofilmu, pojawia się kilka czerwonych sygnałów. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku biofilmu będącego w obecności endolizyny (ryc. 23B). Wśród biofilmu wykazującego zieloną fluorescencję zaobserwowano większą liczbę czerwonych sygnałów, ale o zmniejszonej gęstości po zastosowaniu 8 µg/mL DendAg w porównaniu z kontrolą (ryc. 23C). Zastosowanie 8 µg/mL DendCh (ryc. 23G) spowodowało wzrost liczby martwych komórek i spadek liczby żywych komórek w biofilmie – dominowały sygnały pomarańczowe i czerwone, z niewielką ilością zielonych. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku 8 µg/mL DendAgCh (ryc. 23K), ale z mniejszą intensywnością martwych komórek. Traktowanie biofilmu bakteryjnego dendrymerami z dodatkową obecnością endolizyny nie wykazuje znaczącego zmniejszenia masy biofilmu (ryc. 23D – 8 µg/mL DendAg + 2 µg/mL endolizyny) obserwowano czerwone sygnały. Rycina 23H przedstawia biofilm bakteryjny po zastosowaniu 8 µg/mL DendCh + 2 µg/mL endolizyny, gdzie obserwuje się zmniejszenie masy, przy czym obecne są niewielkie ilości czerwonych sygnałów. W przypadku 8 µg/mL DendAgCh + 2 µg/mL endolizyny (ryc. 23L) sygnał czerwony dominował nad zielonym, a masa biofilmu uległa zmniejszeniu. Zastosowanie wyższej dawki dendrymerów (32 µg/mL) DendAg (ryc. 20E), DendCh (ryc. 23I) i DendAgCh (ryc. 23M) nie spowodowało znaczącego wzrostu liczby martwych komórek bakteryjnych ani zmniejszenia masy biofilmu w porównaniu z niższą dawką. Ponadto dodatkowa obecność endolizyny w połączeniu z wyższą dawką dendrymerów powoduje wzrost liczby czerwonych sygnałów po zastosowaniu DendAg + 2 µg/mL endolizyny (ryc. 23F), natomiast po zastosowaniu DendCh + 2 µg/mL endolizyny (ryc. 23J) biofilm wydaje się bardziej skondensowany, a w przypadku DendAgCh + 2 µg/mL endolizyny (ryc. 23N) posiada rozrzedzoną strukturę.

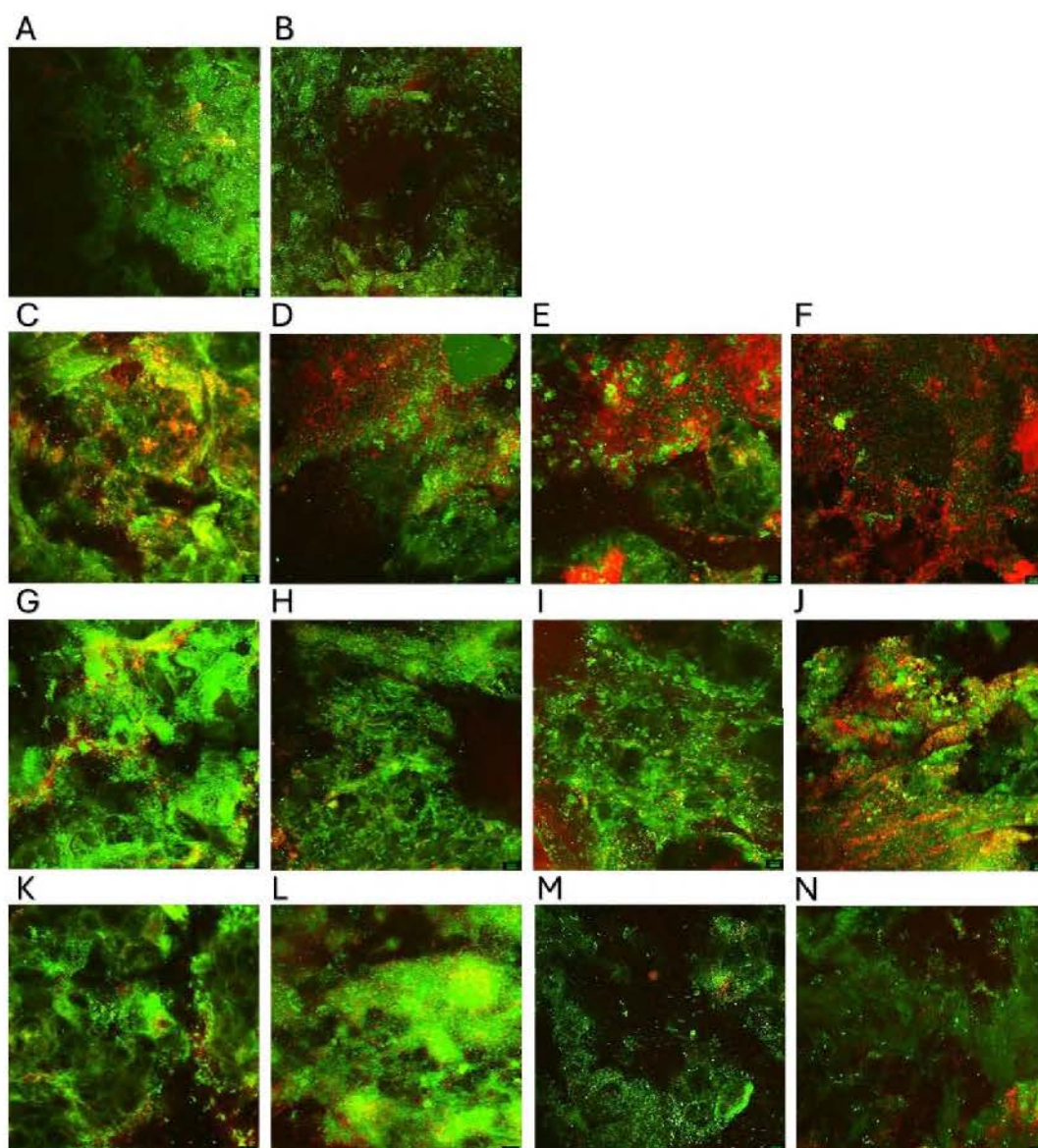


Rycina 23 Wyniki barwienia żywotności biofilmu FilmTracerTM LIVE/DEADTM utworzonego *in vitro* przez *Pseudomonas aeruginosa* PAOI. (A) przedstawia grupę kontrolną niepoddaną działaniu substancji, po 24 godzinach działania (B) endolizyny, (C) 8 µg/mL DendAg, (D) 8 µg/mL DendAg – 2 µg/mL endolizyny, (E) 32 µg/mL DendAg, (F) 32 µg/mL DendAg – 2 µg/mL endolizyny, (G) 8 µg/mL DendCh, (H) 8 µg/mL DendCh + 2 µg/mL endolizyny, (I) 32 µg/mL DendCh, (J) 32 µg/mL DendCh + 2 µg/mL endolizyny, (K) 8 µg/mL DendAgCh, (L) 8 µg/mL DendAgCh + 2 µg/mL endolizyny, (M) 32 µg/mL DendAgCh oraz (N) 32 µg/mL DendAgCh + 2 µg/mL endolizyny. Zielona fluorescencja oznacza żywe komórki bakteryjne, natomiast bakterie z uszkodzoną błoną wykazują czerwoną fluorescencję. Skala wynosi 10 µm.

4.5 Wpływ dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną na biofilm bakteryjny w modelu *ex vivo*

4.5.1 Analiza żywotności komórek bakteryjnych w biofilmie (FilmTracer™ LIVE/DEAD™)

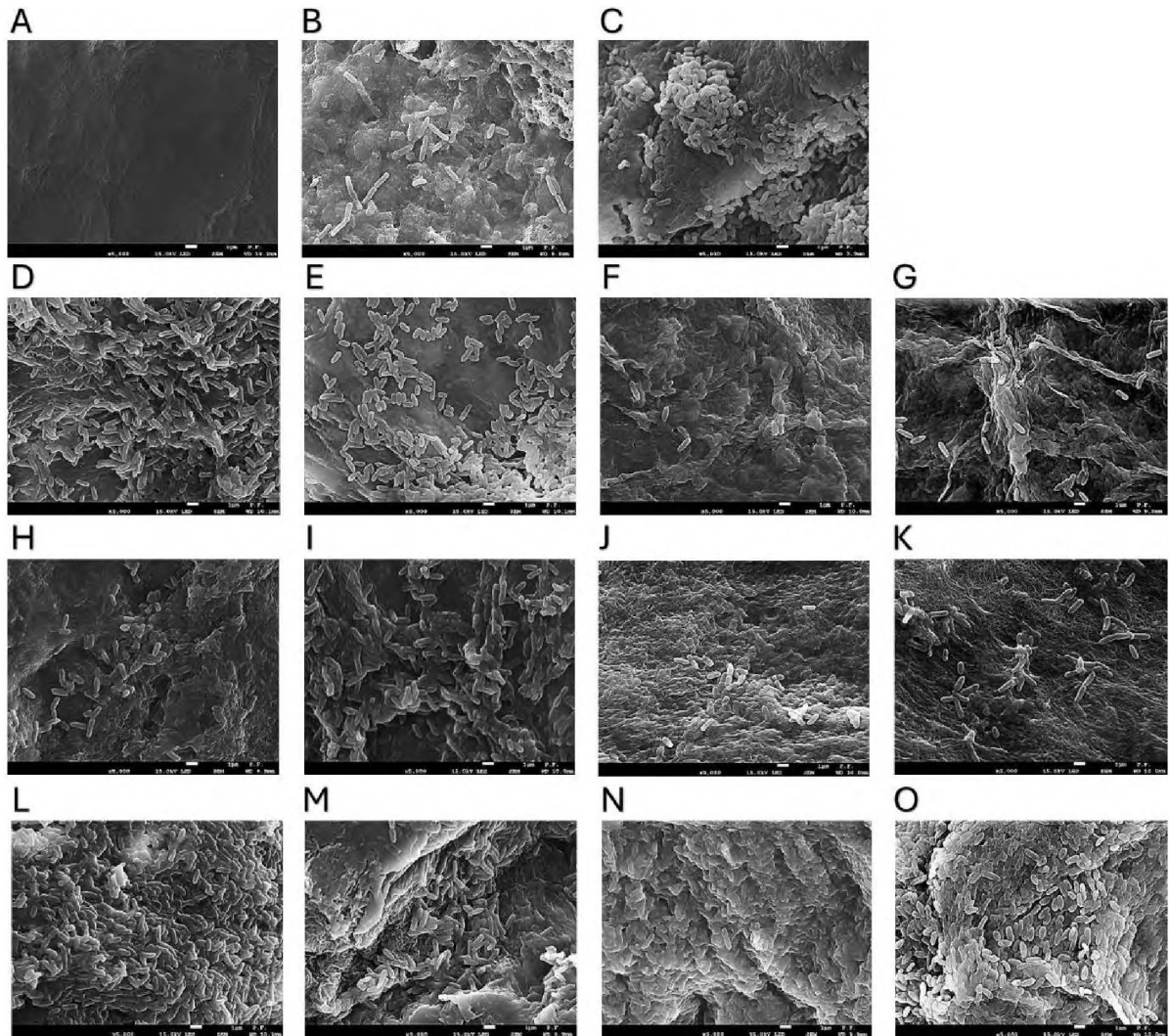
Aby ocenić wpływ dendrymerów, endolizyny oraz kompleksu dendrymer-endolizyna na biofilm *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 imitujący zakażenie skórne, zastosowano model *ex vivo* na kawałkach skóry wieprzowej, które po zakażeniu i traktowaniu dendrymerami poddano barwieniu w celu rozróżnienia żywych i martwych komórek bakteryjnych w biofilmie, a następnie analizowano za pomocą konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego. Wyniki przedstawiono na Rycinie 24. Rycina 24A pokazuje gęsty, niezmieniony biofilm *P. aeruginosa* PAO1 (grupa kontrolna). Po traktowaniu biofilm samą endolizyną (2 µg/mL, ryc. 24B) nie zaobserwowano żadnych znaczących zmian, biofilm charakteryzował się wysoką żywotnością bakterii, porównywalną z grupą kontrolną. Podanie do biofilmu DendAg w stężeniu 8 µg/mL (ryc. 24C) doprowadziło do pojawienia się luk w dolnych warstwach i czerwonymi sygnałami wskazującymi na martwe komórki. Podobne zmiany, z przewagą intensywnej zielonej fluorescencji bakterii powierzchniowych, wraz z miejscowymi czerwonymi sygnałami, zaobserwowano po zastosowaniu DendCh (8 µg/mL, ryc. 24G) i DendAgCh (8 µg/mL, ryc. 24K). Dodanie endolizyny zwiększyło liczbę martwych komórek w biofilmie w połączeniu z DendAg (ryc. 24D) i DendAgCh (ryc. 24L). Zwiększenie stężenia dendrymerów do 32 µg/mL wzmocniło działanie bakteriobójcze i przeciwbiofilmowe. DendAg (ryc. 24E) i DendCh (ryc. 24I) spowodowały znaczny wzrost czerwonych sygnałów, natomiast DendAgCh (ryc. 24M) nieznacznie zwiększył odsetek martwych komórek. Połączenie 32 µg/mL DendAg z endolizyną (ryc. 24F) wykazało najwyższą skuteczność, ponieważ biofilm zawierał wówczas głównie martwe bakterie, a minimalną ilość bakterii żywych. W podobnych warunkach, kompleks DendCh z endolizyną (ryc. 24J) wykazał nieco słabsze działanie, natomiast DendAgCh z endolizyną (ryc. 24N) wykazał umiarkowaną, ale zauważalną poprawę skuteczności w porównaniu z samym dendrymerem.



Rycina 24 Wyniki barwienia żywotności biofilmu FilmTracer™ LIVE/DEAD™ utworzonego *ex vivo* przez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 na skórze wieprzowej. (A) przedstawia grupę kontrolną niepoddaną działaniu środka, po 24 godzinach działania (B) endolizyny. (C) 8 µg/mL DendAg, (D) 8 µg/mL DendAg – 2 µg/mL endolizyny, (E) 32 µg/mL DendAg, (F) 32 µg/mL DendAg + 2 µg/mL endolizyny, (G) 8 µg/mL DendCh, (H) 8 µg/mL DendCh + 2 µg/mL endolizyny, (I) 32 µg/mL DendCh, (J) 32 µg/mL DendCh + 2 µg/mL endolizyny, (K) 8 µg/mL DendAgCh, (L) 8 µg/mL DendAgCh – 2 µg/mL endolizyny, (M) 32 µg/mL DendAgCh oraz (N) 32 µg/mL DendAgCh – 2 µg/mL endolizyny. Zielona fluorescencja oznacza żywe komórki bakteryjne, natomiast bakterie z uszkodzoną błoną wykazują czerwoną fluorescencję. Skala wynosi 10 µm.

4.5.2 Obserwacja morfologii biofilmu i komórek bakteryjnych po działaniu dendrymerów i endolizyny - SEM

Do oceny morfologii biofilmu bakteryjnego po zastosowaniu dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną wykorzystano skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) (Rycina 25). Rycina 25A wykazuje sterylną, niezainfekowaną powierzchnię skóry, określana jako kontrola negatywna. Rycina 25B wykazuje prawidłowo uformowany biofilm i nienaruszoną strukturę komórek bakteryjnych – kontrola pozytywna. Podanie endolizyny w stężeniu 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ryc. 25C) nie spowodowało znaczącej zmiany w ciągłości EPS – matryca pozostała gęsta i falista, a bakterie były widoczne i miały nienaruszoną strukturę. Natomiast traktowanie biofilmu 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAg (ryc. 25D) spowodowało zmianę zwartej struktury EPS – stała się luźniejsza, a bakterie, pomimo bardzo dużej liczby, wykazywały skrócone, nieregularne kształty. Zastosowanie 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendCh (ryc. 25H) spowodowało osłabienie i spłaszczenie matrycy EPS, ze średnią ilością bakterii i ich prawidłowym wyglądem. Niższa dawka DendAgCh (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ryc. 25L) spowodowała powstanie gęstego, falistego EPS i słabo widocznych bakterii. Połączenie DendAg z endolizyną (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAg + 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny, ryc. 25E) spowodowało rozrzedzenie i pękanie EPS. DendCh w stężeniu 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny (ryc. 25I) spowodował powstanie zwartej i gęstej warstwy EPS, w której widoczność bakterii była niska, a ich kształty nieregularne. Dodanie endolizyny do DendAgCh (ryc. 25M) spowodowało rozrzedzenie EPS, ale zwiększyło widoczność bakterii, które zachowały swój nieregularny kształt. Wysoka dawka DendAg (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ryc. 25F) spowodowała powstanie gęstego, warstwowego EPS, z jednocześnie niską widocznością komórek o nieregularnym kształcie. Obecność 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendCh (ryc. 25J) doprowadziła do zaawansowanego zwłóknienia macierzy, niskiej widoczności bakterii i uszkodzenia ściany komórkowej bakterii. Zastosowanie DendAgCh w stężeniu 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ryc. 25N) spowodowało rozrzedzenie EPS i wysoką widoczność komórek. Po działaniu DendAg w połączeniu z endolizyną (ryc. 25G) macierz biofilmu stała się zwarta i pomarszczona, a poziom widoczności komórek bakteryjnych był niski. W przypadku DendCh (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ryc. 25K) w połączeniu z endolizyną, matryca EPS pozostała gęsta, a bakterie były sporadycznie widoczne ze względu na obfite pokrycie. Wreszcie kompleks DendAgCh z endolizyną (ryc. 25O) doprowadził do rozrzedzenia macierzy i wzrostu liczby uszkodzonych komórek, które wykazywały liczne defekty ściany komórkowej.

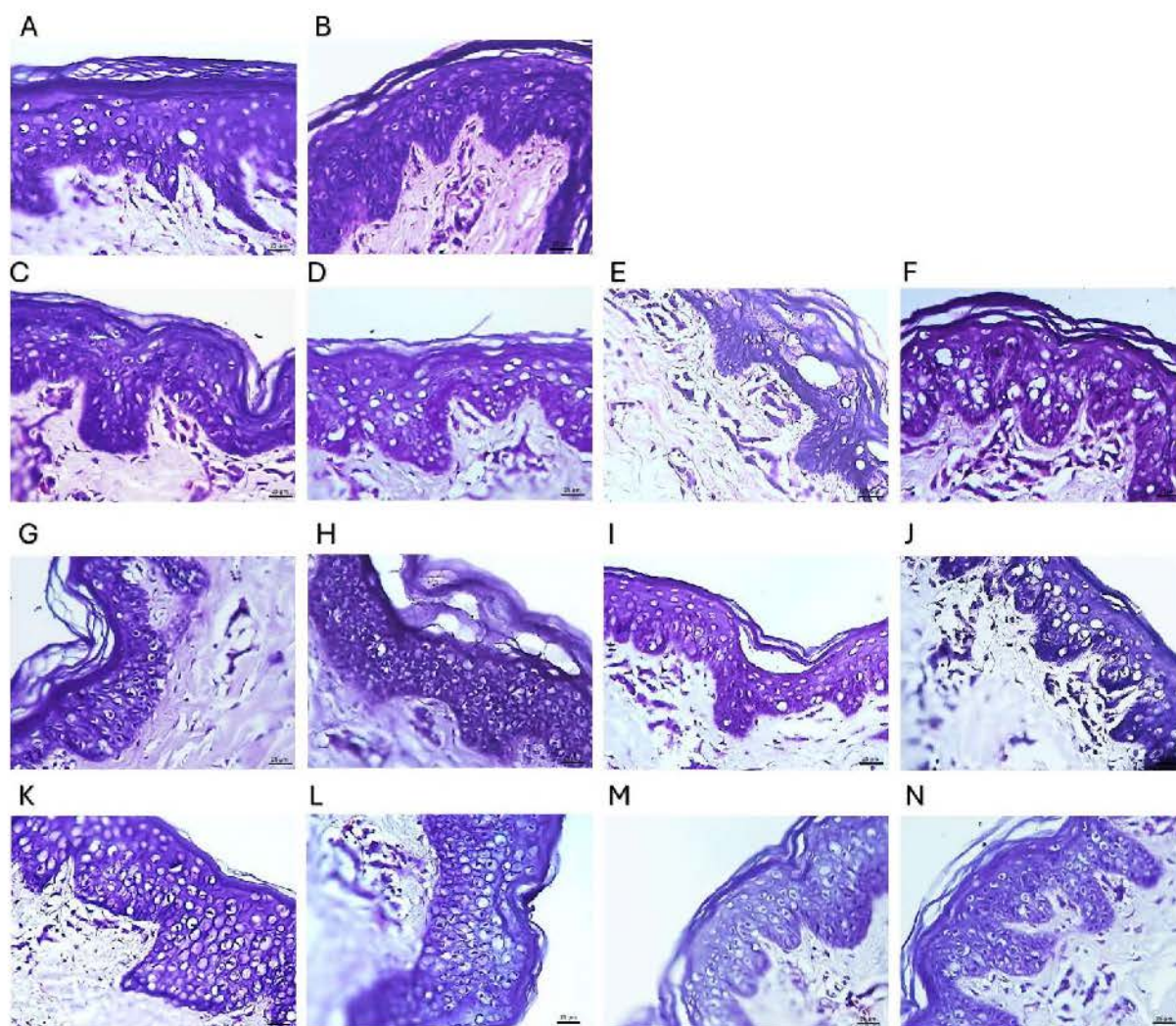


Rycina 25 Obrazy SEM przedstawiają morfologię biofilmu bakteryjnego utworzonego przez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 na skórze wieprzowej. (A) przedstawia skórę niezainfekowaną (grupa kontrolna negatywna), (B) prawidłowy biofilm bakteryjny (grupa kontrolna pozytywna), (C) po 24 godzinach poddania działaniu endolizyny, (D) po działaniu 8 µg/mL DendAg, (E) 8 µg/mL DendAg + 2 µg/mL endolizyny, (F) 32 µg/mL DendAg, (G) 32 µg/mL DendAg + 2 µg/mL endolizyny, (H) 8 µg/mL DendCh, (I) 8 µg/mL DendCh + 2 µg/mL endolizyny, (J) 32 µg/mL DendCh, (K) 32 µg/mL DendCh + 2 µg/mL endolizyny, (L) 8 µg/mL DendAgCh, (M) 8 µg/mL DendAgCh + 2 µg/mL endolizyny, (N) 32 µg/mL DendAgCh oraz (O) 32 µg/mL DendAgCh + 2 µg/mL endolizyny. Skala wynosi 1 µm.

4.5.3 Ocena wpływu dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną na histomorfologię skóry niezakażonej i zakażonej *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

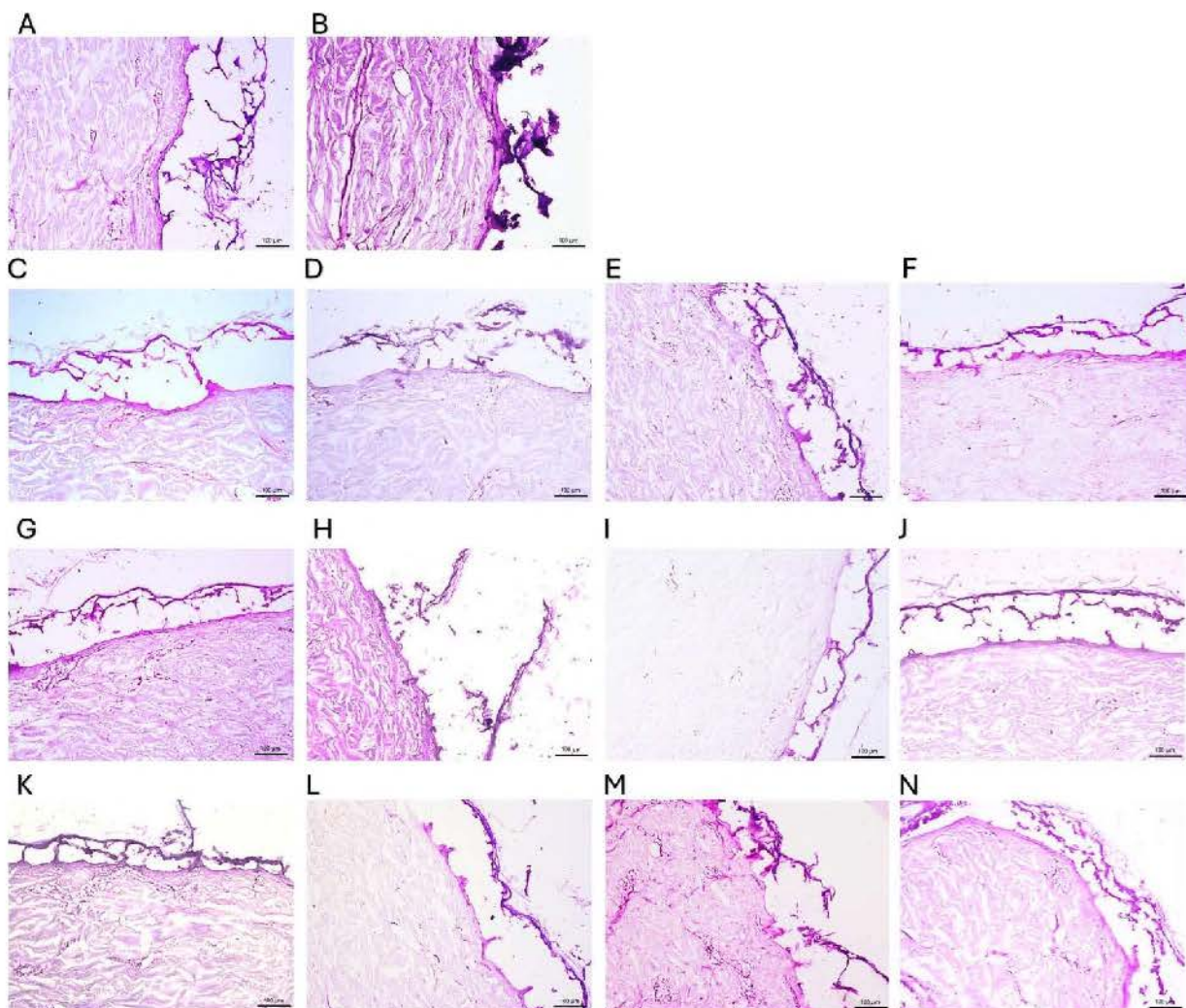
Wpływ poszczególnych wariantów dendrymerów i endolizyny na struktury tkanki skóry *ex vivo*, wykazujący zmiany w warstwie rogowej naskórka (SC), warstwie jasnej (SL), warstwie ziarnistej (SG), warstwie kolczystej (SS), warstwie podstawowej (SB) i skórze właściwej (D), przedstawiono na Rycinie 26, a szczegółowy opis warstw tkanki na Rycinie 28. W grupie kontrolnej (ryc. 24A) oraz po zastosowaniu endolizyny (2 µg/mL) (ryc. 26B) cała struktura skóry pozostała nienaruszona. Traktowanie dendrymerem DendAg (8 µg/mL) (ryc. 26C) spowodowało miejscowe spłaszczenie i ścieranie keratynocytów w warstwie rogowej naskórka, bez znaczących zmian w głębszych warstwach naskórka, a skóra właściwa pozostała nienaruszona. Dodanie endolizyny do DendAg (8 µg/mL + 2 µg/mL) (ryc. 26D) spowodowało również miejscowe spłaszczenie warstwy rogowej naskórka, natomiast w warstwie kolczystej zaobserwowano hipertrofię niektórych komórek. Wyższe stężenie DendAg (32 µg/mL) (ryc. 26E) spowodowało rozszerzenie warstwy rogowej naskórka, zaburzenie ciągłości komórek warstwy kolczystej z warstwą podstawową naskórka, zanik/atrofię komórek warstwy kolczystej, bez zmian w skórze właściwej. Kompleks 32 µg/mL DendAg + 2 µg/mL endolizyny (ryc. 26F) spowodował pogrubienie warstwy rogowej naskórka, hiperplazję i przerost keratynocytów w warstwie kolczystej, przy zachowaniu integralności skóry właściwej. Zaobserwowano znaczny rozrost/hiperplazję warstwy rogowej i warstwy kolczystej, bez znaczących zmian w skórze właściwej po zastosowaniu pirymidyny DendCh w stężeniu 8 µg/mL (ryc. 26G) i jego kompleksu z endolizyną (2 µg/mL) (ryc. 26H). Przy wyższym stężeniu 32 µg/mL DendCh (ryc. 26I) zaobserwowano silne spłaszczenie warstwy rogowej naskórka, z przerwaniem ciągłości między SC a SL, podczas gdy skóra właściwa pozostała niezmienną. W przypadku kompleksu z endolizyną (ryc. 26J) spowodowało to niepełną atrofię warstwy rogowej, a także hiperplazję komórek warstwy kolczystej, przy czym skóra właściwa pozostała nienaruszona. Wprowadzenie pirymidyny DendAgCh (8 µg/mL) (ryc. 26K) doprowadziło do znacznego zaniku warstwy rogowej i silnego rozrostu warstwy kolczystej, podczas gdy skóra właściwa pozostała niezmienną. Kompleks 8 µg/mL DendAgCh + 2 µg/mL endolizyny (ryc. 26L) spowodował takie same zmiany jak w przypadku samego dendrymeru. Zastosowanie wyższego stężenia DendAgCh (32 µg/mL) (ryc. 26M) spowodowało miejscowe zmniejszenie warstwy rogowej, bez znaczących zmian w warstwie kolczystej i skórze właściwej, natomiast dodanie endolizyny (32 µg/mL + 2 µg/mL) (ryc. 26N)

spowodowało sporadyczne przerwania ciągłości między warstwą rogową a warstwą jasną, przy zachowaniu normalnej grubości warstwy rogowej, bez zmian w warstwie kolczystej i skórze właściwej. Wyniki wskazują, że wszystkie badane związki wykazują zależny od stężenia wpływ na strukturę naskórka, przy zachowaniu integralności skóry właściwej, a obecność endolizyny osłabia uszkodzenia spowodowane przez dendrymery.

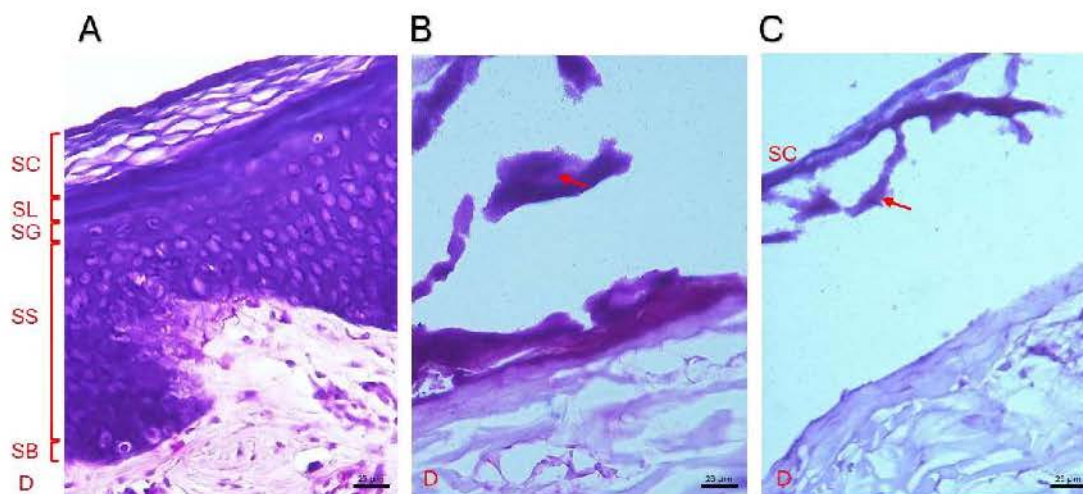


Rycina 26 Histomorfologia skrawków mrożonych niezainfekowanej skóry wieprzowej. (A) przedstawia grupę kontrolną niepoddaną działaniu leku, po 24 godzinach leczenia (B) endolizyną, (C) 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAg, (D) 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAg – 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny, (E) 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAg (F) 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAg + 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny, (G) 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendCh, (H) 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendCh – 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny, (I) 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendCh, (J) 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendCh – 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny, (K) 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAgCh, (L) 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAgCh + 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny, (M) 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAgCh oraz (N) 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAgCh + 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny. Skala 25 μm (przekrój poprzeczny, powiększenie 400x, barwnic 1 % błękitem toluidynowym).

Zmiany strukturalne w biofilmie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i warstwach skóry po 24 godzinach leczenia dendrymerami w stężeniach 8 i 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ich kompleksami z endolizyną (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) przedstawiono na Rycinie 27. W grupie kontrolnej (ryc. 27A) z miejscowo odłączoną warstwą rogową naskórka (SC) otoczoną gęstym biofilmem, naskórek uległ degradacji, natomiast skóra właściwa (D) została częściowo zniszczona przez bakterie, co przejawiało się w miejscach o spłaszczonej powierzchni. Podanie endolizyny (ryc. 27B) nie zmieniło tego stanu. Traktowanie 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAg (ryc. 27C) i 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAg + 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny (ryc. 27D) nie zmniejszyło tworzenia się biofilmu ani odbudowy SC i nie wpłynęło na skórę właściwą, jak opisano powyżej. Zastosowanie wyższego stężenia 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAg (ryc. 27E) lub jego kompleksu z endolizyną (ryc. 27F) nie zapobiegło uszkodzeniu naskórka i skóry właściwej. Podobnie, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendCh (ryc. 27G) i DendCh + 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny (ryc. 27H) nie przywróciły integralności warstwy rogowej, podczas gdy 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendCh (ryc. 27I) i DendCh + 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny (ryc. 27J) spowodowały ich całkowite odłączenie, pozostawiając nienaruszoną warstwę rogową. Wprowadzenie dendrymeru DendAgCh w stężeniu 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ryc. 27K) i kompleksu z 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny (ryc. 27L) również nie zapobiegło odłączeniu się warstwy rogowej ani utracie głębszych warstw naskórka, podobnie jak 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DendAgCh (ryc. 27M) i DendAgCh + 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endolizyny (ryc. 27N). W każdym z tych przypadków biofilm przylegał do całkowicie oddzielonej warstwy rogowej, nie zaobserwowano obecności głębszych warstw naskórka, natomiast skóra właściwa pozostała częściowo zdegradowana, co przejawiało się spłaszczeniem powierzchni. Oznacza to, że żadna z badanych kombinacji nie zapobiegła mechanicznemu zniszczeniu warstw skóry przez biofilm PAO1 (Rycina 28). Efekt ten należy tłumaczyć zdolnością bakterii do produkcji enzymów z grupy proteaz oraz lipaz, a w szczególności elastazy, zdolnych do degradacji tkanek gospodarza, w tym elastyny, sprzyjając pozyskiwaniu składników odżywczych [21].



Rycina 27 Histomorfologia skrawków mrożonych zakażonej skóry wieprzowej z utworzonym przez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilmem. (A) przedstawia zainfekowaną skórę – grupa kontrolna, po 24 godzinach leczenia (B) endolizyną, (C) 8 µg/mL DendAg, (D) 8 µg/mL DendAg + 2 µg/mL endolizyny, (E) 32 µg/mL DendAg, (F) 32 µg/mL DendAg + 2 µg/mL endolizyny, (G) 8 µg/mL DendCh, (H) 8 µg/mL DendCh + 2 µg/mL endolizyny, (I) 32 µg/mL DendCh, (J) 32 µg/mL DendCh + 2 µg/mL endolizyny, (K) 8 µg/mL DendAgCh, (L) 8 µg/mL DendAgCh + 2 µg/mL endolizyny, (M) 32 µg/mL DendAgCh oraz (N) 32 µg/mL DendAgCh + 2 µg/mL endolizyny. Skala wynosi 100 µm (przekrój poprzeczny, powiększenie 100x, barwienie 1 % błękitem toluidynowym).

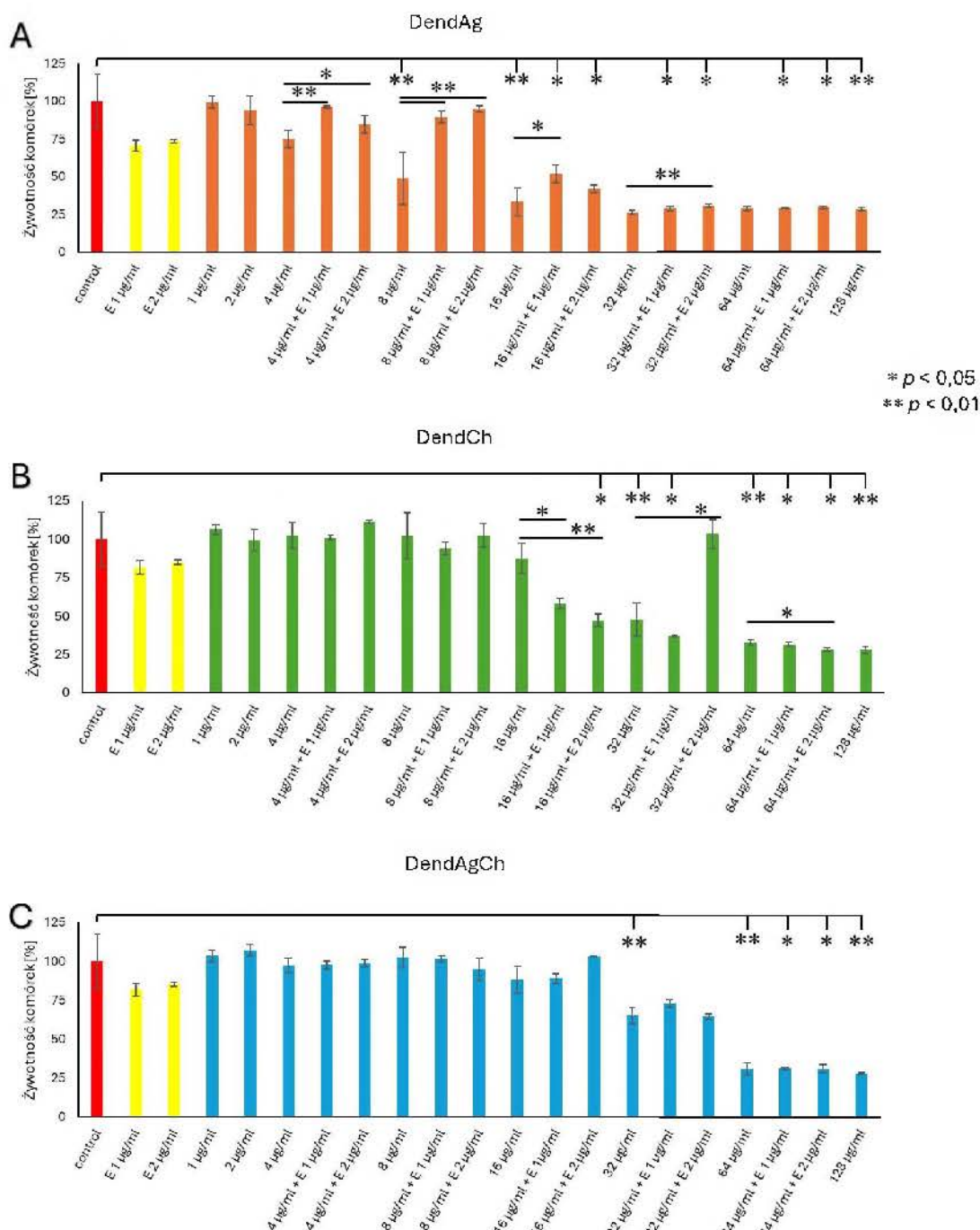


Rycina 28 Porównanie histomorfologii skrawków mrożonych tkanki skóry wieprzowej niezainfekowanej i zainfekowanej *Pseudomonas aeruginosa*. (A) przedstawia tkankę skóry niezainfekowaną, z wyraźnym podziałem na warstwy naskórka: warstwę rogową (SC), warstwę jasną (SL), warstwę ziarnistą (SG), warstwę kolczystą (SS), warstwę podstawową (SB) i skórę właściwą (D). (B, C) przedstawiają tkankę skóry zakażoną *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 z skupiskami bakterii – biofilmem bakteryjnym – w obecności oddzielonej warstwy rogowej naskórka z wyraźnym brakiem głębszych warstw naskórka i w pobliżu powierzchni skóry właściwej. Skala wynosi 25 µm (przekroje poprzeczne, powiększenie 400x, barwienie 1 % błękitem toluidynowym).

4.6 Ocena cytotoksyczności dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną wobec ludzkich fibroblastów

Dendrymery stosowane jako opatrunki na rany w infekcjach skóry wykazują właściwości antybakteryjne, jednak nie można pominąć ich wpływu na żywotność i funkcjonowanie komórek skóry. W związku z tym przeprowadzono eksperyment mający na celu ocenę żywotności i zdolności proliferacyjnej komórek VH10 w obecności rosnących stężeń dendrymerów. Jak pokazano na Rycinie 29, niskie stężenia badanego dendrymeru (DendAg – Rycina 29A) (1–4 $\mu\text{g/mL}$) nie miały znaczącego wpływu na żywotność komórek, która utrzymywała się na poziomie $\sim 96\%$ kontroli. Nieco wyższe stężenie (8 $\mu\text{g/mL}$) spowodowało znaczny spadek przeżywalności ($\sim 50\%$), a stężenia 16, 32, 64 i 128 $\mu\text{g/mL}$ obniżyły żywotność do około 28% kontroli. Na podstawie wyników wybrano stężenia i dodano endolizynę w dawkach 1 i 2 $\mu\text{g/mL}$. Jak pokazano na wykresach, sama endolizyna, w obu badanych stężeniach, nie wykazywała działania cytotoksycznego. Ponadto dodanie endolizyny do DendAg w stężeniach 4 i 8 $\mu\text{g/mL}$ nie wywołało cytotoksyczności (żywotność komórek $\sim 91\%$). Jednak w stężeniu 16 $\mu\text{g/mL}$ przeżywalność spadła odpowiednio do $\sim 52\%$ i $\sim 42\%$, a w stężeniach 32 i 64 $\mu\text{g/mL}$ żywotność spadła do $\sim 30\%$ w obecności endolizyny, co wskazuje, że wysokie stężenia dendrymerów pozostają cytotoksyczne pomimo dodania białka. DendCh (Rycina 29B) wykazywał niższą cytotoksyczność niż DendAg; przy stężeniach 8 i 16 $\mu\text{g/mL}$ nie zaobserwowano znaczącego spadku przeżywalności komórek, która utrzymywała się na poziomie około 95%. Spadek do około 50% zaobserwowano przy stężeniu 32 $\mu\text{g/mL}$, natomiast najwyższe stężenia (64 i 128 $\mu\text{g/mL}$) zmniejszyły przeżywalność do około 30%. Natomiast dodanie endolizyny do DendCh w niższych stężeniach (4–8 $\mu\text{g/mL}$) nie zwiększyło cytotoksyczności, a średnia żywotność komórek nie przekraczała 100%. Przy stężeniu DendCh wynoszącym 16 i 32 $\mu\text{g/mL}$ w połączeniu z endolizyną wskaźnik przeżywalności komórek wynosił około 60%. Zastosowanie stężenia 64 $\mu\text{g/mL}$ również z endolizyną i 128 $\mu\text{g/mL}$ spowodowało $\sim 30\%$ przeżywalności fibroblastów. DendAgCh (Rycina 29C) wykazywał średni efekt cytotoksyczny. Stężenia w zakresie od 1 do 8 $\mu\text{g/mL}$ utrzymywały żywotność komórek na poziomie $\sim 102\%$, natomiast stężenia 16 i 32 $\mu\text{g/mL}$ skutkowały $\sim 77\%$ stopniem przeżywalności. Przy stężeniu dendrymeru wynoszącym 64 i 128 $\mu\text{g/mL}$ żywotność komórek spadła do około 30%. Natomiast DendAgCh w stężeniu 16 $\mu\text{g/mL}$ w połączeniu z endolizyną nie wykazało znaczącego wpływu na żywotność komórek. Ponadto dodanie 1 lub 2 $\mu\text{g/mL}$ endolizyny do 32 i 64 $\mu\text{g/mL}$

dendrymeru nie zmniejszyło cytotoksyczności, co dało porównywalny poziom przeżywalności komórek, odpowiednio ~ 65 % i ~ 31 %.



Rycina 29 Żywotność komórek VH10 poddanych działaniu metalodendrymerów (A) DendAg, (B) DendCh, (C) DendAgCh oraz kompleksów dendrymer-endolizyna po 24 godzinach inkubacji.

Eksperyment przeprowadzono trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako procent kontroli.

5. Dyskusja

Spośród wielu znanych związków o potwierdzonym działaniu przeciwdrobnoustrojowym, najbardziej obiecujące wydają się substancje zwiększające przepuszczalność błony zewnętrznej (OM) bakterii Gram-ujemnych. Jednak uszkodzenie błony zależy od struktury, typu i ładunku cząsteczki, a także od składu lipidowego błony komórkowej. Zarówno naturalne permeabilizatory (np. kationowe peptydy), jak i syntetyczne układy (takie jak dendrymery czy nanocząstki), zwykle oddziałują poprzez destabilizację dwuwarstwy lipidowej lub - w przypadku nanocząstek metali - poprzez indukcję peroksydacji lipidów i generację reaktywnych form tlenu (RFT/ROS) [118–125]. W większości przypadków efekt ten jest jednak niewystarczający i wymaga wzmocnienia dodatkowymi czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi, takimi jak antybiotyki lub białka o działaniu bakteriolitycznym [104,123,126]. Nawet jeśli permeabilizatory ułatwiają dostęp antybiotekom do wnętrza komórki bakteryjnej, istnieje nadal możliwość ich usuwania przez bakterie [127–129]. Dlatego w walce z opornością wielolekową konieczne jest opracowanie układów o działaniu wielokierunkowym.

Celem niniejszej pracy była analiza mechanizmów działania czterech rodzajów dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną wobec bakterii *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Endolizyna, będąca białkiem pochodzenia bakteriofagowego, degradowa warstwę peptydoglikanu (PG) i jest zazwyczaj stosowana do zwalczania bakterii Gram-dodatnich [104,130–133]. W połączeniu z nanomateriałami, może jednak wykazywać skuteczność również wobec bakterii Gram-ujemnych [79]. Jest to jednak uzależnione od modyfikacji dendrymerów, w tym obecność Ag^+ , czy pierścieni imidazolowych i pirydylowych. Aby zbadać to zjawisko, połączono endolizynę z czterema dendrymerami karbokrzemowymi i zaobserwowano, że kompleksy te wykazują charakterystyczne, trójtorowe działanie przeciwdrobnoustrojowe. Dodatkowo, oceniono wpływ wybranych dendrymerów i ich połączenia z endolizyną, które wykazały najlepszy efekt antybakteryjny, wobec dojrzałego biofilmu bakteryjnego, uformowanego na w warunkach *in vitro* oraz imitując zakażenie skórne – na modelu *ex vivo* skóry wieprzowej.

W pierwszej kolejności oceniono właściwości przeciwdrobnoustrojowe dendrymerów Dend, DendCh, DendAg i DendAgCh. Minimalne stężenie hamujące (MIC) dla trzech – Dend, DendAg i DendAgCh wynosiło około 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Natomiast nie zaobserwowano efektu MIC dla DendCh. Ponieważ aktywność przeciwbakteryjna dendrymerów często opiera się na uszkodzeniu błony komórkowej [134], przeprowadzono test permeabilizacji.

Wzrost fluorescencji NPN wskazywał na zdolność dendrymerów do zwiększania przepuszczalności błony. Doskonałymi permeabilizatorami okazały się Dend i DendCh, ponieważ wraz ze wzrostem użytego stężenia rosła fluorescencja, czyli efekt permeabilizacji. Z kolei im wyższe było stężenie dendrymerów DendAg i DendAgCh, tym słabszy efekt permeabilizacji, co można tłumaczyć tendencją dendrymerów zawierających jony srebra do agregacji – zjawisko to potwierdzono w analizach TEM i DLS, w których średnie rozmiary cząstek mieściły się w zakresie od 350 do 800 nm. Zwiększona przepuszczalność błony może również ułatwiać działanie endolizyn wobec bakterii Gram-ujemnych, umożliwiając im dotarcie do warstwy peptydoglikanu. Dlatego kluczowe było określenie charakteru interakcji pomiędzy dendrymerami a endolizyną [104]. Analiza termodynamiczna kompleksowania DendAg, DendCh i DendAgCh z endolizyną wykazała, że proces ten jest egzotermiczny, a Dend endotermiczny. Stała powinowactwa (K_b) była wyższa dla dendrymeru DendAg niż dla Dend, DendCh i DendAgCh, co prawdopodobnie wynika z różnic w ekspozycji ładunków powierzchniowych. Analizy DLS i TEM wykazały, że kompleksy zachowują duże rozmiary, w granicach 250–800 nm.

Endolizyna zachowywała zdolność degradacji peptydoglikanu również w formie kompleksu z dendrymerami, przy czym silniejszy efekt obserwowano dla układu z dendrymerem Dend, przy kolejnych dendrymerach – DendCh, DendAg i DendAgCh obserwowano nieznaczny spadek w porównaniu do pierwszego dendrymeru. Różnice te wynikają z rodzajów modyfikacji – obecności ligandów – badanych dendrymerów, które, jak wykazano, mają wpływ na aktywność enzymatyczną endolizyny. Z kolei porównując wyniki dla DendAg i DendAgCh, należy stwierdzić, że najlepszy efekt był widoczny dla DendAg. Można to także tłumaczyć większą ekspozycją ładunku dodatniego w DendAg, co sprzyja wiązaniu endolizyny z błoną lipidową.

W dalszej części przeprowadzono badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej kompleksów endolizyna/dendrymer. Wyniki wykazały, że dodanie 1 i 2 $\mu\text{g/mL}$ endolizyny do 32 $\mu\text{g/mL}$ dendrymeru Dend nie spowodowało znaczącego spadku gęstości optycznej hodowli bakteryjnej, w związku z czym zdecydowano o wyłączeniu go z kolejnych badań. Natomiast w przypadku dodania 2 $\mu\text{g/mL}$ endolizyny do DendCh, DendAg lub DendAgCh powodowało spadek gęstości optycznej (OD_{600}) hodowli bakterii do odpowiednio 60 % (DendCh), 50 % (DendAg) i 80 % (DendAgCh). Oznacza to, że dodanie endolizyny do dendrymeru pojedynczo niewykazującego efektu antybakteryjnego prowadziło do pojawienia się efektu przeciwdrobnoustrojowego.

W celu potwierdzenia spadku gęstości optycznej wzrostu bakterii, przeprowadzono analizę z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej oraz specyficznych fluoroforów, gdzie żywe bakterie wykazywały zieloną fluorescencję, a martwe czerwoną, tych samych kombinacji dendrymerów i endolizyny oraz ich stężeń jak opisano powyżej. Uzyskane wyniki wskazują na zmniejszenie liczby żywych bakterii oraz wzrost liczby bakterii martwych po działaniu DendCh, DendAg oraz DendAgCh, przy czym dodatkowa obecność endolizyny efekt ten nasila.

Uszkodzenia błony komórkowej bakterii oraz powstawanie porów potwierdzono metodami SEM i TEM. Na powierzchni komórek bakteryjnych widoczne były liczne pory, co jest typowe dla tego rodzaju układów [135–137]. Dodatkowo zaobserwowano tendencję bakterii do agregacji, co może wynikać z wiązania dendrymerów do lipopolisacharydów (LPS) obecnych w błonie zewnętrznej. Ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne, LPS wykazuje zdolność przyłączania kationowych dendrymerów, co sprzyja agregacji komórek [138]. Aby potwierdzić ten mechanizm, wyznakowano peptydoglikan bakterii barwnikiem HADA, a degradację PG mierzono spadkiem fluorescencji w mikroskopii fluorescencyjnej. Wyniki testu HADA wykazały, że endolizyna w obecności dendrymerów prowadzi do degradacji peptydoglikanu – sygnał fluorescencyjny był znacznie słabszy w próbkach zawierających oba składniki niż w próbkach z wolnymi dendrymerami lub endolizyną. Podobny efekt uzyskała Skrzyniarz i wsp., gdzie wykazano degradację peptydoglikanu w wyniku synergistycznego działania dendrymeru zawierającego jony srebra oraz lizozymu [113]. Działanie oparte na zwiększonej przepuszczalności błony i degradacji PG może być dodatkowo wzmacniane przez peroksydację lipidów, wynikającą z obecności srebra na powierzchni dendrymerów [139]. Dla badanych dendrymerów zawierających jony srebra zaobserwowano zwiększoną indukcję reaktywnych form tlenu (RFT/ROS), przy czym poziom ten był wyższy dla DendAgCh. Dodanie endolizyny zwiększało produkcję reaktywnych form tlenu w przypadku DendAg, natomiast dla DendAgCh nie obserwowano znaczących zmian.

Kolejnym etapem badań była analiza właściwości przeciwbiofilmowych dendrymerów oraz ich kompleksów z endolizyną. W tym celu przeprowadzono eksperyment polegający na wyhodowaniu dojrzałego biofilmu bakteryjnego, a następnie dodanie rosnących stężeń dendrymerów – podobnie jak w pierwszym badaniu gęstości optycznej, po upływie odpowiedniego czasu wyznakowano barwnikiem oraz zmierzono absorbancję. Uzyskane wyniki wskazują, że najsilniejsze działanie przeciwbiofilmowe wykazały dendrymery DendAg i DendAgCh o stężeniu 128 $\mu\text{g/mL}$, co skutkowało całkowitą degradacją

biofilmu. Zastosowanie niższych stężeń badanych dendrymerów prowadziło natomiast do wzrostu absorbancji w porównaniu z grupą kontrolną, co prawdopodobnie wynikało z agregacji komórek bakteryjnych oraz kondensacji struktury biofilmu w obecności dendrymerów, a także niewystarczającego stężenia tych związków do skutecznego oddziaływania na złożoną strukturę matrycy biofilmu [138]. Pomimo ograniczonej skuteczności uzyskanych rezultatów, przeprowadzono analogiczne badanie z wykorzystaniem tych samych dendrymerów w wybranych stężeniach, uzupełnione o endolizynę w stężeniu 2 µg/mL, w celu oceny potencjalnego efektu synergistycznego. Jak wskazują uzyskane wyniki, endolizyna pozytywnie wpłynęła na inhibicję biofilmu, doprowadzając do znacznego ograniczenia jego ilości w przypadku każdego dendrymeru. Następnie oceniono przeżywalność bakterii w utworzonym biofilmie po działaniu dendrymerami oraz ich kompleksami z endolizyną. W tym celu wykonano eksperyment z wykorzystaniem konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej, wykorzystując test FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability. W zależności od zastosowanego dendrymeru i jego kompleksu z endolizyną, obserwowano różną proporcję między martwymi oraz żywymi bakteriami, a także różną ilość masy biofilmu. W przypadku DendAg obserwowano większą ilość biofilmu, ale ze spadkiem ilości żywych bakterii po zastosowaniu wyższego stężenia, a przy dodatkowej obecności endolizyny w niższym i wyższym stężeniu efekt się nasilał. Z kolei użycie niższego stężenia DendCh objawiało się zwiększeniem ilości martwych bakterii, podczas gdy obecność endolizyny oraz wyższe stężenie wpływały na zmniejszenie masy biofilmu z nieznaczną zmianą w ilości martwych bakterii. Natomiast największym wpływem wykazał się DendAgCh, znacząco zwiększając ilość martwych bakterii i zmniejszając masę biofilmu. Aby wyjaśnić mechanizm hamowania powstawania, czy też degradacji biofilmu przez badane związki, należy wziąć pod uwagę zarówno aktywność jonów srebra, jak i specyficzne właściwości dendrymerów i ich ligandów. Jony Ag^+ charakteryzują się wysokim powinowactwem do grup tiolowych, zwłaszcza cysteiny, która występuje w wielu enzymach odpowiedzialnych za metabolizm egzopolisacharydów. Rozpad wiązań S–H prowadzi do osłabienia adhezji komórek bakteryjnych do podłoża i zakłócenia systemu *quorum sensing*. Ponadto dendrymery z jonami Ag^+ zwiększają przepuszczalność błony zewnętrznej bakterii i powodują wzrost produkcji RFT/ROS, prowadząc do rozpadu i śmierci komórek planktonicznych [15,140], co może mieć również miejsce w biofilmie. Dodatkowo, niska dawka badanego związku może zwiększyć produkcję EPS i macierzy białkowej, co zmienia strukturę biofilmu, a aktywność metaboliczna komórek bakteryjnych ulega zmniejszeniu z powodu zakłócenia procesów wewnątrzkomórkowych [141]. Jednocześnie należy wziąć pod uwagę ładunek elektryczny

macierzy EPS, który jest głównie ujemny. Dodatnio naładowane dendrymery mogą być silnie przyciągane do biofilmu przez siły elektrostatyczne, co z jednej strony może ułatwić dostarczanie jonów srebra i zwiększyć penetrację matrycy. Z drugiej strony może to sprzyjać problematycznej agregacji dendrymerów lub komórek bakteryjnych, prowadząc do zwiększonego tworzenia się biofilmu lub zmiany właściwości fizycznych, takich jak gęstość i zdolność przylegania do powierzchni [142].

W celu określenia wpływu infekcji bakteryjnej *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 na skórę, oraz potencjalne terapeutyczne działanie dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną, wykonano szereg badań umożliwiających udzielenie na to odpowiedzi. Pierwszym badaniem jakie wykonano, było ocenienie przeżywalności bakterii oraz struktury biofilmu wytworzonego na kawałkach skóry wieprzowej, wykorzystując analogiczny, jak opisano powyżej, test FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit. Wytworzony biofilm w grupie kontrolnej wykazywał się prawidłowym, gęstym i jednorodnym ułożeniem z dużą ilością żywych – z zieloną fluorescencją bakterii. Aplikacja endolizyny nie wykazała żadnego wpływu na strukturę biofilmu czy komórek. Natomiast obserwując obrazy mikroskopowe w przypadku zastosowania DendAg, należy zwrócić uwagę na pojawiające się obszary z czerwonym zabarwieniem, którego wraz ze wzrostem stężenia oraz obecności endolizyny, ilość rośnie, co wskazuje na wzrost ilości martwych bakterii. Podobny efekt wykazał DendCh i jego kompleks z endolizyną, jednak z znacznie mniejszą intensywnością czerwonego sygnału. Z kolei dodanie niższego stężenia DendAgCh oraz kompleksu z endolizyną przyczyniło się do wzrostu ilości martwych bakterii, a w przypadku wyższego stężenia, w obu wariantach, zmniejszyło także masę biofilmu. Aby potwierdzić powyższe wyniki, przeprowadzono analizę uformowanego biofilmu na skórze wieprzowej, traktowanego takimi samymi wariantami dendrymerów i endolizyny jak powyżej, z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Wykazano zmiany w strukturze biofilmu, w postaci rozrzedzenia matrycy biofilmu, co skutkowało odsłonięciem komórek bakteryjnych, a także licznymi uszkodzeniami błony i ściany komórkowej bakterii po zastosowaniu dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną.

Mimo badania wpływu dendrymerów i endolizyny na bakterie planktoniczne oraz obecne w biofilmie uformowanym na sztucznym podłożu czy tkance skórnej, wykazania właściwości antibakteryjnych i przeciwbiofilmowych, należy zwrócić uwagę na wpływ badanych związków na histologię skóry niezainfekowanej, a także z indukowaną infekcją bakteryjną. Ma to szczególne znaczenie, ze względu na ocenę skuteczności terapii czy też degradacyjnego

wpływu testowanych czynników. W tym celu przeprowadzono analizę histomorfologiczną tkanki skórnej po aplikacji dendrymerów wraz z endolizyną. Jak zakładano, dendrymery w zależności od stężenia oraz ich kompleksu z endolizyną, powodują zmiany w budowie warstw naskórka, doprowadzając do atrofii, hipertrofii czy hiperplazji. Uważa się, że może to być wynikiem działania wspomagającego proces gojenia ran – AgNPs pobudzają proliferację fibroblastów oraz ich różnicowanie w miofibroblasty, co przyspiesza obkurczanie się rany. Dodatkowo stymulują proliferację i migrację keratynocytów [143], bądź nasilonego stanu zapalnego, spowodowanego indukcją wydzielania cytokin prozapalnych przez makrofagi, takich jak interleukiny Il-6, Il-10 i TNF- α [144], gdyż zbyt wysokie i długotrwałe uwalnianie jonów Ag⁺ może działać toksycznie, dlatego efektywne wspomaganie gojenia wymaga niskich stężeń srebra. Z kolei, w przypadku analizy histomorfologicznej tkanki zainfekowanej, należy zwrócić uwagę na fakt, iż niezależnie od zastosowania dendrymeru, endolizyny, czy ich kompleksu, stopień degradacji naskórka przez bakterie pozostaje na jednakowym, wysokim poziomie, jedynie z częściowym zachowaniem warstwy rogowej, a także powierzchniową degradacją brodawek skóry właściwej. Dodatkowo, *Pseudomonas aeruginosa* tworzy skupiska komórek, które ułatwiają jej przyczepianie się do rany i wydziela różne enzymy i toksyny, takie jak egzotoksyny typu A, endotoksyny – LPS i elastazy, które uszkadzają tkanki gospodarza i komórki układu odpornościowego, prowadzą do martwicy i nasilają proces zapalny [145].

Ostatnim etapem badań, była ocena wpływu dendrymerów oraz ich wybranych stężeń w połączeniu z endolizyną wobec komórek ludzkich fibroblastów w hodowli *in vitro*. W tym celu przeprowadzono test MTS. Jak zaobserwowano, badane dendrymery wykazują właściwości cytotoksyczne po administracji wyższych stężeń (64 i 128 $\mu\text{g/mL}$), natomiast dodatkowa obecność endolizyny skutkowała obniżeniem cytotoksyczności w przypadku zastosowania niższych stężeń (8 – 32 $\mu\text{g/mL}$). Toksyczność dendrymerów wobec komórek eukariotycznych może wynikać z wysokiej gęstości ładunków dodatnich, dzięki którym dendrymery wiążą się z komponentami ujemnie naładowanej błony komórkowej, poprzez tworzenie wiązań elektrostatycznych. Z drugiej strony, dendrymery modyfikowane jonami srebra powodują zwiększenie produkcji reaktywnych form tlenu, a także obecność i uwalnianie Ag⁺ może wchodzić w reakcje z grupami tiolowymi obecnymi w białkach, co z kolei nasila stres oksydacyjny, peroksydację lipidów, czy fragmentację DNA, prowadząc do apoptozy [146]. Natomiast obecność ujemnie naładowanej endolizyny w pewnym stopniu może

neutralizować dodatni ładunek dendrymerów w wyniku tworzenia kompleksów o obniżonym potencjale Zeta, które stają się mniej cytotoksyczne [147].

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy pokazują, że badane dendrymery (szczególnie te z jonami srebra i/lub odpowiednimi ligandami) oraz ich kompleksy z endolizyną mogą skutecznie działać na *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 jednocześnie na kilka sposobów: zwiększając przepuszczalność błony zewnętrznej, umożliwiając endolizynie dotarcie do peptydoglikanu i jego degradację, a w wariantach ze srebrem dodatkowo nasilają stres oksydacyjny (ROS/RFT). Przekładało się to na ograniczenie wzrostu bakterii w formie planktonicznej oraz na zmniejszenie przeżywalności bakterii w biofilmie i zmiany w jego strukturze zarówno w modelach *in vitro*, jak i *ex vivo*. Jednocześnie zauważono, że skuteczność i bezpieczeństwo badanych kompleksów zależą od rodzaju modyfikacji oraz stężenia, ponieważ wyższe dawki mogą zwiększać cytotoksyczność. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż niniejsza praca nie kończy badań, lecz stanowi początkowy etap, który wskazuje kierunek dalszych prac. W kolejnych badaniach warto dokładniej sprawdzić, jak konkretne elementy struktury dendrymerów (ładunek, ligandy, tendencja do agregacji, uwalnianie Ag^+) wpływają na ich aktywność i toksyczność. Istotne będzie też przetestowanie układów na większej liczbie szczepów klinicznych, w tym wielolekoopornych, oraz ocena ich działania w połączeniu z antybiotykami (czy rzeczywiście wzmacniają terapię i ograniczają mechanizmy obronne bakterii). Dalszego dopracowania wymagają również bardziej złożone modele zakażenia rany i biofilmu (np. biofilm wielogatunkowy), a także prace nad praktyczną formą podania, np. w opatrunkach lub hydrożelach z kontrolowanym uwalnianiem. Takie podejście pozwoli ocenić realny potencjał terapeutyczny tych układów i bezpiecznie zbliżyć je do zastosowań medycznych.

6. Wnioski

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, stwierdza się, że:

- Interakcje między dendrymerami a endolizyną zachodzą spontanicznie i są zależne od rodzaju modyfikacji powierzchniowej dendrymeru, tworząc konglomeraty z zachowaniem aktywności biologicznej.
- Dendrymery i ich kompleksy z endolizyną wykazują właściwości antibakteryjne poprzez uszkodzenia błony i degradację peptydoglikanu komórek bakteryjnych, a także zwiększają produkcję reaktywnych form tlenu.
- Dendrymery stosowane samodzielnie nie hamują powstawania biofilmu, natomiast ich kompleksy z endolizyną znacząco redukują ilość biofilmu oraz żywych bakterii, zarówno w modelu *in vitro*, jak i modelu skóry *ex vivo*.
- Cytotoksyczność dendrymerów jest zależna od stężenia i częściowo łagodzona przez obecność endolizyny.

7. Bibliografia

- [1] Serwecinska L. Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria : Water 2020;12:1–17.
- [2] Catalán P, Wood E, Blair JMA, Gudelj I, Iredell JR, Beardmore RE. Seeking patterns of antibiotic resistance in ATLAS, an open, raw MIC database with patient metadata. *Nat Commun* 2022;13:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30635-7>.
- [3] Montassier E, Valdés-Mas R, Batard E, Zmora N, Dori-Bachash M, Suez J, et al. Probiotics impact the antibiotic resistance gene reservoir along the human GI tract in a person-specific and antibiotic-dependent manner. *Nat Microbiol* 2021;6:1043–54. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00920-0>.
- [4] Chung H, Merakou C, Schaeffers MM, Flett KB, Martini S, Lu R, et al. Rapid expansion and extinction of antibiotic resistance mutations during treatment of acute bacterial respiratory infections. *Nat Commun* 2022;13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28188-w>.
- [5] Cherny SS, Chowers M, Obolski U. Bayesian network modeling of patterns of antibiotic cross-resistance by bacterial sample source. *Commun Med* 2023;3:1–7. <https://doi.org/10.1038/s43856-023-00289-7>.
- [6] Van Nieuwenhuysse B, Van der Linden D, Chatzis O, Lood C, Wagemans J, Lavigne R, et al. Bacteriophage-antibiotic combination therapy against extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection to allow liver transplantation in a toddler. *Nat Commun* 2022 131 2022;13:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33294-w>.
- [7] Maset RG, Pasquina-Lemonche L, Hapeshi A, Clifton LA, Hobbs JK, Harrison F, et al. Assessing the Mechanism of Action of Synthetic Nanoengineered Antimicrobial Polymers against the Bacterial Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomacromolecules* 2025. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.5C01175>.
- [8] World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024- Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. *World Heal Organ* 2024:1–72.
- [9] Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health* 2017;10:369–78. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>.
- [10] Lee NY, Ko WC, Hsueh PR. Nanoparticles in the treatment of infections caused by multidrug-resistant organisms. *Front Pharmacol* 2019;10:1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01153>.
- [11] Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology* 2017;15:1–20. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>.
- [12] Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine* 2017;12:1227–49. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>.
- [13] Trampani E, Prischì F, Vargiu A V, Abi-assaf J, Webber MA. Functionally distinct mutations within AcrB underpin antibiotic resistance in different lifestyles. *Antimicrob Resist* 2023;1. <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00001-8>.
- [14] Gallegos-Monterrosa R, Mendiola RO, Nuñez Y, Auvynet C, Kumar KM, Tang B, et al. Antibacterial and antibiofilm activities of ZIF-67. *J Antibiot (Tokyo)* 2023. <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00637-8>.
- [15] Dhumal D, Maron B, Malach E, Lyu Z, Ding L, Marson D, et al. Dynamic self-assembling supramolecular dendrimer nanosystems as potent antibacterial candidates against drug-resistant bacteria and biofilms. *Nanoscale* 2022;14:9286–96. <https://doi.org/10.1039/D2NR02305A>.
- [16] Baj J. *Mikrobiologia*. I. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA; 2018.
- [17] Dörr T, Moynihan PJ, Mayer C. Editorial: Bacterial Cell Wall Structure and Dynamics. *Front Microbiol* 2019;10:4–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02051>.
- [18] Tang A, Shi Y, Dong Q, Wang S, Ge Y, Wang C, et al. Prognostic differences in sepsis caused by gram-negative bacteria and gram-positive bacteria: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2023 271 2023;27:467-. <https://doi.org/10.1186/S13054-023-04750-W>.

- [19] Fal AM, Kuchar E, Zaremba M, Poletajew S, Krajewski J, Antoniewicz A. Zasady racjonalizacji terapii antybiotykowych w schorzeniach układu oddechowego i moczowego. *Med Trib* 2022. <https://podyplomie.pl/medical-tribune/38120.zasady-racjonalizacji-terapii-antybiotykowych-w-schorzeniach-ukladu-oddechowego-i-moczowego> (accessed October 14, 2025).
- [20] Salimiyan rizi K. MXene nanosheets as a novel nanomaterial with antimicrobial applications: A literature review. *J Mol Struct* 2022;1262:132958. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2022.132958>.
- [21] Sessa R, Diseases I, Section M, Diseases I, Section M. Gram-Negative Bacteria Exhibit Unique Biochemical Characteristics Important for Their 2022;6:35–9.
- [22] Nnenna Ugwu C, Nneoma Ezeibe E, Chijioke Emencheta S, Sherridan Nwagwu C, Onyenonachi Ogbonna K, Victor Ejiofor C, et al. Biofilms: structure, resistance mechanism, emerging control strategies, and applications. *RSC Pharm* 2025;2:1376–407. <https://doi.org/10.1039/D5PM00094G>.
- [23] Karruli A, Catalini C, D’Amore C, Foglia F, Mari F, Harxhi A, et al. Evidence-Based Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Critical Reappraisal. *Antibiotics* 2023;12:399. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12020399>.
- [24] Reem A, Almansoob S, Senan AM, Kumar Raj A, Shah R, Kumar Shrewastwa M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and related antibiotic resistance genes as indicators for wastewater treatment. *Heliyon* 2024;10:e29798. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E29798>.
- [25] Bigos M, Brauncajs M, Konieczka M, Michalak-Wikalińska A, Moskwa S, Pastuszek-Lewandowska D. *Bakteriologia Ogólna General Bacteriology*. 1st ed. Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; 2023.
- [26] Caveney NA, Li FK, Strynadka NC. Enzyme structures of the bacterial peptidoglycan and wall teichoic acid biogenesis pathways. *Curr Opin Struct Biol* 2018;53:45–58. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2018.05.002>.
- [27] Worthington RJ, Melander C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends Biotechnol* 2013;31:177–84. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2012.12.006>.
- [28] Sperandeo P, Martorana AM, Polissi A. Lipopolysaccharide biogenesis and transport at the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2017;1862:1451–60. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2016.10.006>.
- [29] Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Mol* 2020, Vol 25, Page 1340 2020;25:1340. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25061340>.
- [30] Lodowska J, Wolny D, Weglarz L, Dzierzewicz Z. The structural diversity of lipid A from gram-negative bacteria. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007;61:106–21.
- [31] Ruhel R, Kataria R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiol Res* 2021;251:126829. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2021.126829>.
- [32] Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol Rev* 2016;40:480–93. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUW007>.
- [33] Romano KP, Hung DT. Targeting LPS biosynthesis and transport in gram-negative bacteria in the era of multi-drug resistance. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2023;1870:119407. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2022.119407>.
- [34] Rohde M, Ferretti JJ, Rohde@helmholtz- M, Org A, *Microbiolspectrum /*. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol Spectr* 2019;7. <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0044-2018>.
- [35] Fisher JF, Mobashery S. Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein Sci* 2020;29:629–46. <https://doi.org/10.1002/PRO.3737>.
- [36] *Bakterie Gram-ujemne - Portal Stomatologa n.d.* <https://stomatologa.pl/zdrowie/bakterie-gram-ujemne> (accessed October 3, 2025).
- [37] Varadarajan AR, Allan RN, Valentin JDP, Castañeda Ocampo OE, Somerville V, Pietsch F, et al. An

- integrated model system to gain mechanistic insights into biofilm-associated antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1. *Npj Biofilms Microbiomes* 2020 61 2020;6:1–17. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00154-8>.
- [38] Otis G, Bhattacharya S, Malka O, Kolusheva S, Bolel P, Porgador A, et al. Selective Labeling and Growth Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Aminoguanidine Carbon Dots. *ACS Infect Dis* 2018;5:292–302. <https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.8B00270>.
- [39] Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens* 2021;10:1310. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10101310/S1>.
- [40] Wu S, Jiang Q, Lu D, Zhai X, Duan J, Hou B. The effect of antibacterial peptide ϵ -Polylysine against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in marine environment. *Npj Mater Degrad* 2024 81 2024;8:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41529-024-00539-6>.
- [41] Chen YY, Wu PF, Chen CS, Chen IH, Huang WT, Wang F Der. Trends in microbial profile of burn patients following an event of dust explosion at a tertiary medical center. *BMC Infect Dis* 2020;20:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4920-4>.
- [42] Burrows LL. The Therapeutic Pipeline for *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *ACS Infect Dis* 2018;4:1041–7. <https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.8B00112>.
- [43] Eid R, Dabar G, Hanna LR, Saliba G, Riachy M, Choucair J, et al. Comparison of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care and non-intensive care units and its impact on treatment decisions. *Sci Reports* 2025 151 2025;15:1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90791-w>.
- [44] Aboulwafa MM, Mostafa NM, Youssef FS, Eldahshan OA, Singab ANB. *Lavandula dentata* leaves as potential natural antibiofilm agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 2025;15:1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-88824-5>.
- [45] Skrzyniarz K, Kuc-Ciepluch D, Lasak M, Arabski M, Sanchez-Nieves J, Ciepluch K. Dendritic systems for bacterial outer membrane disruption as a method of overcoming bacterial multidrug resistance. *Biomater Sci* 2023;6421–35. <https://doi.org/10.1039/d3bm01255g>.
- [46] Hernando-Amado S, Gomis-Font MA, Valverde JR, Oliver A, Martínez JL. Ceftazidime-avibactam use selects multidrug-resistance and prevents designing collateral sensitivity-based therapies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* 2025 161 2025;16:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58597-6>.
- [47] Kunisch F, Campobasso C, Wagemans J, Yildirim S, Chan BK, Schaudinn C, et al. Targeting *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with an evolutionary trained bacteriophage cocktail exploiting phage resistance trade-offs. *Nat Commun* 2024 151 2024;15:1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52595-w>.
- [48] Zhang F, Cheng W. The Mechanism of Bacterial Resistance and Potential Bacteriostatic Strategies. *Antibiot* 2022, Vol 11, Page 1215 2022;11:1215. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11091215>.
- [49] Cai YM, Hong F, De Craemer A, Malone JG, Crabbé A, Coenye T. Echinacoside reduces intracellular c-di-GMP levels and potentiates tobramycin activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm aggregates. *Npj Biofilms Microbiomes* 2025 111 2025;11:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41522-025-00673-2>.
- [50] Tan X, Huang Y, Rana A, Singh N, Abbey TC, Chen H, et al. Optimization of an in vitro *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Model to Examine Antibiotic Pharmacodynamics at the Air-Liquid Interface. *Npj Biofilms Microbiomes* 2024 101 2024;10:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00483-y>.
- [51] Siddik A, Satheesh S. Characterization and assessment of barnacle larval settlement-inducing activity of extracellular polymeric substances isolated from marine biofilm bacteria. *Sci Rep* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-54294-9>.
- [52] Kaplan E, Greene NP, Crow A, Koronakis V. Insights into bacterial lipoprotein trafficking from a structure of LolA bound to the LolC periplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E7389–97. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1806822115/-/DCSUPPLEMENTAL>.
- [53] Eghbalpoor F, Gorji M, Alavigh MZ, Moghadam MT. Genetically engineered phages and engineered phage-derived enzymes to destroy biofilms of antibiotics resistance bacteria. *Heliyon* 2024;10:e35666.

<https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E35666>.

- [54] Mu M, Liu S, DeFlorio W, Hao L, Wang X, Salazar KS, et al. Influence of Surface Roughness, Nanostructure, and Wetting on Bacterial Adhesion. *Langmuir* 2023;39:5426–39. <https://doi.org/10.1021/ACS.LANGMUIR.3C00091>/ASSET/IMAGES/LARGE/LA3C00091_0006.JPG.
- [55] Rosenzweig R, Perinbam K, Ly VK, Ahrar S, Siryaporn A, Yee AF. Nanopillared Surfaces Disrupt *Pseudomonas aeruginosa* Mechanoresponsive Upstream Motility. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019;11:10532–9. <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.8B22262>.
- [56] Huigens RW, Richards JJ, Parise G, Ballard TE, Zeng W, Deora R, et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation with Bromoageliferin Analogues. *J Am Chem Soc* 2007;129:6966–7. <https://doi.org/10.1021/JA069017T>.
- [57] Alfei S, Caviglia D. Prevention and Eradication of Biofilm by Dendrimers: A Possibility Still Little Explored. *Pharmaceutics* 2022;14:2016. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14102016>.
- [58] Zhao A, Sun J, Liu Y. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Front Cell Infect Microbiol* 2023;13:1–23. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947>.
- [59] Shree P, Singh CK, Sodhi KK, Surya JN, Singh DK. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. *Med Microecol* 2023;16:100084. <https://doi.org/10.1016/J.MEDMIC.2023.100084>.
- [60] Mahamuni-Badiger PP, Patil PM, Badiger M V., Patel PR, Thorat-Gadgil BS, Pandit A, et al. Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2020;108. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.110319>.
- [61] Zhang Y, Cai Y, Zhang B, Zhang YHPJ. Spatially structured exchange of metabolites enhances bacterial survival and resilience in biofilms. *Nat Commun* 2024 151 2024;15:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51940-3>.
- [62] Rouillard KR, Markovetz MR, Bacudio LG, Hill DB, Schoenfisch MH. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Eradication via Nitric Oxide-Releasing Cyclodextrins. *ACS Infect Dis* 2020;6:1940–50. <https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.0C00246>.
- [63] Zahorska E, Denig LM, Lienenklaus S, Kuhaudomlarp S, Tschernig T, Lipp P, et al. High-Affinity Lectin Ligands Enable the Detection of Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Implications for Diagnostics and Therapy. *JACS Au* 2024;4:4715–28. <https://doi.org/10.1021/JACSAU.4C00670>.
- [64] Ellairaja S, Krithiga N, Ponmariappan S, Vasantha VS. Novel Pyrimidine Tagged Silver Nanoparticle Based Fluorescent Immunoassay for the Detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Agric Food Chem* 2017;65:1802–12. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.6B04790>.
- [65] Sean Norman R, Stone JW, Gole A, Murphy CJ, Sabo-Attwood TL. Targeted Photothermal Lysis of the Pathogenic Bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, with Gold Nanorods. *Nano Lett* 2007;8:302–6. <https://doi.org/10.1021/NL0727056>.
- [66] Schommer NN, Gallo RL. Structure and function of the human skin microbiome. *Trends Microbiol* 2013;21:660–8. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.10.001>.
- [67] Mescher AL. Junqueira's Basic Histology TEXT AND ATLAS. 14th ed. McGraw-Hill Education; 2016. https://doi.org/10.5005/jp/books/12791_18.
- [68] Percival SL, Emanuel C, Cutting KF, Williams DW. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int Wound J* 2011;9:14. <https://doi.org/10.1111/J.1742-481X.2011.00836.X>.
- [69] Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2001;6:170–4. <https://doi.org/10.1046/J.0022-202X.2001.00043.X>.
- [70] Gantwerker EA, Hom DB. Skin: Histology and physiology of wound healing. *Clin Plast Surg* 2012;39:85–97. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2011.09.005>.
- [71] Lozano-García R, Quintana-Sánchez S, Benito-Martínez S, Torrado G, Guarnizo-Herrero V, Martínez-Alonso B, et al. Antibacterial Creams Containing Cationic Carbosilane Dendrimers for Wound Treatment.

- ACS Appl Polym Mater 2025;7:10026. <https://doi.org/10.1021/ACSAPM.5C01718>.
- [72] Urban-Chmiel R, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Wieczorek K, Dec M, Nowaczek A, et al. Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. *Antibiotics* 2022;11:1079. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11081079/S1>.
- [73] Laanoja J, Sihtmäe M, Vija H, Kurvet I, Otsus M, Šmits K, et al. Particle-Driven Synergistic Antibacterial Effect of Silver–Chitosan Nanocomposites Against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. *ACS Omega* 2025;10:27904–19. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.5C01067>.
- [74] Hatfull GF, Dedrick RM, Schooley RT. Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Annu Rev Med* 2022;73:197–211. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-080219-122208/CITE/REFWORKS>.
- [75] Perli G, Bertuzzi DL, Souto DEP, Ramos MD, Braga CB, Aguiar SB, et al. Synthesis and Characterization of Dendronized Gold Nanoparticles Bearing Charged Peripheral Groups with Antimicrobial Potential. *Nanomaterials* 2022;12. <https://doi.org/10.3390/nano12152610>.
- [76] Pareek V, Devineau S, Sivasankaran SK, Bhargava A, Panwar J, Srikumar S, et al. Silver Nanoparticles Induce a Triclosan-Like Antibacterial Action Mechanism in Multi-Drug Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.638640>.
- [77] You Y, Yu X, Jiang J, Chen Z, Zhu YX, Chen Y, et al. Bacterial cell wall-specific nanomedicine for the elimination of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* through electron-mechanical intervention. *Nat Commun* 2025 161 2025;16:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58061-5>.
- [78] Falanga A, Del Genio V, Galdiero S. Peptides and dendrimers: How to combat viral and bacterial infections. *Pharmaceutics* 2021;13:1–23. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010101>.
- [79] Quintana-Sanchez S, Gómez-Casanova N, Sánchez-Nieves J, Gómez R, Rachuna J, Wasik S, et al. The Antibacterial Effect of PEGylated Carbosilane Dendrimers on *P. aeruginosa* Alone and in Combination with Phage-Derived Endolysin. *Int J Mol Sci* 2022;23:1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms23031873>.
- [80] Abd-El-Aziz AS, Agatemor C, Etkin N, Overy DP, Lanteigne M, McQuillan K, et al. Antimicrobial Organometallic Dendrimers with Tunable Activity against Multidrug-Resistant Bacteria. *Biomacromolecules* 2015;16:3694–703. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.5B01207>.
- [81] Namata F, Sanz del Olmo N, Molina N, Malkoch M. Synthesis and Characterization of Amino-Functional Polyester Dendrimers Based On Bis-MPA with Enhanced Hydrolytic Stability and Inherent Antibacterial Properties. *Biomacromolecules* 2023;24:858–67. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.2C01286>.
- [82] Strydom SJ, Rose WE, Otto DP, Liebenberg W, De Villiers MM. Poly(amidoamine) dendrimer-mediated synthesis and stabilization of silver sulfonamide nanoparticles with increased antibacterial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2013;9:85–93. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2012.03.006>.
- [83] Barrios-Gumiel A, Sanchez-Nieves J, Pérez-Serrano J, Gómez R, de la Mata FJ. PEGylated AgNP covered with cationic carbosilane dendrons to enhance antibacterial and inhibition of biofilm properties. *Int J Pharm* 2019;569. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118591>.
- [84] Fuentes-Paniagua E, Sánchez-Nieves J, Hernández-Ros JM, Fernández-Ezequiel A, Soliveri J, Copa-Patiño JL, et al. Structure–activity relationship study of cationic carbosilane dendritic systems as antibacterial agents. *RSC Adv* 2016;6:7022–33. <https://doi.org/10.1039/C5RA25901K>.
- [85] Balogh L, Swanson DR, Tomalia DA, Hagnauer GL, McManus AT. Dendrimer–Silver Complexes and Nanocomposites as Antimicrobial Agents. *Nano Lett* 2000;1:18–21. <https://doi.org/10.1021/NL005502P>.
- [86] Lozano-Cruz T, Ortega P, Batanero B, Copa-Patiño JL, Soliveri J, De La Mata FJ, et al. Synthesis, characterization and antibacterial behavior of water-soluble carbosilane dendrons containing ferrocene at the focal point. *Dalt Trans* 2015;44:19294–304. <https://doi.org/10.1039/C5DT02230D>.
- [87] Sanz del Olmo N, Carloni R, Ortega P, García-Gallego S, de la Mata FJ. Metallodendrimers as a promising tool in the biomedical field: An overview. *Adv Organomet Chem* 2020;74:1–52. <https://doi.org/10.1016/BS.ADOMC.2020.03.001>.
- [88] Rodríguez-Prieto T, Popp PF, Copa-Patiño JL, Javier de la Mata F, Cano J, Mascher T, et al. Silver (I) N-Heterocyclic Carbenes Carbosilane Dendritic Systems and Their Imidazolium-Terminated Analogues as

- Antibacterial Agents: Study of Their Mode of Action. *Pharm* 2020, Vol 12, Page 968 2020;12:968. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12100968>.
- [89] Staneva D, Manov H, Vasileva-Tonkova E, Kukeva R, Stoyanova R, Grabchev I. Enhancing the antibacterial activity of PAMAM dendrimer modified with 1,8-naphthalimides and its copper complex via light illumination. *Polym Adv Technol* 2022;33:3163–72. <https://doi.org/10.1002/PAT.5768>.
- [90] de la Mata FJ, Gómez R, Cano J, Sánchez-Nieves J, Ortega P, Gallego SG. Carbosilane dendritic nanostructures, highly versatile platforms for pharmaceutical applications. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology* 2022;1–22. <https://doi.org/10.1002/wnan.1871>.
- [91] Carlmark A, Hawker C, Hult A, Malkoch M. New methodologies in the construction of dendritic materials. *Chem Soc Rev* 2009;38:352–62. <https://doi.org/10.1039/b711745k>.
- [92] Gómez-Casanova N, Martín-Serrano Ortiz Á, Heredero-Bermejo I, Sánchez-Nieves J, Luis Copa-Patiño J, Javier de la Mata F. Potential anti-adhesion activity of novel carbosilane zwitterionic dendrimers against eukaryotic and prokaryotic pathogenic microorganisms. *Eur J Pharm Biopharm* 2023;191:158–65. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2023.07.021>.
- [93] Bargathulla I, Aadhil Ashwaq B, Sathiyaraj S, Sultan Nasar A, ElangovanVellaichamy. Pegylated bis-indolyl polyurethane dendrimer: Empty drug carrier with prominent anticancer activity. *Eur Polym J* 2021;153:110491. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2021.110491>.
- [94] Mittal P, Saharan A, Verma R, Altalbawy FMA, Alfaidi MA, Batiha GES, et al. Dendrimers: A New Race of Pharmaceutical Nanocarriers. *Biomed Res Int* 2021;2021:8844030. <https://doi.org/10.1155/2021/8844030>.
- [95] Sripunya A, Chittasupho C, Mangmool S, Angerhofer A, Imaram W. Gallic Acid-Encapsulated PAMAM Dendrimers as an Antioxidant Delivery System for Controlled Release and Reduced Cytotoxicity against ARPE-19 Cells. *Bioconj Chem* 2024. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.4c00475>.
- [96] Aleaa abdul hussein jameel, Nadhim hussan hayder, Amenah Rami Abdullah, Laith ahmed yaaqoob. Cytotoxic Effect of Silver Nanoparticles Prepared by Biosurfactant Produced from Pathogenic Bacteria. *Indian J Forensic Med Toxicol* 2021;15:63–70. <https://doi.org/10.37506/ijfmt.v15i4.16663>.
- [97] Sawa T, Moriyama K, Kinoshita M. Current status of bacteriophage therapy for severe bacterial infections. *J Intensive Care* 2024 121 2024;12:44-. <https://doi.org/10.1186/S40560-024-00759-7>.
- [98] Hibstu Z, Belew H, Akelew Y, Mengist HM. Phage Therapy: A Different Approach to Fight Bacterial Infections. *Biologics* 2022;16:173. <https://doi.org/10.2147/BTT.S381237>.
- [99] Ciepluch K, Skrzyniarz K, Zdańska J, Barrios-Gumiel A, Sánchez-Nieves J, de la Mata FJ, et al. PEGylation of dendronized silver nanoparticles increases the binding affinity of antimicrobial proteins. *J Mol Liq* 2020;319. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114339>.
- [100] Oliveira H, São-José C, Azeredo J. Phage-Derived Peptidoglycan Degrading Enzymes: Challenges and Future Prospects for In Vivo Therapy. *Viruses* 2018, Vol 10, Page 292 2018;10:292. <https://doi.org/10.3390/V10060292>.
- [101] Shang X, Nelson DC. Contributions of net charge on the plic endolysin chap domain. *Antibiotics* 2019;8. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS8020070>.
- [102] Sanz-Gaitero M, Keary R, Garcia-Doval C, Coffey A, Van Raaij MJ. Crystal structure of the lytic CHAPKdomain of the endolysin LysK from *Staphylococcus aureus* bacteriophage K. *Virology* 2014;11. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-133>.
- [103] Thorén Edvardsen PK, Englund AN, Kjendseth Rohr Å, Mesnage S, Vaaje-Kolstad G. *Pseudomonas aeruginosa* Cryptic Prophage Endolysin Is a Highly Active Muramidase. *Biochemistry* 2025;10:53. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.5C00142>.
- [104] Ciepluch K, Skrzyniarz K, Barrios-Gumiel A, Quintana S, Sánchez-Nieves J, de la Mata FJ, et al. Dendronized Silver Nanoparticles as Bacterial Membrane Permeabilizers and Their Interactions With *P. aeruginosa* Lipopolysaccharides, Lysozymes, and Phage-Derived Endolysins. *Front Microbiol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02771>.
- [105] Zhang Y, Huang HH, Duc HM, Masuda Y, Honjoh K ichi, Miyamoto T. Application of endolysin

- LysSTG2 as a potential biocontrol agent against planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas* on various food and food contact surfaces. *Food Control* 2022;131. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108460>.
- [106] Ma Y, Ramoneda J, Johnson DR. Timing of antibiotic administration determines the spread of plasmid-encoded antibiotic resistance during microbial range expansion. *Nat Commun* 2023;14:2023.02.01.526709. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39354-z>.
- [107] Zhang H, Zhang X, Liang S, Wang J, Zhu Y, Zhang W, et al. Bactericidal synergism between phage endolysin Ply2660 and cathelicidin LL-37 against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2023;9:16. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00385-5>.
- [108] Gontijo MTP, Jorge GP, Brocchi M. Current Status of Endolysin-Based Treatments against Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* 2021;10:1143. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10101143>.
- [109] Taati Moghadam M, Mohebi S, Sheikhi R, Hasannejad-Bibalan M, Shahbazi S, Nemati S. Phage and Endolysin Therapy Against Antibiotics Resistant Bacteria: From Bench to Bedside. *MedComm* 2025;6:e70280. <https://doi.org/10.1002/MCO2.70280>.
- [110] Peptydoglikany bakteryjne: podważają wydajność zwierząt n.d. <https://www.dsm-firmenich.com/anh/news/feed-talks/articles/bacterial-peptidoglycans-animal-performance.html> (accessed November 27, 2025).
- [111] Padnya P, Mostovaya O, Ovchinnikov D, Shiabiev I, Pysin D, Akhmedov A, et al. Combined antimicrobial agents based on self-assembled PAMAM-calix-dendrimers/lysozyme nanoparticles: Design, antibacterial properties and cytotoxicity. *J Mol Liq* 2023;389:122838. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2023.122838>.
- [112] Patrúlea V, Gan BH, Perron K, Cai X, Abdel-Sayed P, Sublet E, et al. Synergistic effects of antimicrobial peptide dendrimer-chitosan polymer conjugates against *Pseudomonas aeruginosa*. *Carbohydr Polym* 2022;280:119025. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.119025>.
- [113] Skrzyniarz K, Sanchez-Nieves J, de la Mata FJ, Łysek-Gładysińska M, Lach K, Ciepluch K. Mechanistic insight of lysozyme transport through the outer bacteria membrane with dendronized silver nanoparticles for peptidoglycan degradation. *Int J Biol Macromol* 2023;237. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124239>.
- [114] Lasak M, Łysek-Gładysińska M, Lach K, Nirwan VP, Kuc-Ciepluch D, Sanchez-Nieves J, et al. Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotechnology, Sci Appl* 2025;18:57–70. <https://doi.org/10.2147/NSA.S498942>.
- [115] Skrzyniarz K, Takvor-mena S, Lach K, Łysek- M, Barrios-gumiel Ó, Cano J, et al. Molecular mechanism of action of imidazolium carbosilane dendrimers on the outer bacterial membrane – from membrane damage to permeability to antimicrobial endolysin. *J Colloid Interface Sci* 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2024.03.130>.
- [116] Galczyńska K, Ciepluch K, Madej Ł, Kurdziel K, Maciejewska B, Drulis-Kawa Z, et al. Selective cytotoxicity and antifungal properties of copper(II) and cobalt(II) complexes with imidazole-4-acetate anion or 1-allylimidazole. *Sci Rep* 2019;9:1–13. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-46224-6>;TECHMETA.
- [117] Cascales E, Santin Y. Chapter 12 . Measure of peptidoglycan hydrolase activity Running head: peptidoglycan remodelling enzymes To cite this version : HAL Id : hal-01780726 2018.
- [118] Yook J, Jeong D, Lee JC. Synthesis of Citronellol-Derived Antibacterial Polymers and Effect of Thioether, Sulfoxide, Sulfone, and Ether Functional Groups on Their Bactericidal Activity. *Macromolecules* 2023;56:3406–20. <https://doi.org/10.1021/ACS.MACROMOL.2C02518>.
- [119] Rodríguez-Prieto T, Fattori A, Camejo C, Javier de la Mata F, Cano J, Francesca Ottaviani M, et al. Synthesis of imidazolium-terminated carbosilane dendrimers and dendrons and study of their interactions with a cell membrane model. *Eur Polym J* 2020;133:109748. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2020.109748>.
- [120] Farrag HA, Abdallah N, Shehata MMK, Awad EM. Natural outer membrane permeabilizers boost antibiotic action against irradiated resistant bacteria. *J Biomed Sci* 2019;26:1–14.

<https://doi.org/10.1186/S12929-019-0561-6/TABLES/9>.

- [121] Li Y, Zhang W, Niu J, Chen Y. Mechanism of Photogenerated Reactive Oxygen Species and Correlation with the Antibacterial Properties of Engineered Metal-Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* 2012;6:5164–73. <https://doi.org/10.1021/NN300934K>.
- [122] Gold K, Slay B, Knackstedt M, Gaharwar AK. Antimicrobial Activity of Metal and Metal-Oxide Based Nanoparticles. *Adv Ther* 2018;1:1700033. <https://doi.org/10.1002/ADTP.201700033>.
- [123] Hernando-Gozalo M, Aguilera-Correa JJ, Rescalvo-Casas C, Seijas-Pereda L, García-Bertolín C, de la Mata FJ, et al. Study of the antimicrobial activity of cationic carbosilane dendrimers against clinical strains of multidrug-resistant bacteria and their biofilms. *Front Cell Infect Microbiol* 2023;13:1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1203991>.
- [124] Sani MA, Separovic F. How Membrane-Active Peptides Get into Lipid Membranes. *Acc Chem Res* 2016;49:1130–8. <https://doi.org/10.1021/ACS.ACCOUNTS.6B00074>.
- [125] Seyfi R, Kahaki FA, Ebrahimi T, Montazersaheb S, Eyvazi S, Babaeipour V, et al. Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. *Int J Pept Res Ther* 2020;26:1451–63. <https://doi.org/10.1007/S10989-019-09946-9/METRICS>.
- [126] Ciepluch K, Maciejewska B, Gałczyńska K, Kuc-Ciepluch D, Bryszewska M, Appelhans D, et al. The influence of cationic dendrimers on antibacterial activity of phage endolysin against *P. aeruginosa* cells. *Bioorg Chem* 2019;91. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103121>.
- [127] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:42–51. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO3380;SUBJMETA>.
- [128] Ali J, Rafiq QA, Ratcliffe E. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. *Futur Sci OA* 2018;4. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0109>.
- [129] Ribeiro AI, Dias AM, Zille A. Synergistic Effects Between Metal Nanoparticles and Commercial Antimicrobial Agents: A Review. *ACS Appl Nano Mater* 2022;5:3030–64. <https://doi.org/10.1021/ACSANM.1C03891>.
- [130] Ciepluch K, Maciejewska B, Gałczyńska K, Kuc-Ciepluch D, Bryszewska M, Appelhans D, et al. The influence of cationic dendrimers on antibacterial activity of phage endolysin against *P. aeruginosa* cells. *Bioorg Chem* 2019;91:103121. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103121>.
- [131] Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses* 2021, Vol 13, Page 680 2021;13:680. <https://doi.org/10.3390/V13040680>.
- [132] Azeredo J, García P, Drulis-Kawa Z. Targeting biofilms using phages and their enzymes. *Curr Opin Biotechnol* 2021;68:251–61. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2021.02.002>.
- [133] Latka A, Maciejewska B, Majkowska-Skrobek G, Briers Y, Drulis-Kawa Z. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017;101:3103–19. <https://doi.org/10.1007/S00253-017-8224-6/TABLES/2>.
- [134] Saxena D, Maitra R, Bormon R, Czekanska M, Meiers J, Titz A, et al. Tackling the outer membrane: facilitating compound entry into Gram-negative bacterial pathogens. *Npj Antimicrob Resist* 2023 11 2023;1:1–22. <https://doi.org/10.1038/S44259-023-00016-1>.
- [135] Jiang Y, Zheng W, Tran K, Kamilar E, Bariwal J, Ma H, et al. Hydrophilic nanoparticles that kill bacteria while sparing mammalian cells reveal the antibiotic role of nanostructures. *Nat Commun* 2022;13:1–17. <https://doi.org/10.1038/S41467-021-27193-9;TECHMETA>.
- [136] Hartmann M, Berditsch M, Hawecker J, Ardakani MF, Gerthsen D, Ulrich AS. Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3132–42. <https://doi.org/10.1128/AAC.00124-10>.
- [137] Wang Y, Xue M, Gao R, Chakraborty S, Wang S, Zhao X, et al. Short, Lipidated Dendrimeric γ -AApeptides as New Antimicrobial Peptidomimetics. *Int J Mol Sci* 2023;24:6407. <https://doi.org/10.3390/IJMS24076407/S1>.

- [138] Leire E, Amaral SP, Louzao I, Winzer K, Alexander C, Fernandez-Megia E, et al. Dendrimer mediated clustering of bacteria: improved aggregation and evaluation of bacterial response and viability. *Biomater Sci* 2016;4:998–1006. <https://doi.org/10.1039/C6BM00079G>.
- [139] Adeyemi OS, Shittu EO, Akpor OB, Rotimi D, Batiha GES. Silver nanoparticles restrict microbial growth by promoting oxidative stress and DNA damage. *EXCLI J* 2020;19:492. <https://doi.org/10.17179/EXCLI2020-1244>.
- [140] Lach K, Skrzyniarz K, Takvor-Mena S, Lysek-Gładysińska M, Furmańczyk P, Barrios-Gumiel O, et al. Endolysin CHAP domain-carbosilane metaliodendrimer complexes with triple action on Gram-negative bacteria: Membrane destabilization, reactive oxygen species production and peptidoglycan degradation. *Int J Biol Macromol* 2024;278. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134634>.
- [141] Hosnedlova B, Kabanov D, Kepinska M, Narayanan VHB, Parikesi AA, Fernandez C, et al. Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Bacterial Biofilm Changes in *S. aureus* and *E. coli*. *Nanomaterials* 2022;12:2183. <https://doi.org/10.3390/NANO12132183>.
- [142] Fu X, Rehman U, Wei L, Chen ZS, Abourehab MAS, Kesharwani P, et al. Silver-dendrimer nanocomposite as emerging therapeutics in anti-bacteria and beyond. *Drug Resist Updat* 2023;68:100935. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2023.100935>.
- [143] Vassallo A, Silletti MF, Faraone I, Milella L. Nanoparticulate Antibiotic Systems as Antibacterial Agents and Antibiotic Delivery Platforms to Fight Infections. *J Nanomater* 2020;2020:6905631. <https://doi.org/10.1155/2020/6905631>.
- [144] Kowalczyk P, Szymczak M, Maciejewska M, Laskowski Ł, Laskowska M, Ostaszewski R, et al. All That Glitters Is Not Silver—A New Look at Microbiological and Medical Applications of Silver Nanoparticles. *Int J Mol Sci* 2021;22:854. <https://doi.org/10.3390/IJMS22020854>.
- [145] Hou J, Wu Q, Xiong R, Malakar PK, Zhu Y, Zhao Y, et al. A Standardized Mouse Model for Wound Infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* 2024;25:11773. <https://doi.org/10.3390/IJMS252111773>.
- [146] Pryshchepa O, Pomastowski P, Rafińska K, Gołębiowski A, Rogowska A, Monedeiro-Milanowski M, et al. Synthesis, Physicochemical Characterization, and Antibacterial Performance of Silver—Lactoferrin Complexes. *Int J Mol Sci* 2022;23:7112. <https://doi.org/10.3390/IJMS23137112>.
- [147] Corbo C, Molinaro R, Parodi A, Toledano Furman NE, Salvatore F, Tasciotti E. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nanomedicine* 2015;11:81. <https://doi.org/10.2217/NNM.15.188>.

8. Spis rycin i tabel

Rycina 1 Oś czasu odkrycia antybiotyków i rozwój oporności bakterii	14
Rycina 2 Schemat budowy LPS	16
Rycina 3 Porównanie budowy ściany komórkowej bakterii (A) Gram-dodatnich i (B) Gram-ujemnych	17
Rycina 4 Schemat przedstawiający formowanie się biofilmu bakteryjnego.	21
Rycina 5 Schemat budowy tkanki skórnej.....	23
Rycina 6 Schemat układu tkanki skórnej z poszczególnymi warstwami	24
Rycina 7 Schemat struktury dendrymeru	26
Rycina 8 (A) Struktura przestrzenna endolizyny (B) Schemat komponentów peptydoglikanu	29
Rycina 9 Proponowany podwójny mechanizm działania kompleksu dendrymeru i endolizyny wobec bakterii Gram-ujemnych.	30
Rycina 10 Schemat struktury badanych dendrymerów karbokrzemowych.	33
Rycina 11 Gęstość optyczna (OD_{600}) wzrostu bakterii w obecności rosnących stężeń dendrymerów.....	43
Rycina 12 Permeabilizacja zewnętrznej błony bakteryjnej przez wybrane stężenia dendrymerów.....	44
Rycina 13 Degradacja peptydoglikanu przez endolizynę w obecności dendrymerówm.	45
Rycina 14 Morfologia dendrymerów i w połączeniu z endolizyną w obrazie transmisyjnej mikroskopii elektronowej.....	48
Rycina 15 Procentowy udział wielkości dendrymerów i w połączeniu z endolizyną.....	49
Rycina 16 Gęstość optyczna (OD_{600}) wzrostu bakterii w obecności stężeń dendrymerów (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) wraz z endolizyną (1 i 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mierzona przy 600 nm po 24 godzinnej inkubacji.	50
Rycina 17 Produkcja reaktywnych form tlenu przez bakterie w obecności dendrymerów (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i endolizyny (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).....	51
Rycina 18 Fluorescencyjne obrazy mikroskopowe z badania LIVE/DEAD TM BacLight TM Bacterial Viability Kit bakterii po działaniu dendrymerów i endolizyny	52
Rycina 19 Fluorescencyjne obrazy mikroskopowe z badania HADA	53
Rycina 20 Obrazy SEM morfologii bakterii.....	54
Rycina 21 Obrazy TEM morfologii bakterii po działaniu dendrymerów i endolizyny.....	55
Rycina 22 Hamowanie tworzenia się biofilmu bakteryjnego mierzono jako absorbancję fioletu krystalicznego w obecności rosnących stężeń dendrymerów.....	57

Rycina 23 Wyniki barwienia żywotności biofilmu FilmTracer™ LIVE/DEAD™ utworzonego <i>in vitro</i> przez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	59
Rycina 24 Wyniki barwienia żywotności biofilmu FilmTracer™ LIVE/DEAD™ utworzonego <i>ex vivo</i> przez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 na skórze wieprzowej.....	61
Rycina 25 Obrazy SEM przedstawiają morfologię biofilmu bakteryjnego utworzonego przez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 na skórze wieprzowej	63
Rycina 26 Histomorfologia skrawków mrożonych niezainfekowanej skóry wieprzowej	65
Rycina 27 Histomorfologia skrawków mrożonych zakażonej skóry wieprzowej z utworzonym przez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 biofilmem.....	67
Rycina 28 Porównanie histomorfologii skrawków mrożonych tkanki skóry wieprzowej niezainfekowanej i zainfekowanej <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
Rycina 29 Żywotność komórek VH10 poddanych działaniu metalodendrymerów	70
Tabela 1 Parametry termodynamiczne dendrymerów z endolizyną.....	46

9. Dorobek naukowy

PUBLIKACJE NAUKOWE

Olena Litvinova, Andy Wai Kan Yeung, Javier Echeverría, Yousef Khader, Md. Mostafizur Rahman, Zafar Said, **Karolina Lach**, Bhupendra Sidar, Anastasios Koulaouzidis, Adeyemi O. Aremu, Conrad V. Simoben, Hemanth Kumar Boyina, Firdous M. Usman, Sheikh Mohammed Shariful Islam, Jayanta Kumar Patra, Gitishree Das, Ganesh Venkatachalam, Hitesh Chopra, Josef Niebauer, Ahmed Fatimi, Alexandros G. Georgakilas, Mohammad Reza Saeb, Doris E. Enow, Kennedy O. Abuga, Michał Ławiński, Yue Qiu, Eliana B. Souto, Guanqiao Li, Hari Prasad Devkota, Weizhi Ma, Jamballi G. Manjunatha, Nikolay T. Tzvetkov, Rupesh K. Gautam, Maima Matin, Olga Adamska, George Koulaouzidis, Farhan Bin Matin, Bodrun Naher Siddiquea, Dongdong Wang, Jivko Stoyanov, Jarosław Olav Horbańczuk, Kamil Wysocki, Emil D. Parvanov, Michel-Edwar Mickael, Artur Józwick, Natalia Ksepka, Smith B. Babiaka, Bey Hing Goh, Tien Yin Wong, Benjamin S. Glicksberg, Laszlo Barna Iantovics, Marcin Łapiński, Artur Stolarczyk, Fabien Schultz, Stephen T. Wong, Ronan Lordan, Faisal A. Nawaz, Rajeev K. Singla, ArunSundar MohanaSundaram, Himel Mondal, Ayesha Juhi, Shaikat Mondal, Merisa Cenanovic, Elisa Opriessnig, Christos Tsagkaris, Ronita De, Siva Sai Chandragiri, Robertas Damaševičius, Marco Cascella, Giuseppe Lisco, Vincenzo Triggiani, Olga Eugenia Disoteo, Atanas G. Atanasov, *Global innovative perspectives and trends on digital health and patient safety: highlights from the #DHPSP2024 networking event*, Exploration of Digital Health Technologies 2025;3:101165, <https://doi.org/10.37349/edht.2025.101165>

Punkty MNiSW: 5, IF=-, IF 5-letni:-

Magdalena Lasak, Małgorzata Łysek-Gładysińska, **Karolina Lach**, Viraj P Nirwan, Dorota Kuc-Ciepluch, Javier Sanchez-Nieves, Francisco Javier de la Mata, Amir Fahmi, Karol Ciepluch, *Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa*, Nanotechnology, Science and Applications, 2025:18 57–70, ISSN 11778903, <https://doi.org/10.2147/NSA.S498942>

Punkty MNiSW: 200, IF=2,4, IF 5-letni:5,3

Karolina Lach, Kinga Skrzyniarz, Małgorzata Łysek-Gładysińska, Oscar Barrios-Gumiel, Samuel Takvor-Mena, Jesus Cano, Javier Sanchez-Nieves, Karol Ciepluch, *Endolysin CHAP domain-metallodendrimers complex with triple action on gram negative bacteria; membrane destabilization, reactive oxygen species production and peptidoglycan degradation*, International Journal of Biological Macromolecules 278 (2024) 134634, ISSN 01418130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134634>

Punkty MNiSW: 100, IF=8,5, IF 5-letni:8,7

Kinga Skrzyniarz, Samuel Takvor-Mena, **Karolina Lach**, Małgorzata Łysek-Gładysińska, Óscar Barrios-Gumiel, Jesús Cano, Karol Ciepluch, *Molecular mechanism of action of imidazolium carbosilane dendrimers on the outer bacterial membrane – From membrane damage to permeability to antimicrobial endolysin*, Journal of Colloid and Interface Science, 665 (2024) 814–824, ISSN 00219797, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2024.03.130>

Punkty MNiSW: 100, IF=9,7, IF 5-letni: 8,9

Maima Matin, Andy Wai Kan Yeung, Tanuj Joshi, Nikolay T. Tzvetkov, Farhan Bin Matin, Nina Strzałkowska, Natalia Ksepka, Kamil Wysocki, Cyprian Tomasik, Michel-Edwar Mickael, Monika Szymańska-Czerwińska, Krzysztof Niemczuk, Magdalena Koszarska, Sara Frazzini, Luciana Rossi, Olga Adamska, Agnieszka Kamińska, Marcin Łapiński, Artur Stolarczyk, Vasil Radoslavov Pirgozliev, Małgorzata Łysek-Gładysińska, Anna Wiczorek, **Karolina Lach**, Michał Ławiński, Ricardo Lagoa, Reda El Boukhari, Ahmed Fatimi, Giuseppe Lisco, Giuseppina Piazzolla, Vincenzo Triggiani, Sławomir Petrykowski, Danuta Siwiec, Tomasz M. Karpiński, Andrzej Półtorak, Agnieszka Wierzbicka, Joanna Marchewka, Jarosław Olav Horbańczuk, Artur Józwik, Atanas G. Atanasov, *Ginger: a total-scale analysis of the scientific literature on a widely used spice and phytotherapeutic*, Animal Science Papers and Reports vol. 42 (2024) no. 4, 349-364, ISSN 08604037, <https://doi.org/10.2478/aspr-2023-0042>

Punkty MNiSW: 100, IF=1,1, IF 5-letni: 0,9

Kinga Skrzyniarz, Javier Sanchez-Nieves, F. Javier de la Mata, Małgorzata Łysek-Gładysińska, **Karolina Lach**, Karol Ciepluch, *Mechanistic insight of lysozyme transport through the outer bacteria membrane with dendronized silver nanoparticles for peptidoglycan degradation*, International Journal of Biological Macromolecules, 237 (2023) 124239, ISSN 01418130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124239>

Punkty MNiSW: 100, IF=7,7, IF 5-letni:8,7

Suma IF wszystkich publikacji: **29,4**

Suma IF 5-letniego wszystkich publikacji: **32,5**

Suma punktów MNiSW wszystkich publikacji: **605**

KOMUNIKATY NAUKOWE

- 30.06 - 04.07.2025 *EBSA 2025, 15th European Biophysics CONGRESS, Rzym, Włochy*
Karolina Lach, Samuel Takvor-Mena, Oscar Barrios-Gumiel, Javier Sanchez-Nieves, Piotr Furmańczyk, Małgorzata Łysek-Gładysińska, Karol Ciepluch
Inhibition of bacterial biofilm formation by carbosilane dendrimers and their complex with CHAP domain endolysin - in vitro and ex vivo approaches with cytotoxicity analysis on eukaryotic cells (poster)
- 06.07.2024 7TH PhD STUDENTS FORUM OF JAN KOCHANOWSKI UNIVERSITY IN KIELCE
Endolysin CHAP domain-metallodendrimers complex with triple action on Gram-negative bacteria: membrane destabilization, reactive oxygen species production and peptidoglycan degradation (prezentacja ustna)
- 03-05.07.2024 *RICT 2025, 58th International Conference on Medicinal Chemistry, Bordeaux, Francja*
Magdalena Lasak, **Karolina Lach**, Karol Ciepluch, Małgorzata Łysek-Gładysińska, Viraj Pratap Nirwan, Amir Fahmi, Francisco Javier de la Mata, Javier Sanchez-Nieves, Rafael Gomez
Development of a nanomaterial based on nanofibers modified with antibacterial proteins (poster)

- 01-02.06.2023 6TH PhD STUDENTS FORUM OF JAN KOCHANOWSKI UNIVERSITY IN KIELCE
Dendritic nanoparticles to enhance the antibacterial properties of phage-derived endolysin against Gram-negative bacteria. Assessment of antibacterial properties (prezentacja ustna)
- 12-14.04.2023 *BioNanoMed 2023 Nanotechnology enables Personalized Medicine, 11th International Congress, Graz, Austria*
Karolina Lach, Oscar Barrios, Samuel Takvor-Mena, Jesús Cano, Javier Sanchez-Nieves, Karol Ciepluch
Antibacterial properties of the complex of endolysin and metallogenitrimers against Pseudomonas aeruginosa PAOI (poster)

STAZE NAUKOWE

- 18.09 - Department Organic Chemistry and Inorganic Chemistry, University of Alcala,
16.10.2023. Alcalá de Henares, Hiszpania
- 18.07 - Laboratory of Quality of Raw Materials and Products of Animal Origin and Feed
19.08.2022 of the Institute of Genetics and Biotechnology of the Polish Academy of Sciences,
Academy of Sciences, Jastrzębiec, Polska

PROJEKTY NAUKOWE

- 11.2022-07.2025 **SONATA-17, 2021/43/D/NZ6/00560** *Nanocząstki dendrytyczne jako czynnik wzmacniający właściwości przeciwbakteryjne endolizyn pochodzenia fagowego przeciwko bakteriom Gram-ujemnym. Ocena właściwości przeciwbakteryjnych*
Kierownik: dr hab. Karol Ciepluch
- 17.02-31.12.2025 Kierownik projektu realizowanego w ramach funduszy wewnętrznych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, numer projektu: SUPD.RN.25.025 *Aktywny udział w konferencji naukowej*
- 19.02-31.12.2024 Kierownik projektu realizowanego w ramach funduszy wewnętrznych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, numer projektu: SUPD.RN.24.021 *Aktywny udział w konferencji naukowej*
- 08.03-31.12.2023 Członek zespołu badawczego projektu realizowanego w ramach funduszy wewnętrznych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, numer projektu: SUPB.RN.23.243 *Zmiany biochemiczne i morfologiczne w wątrobie kurcząt żywionych różnymi formami i poziomami selenu*
Kierownik: dr Małgorzata Łysek-Gładysińska

KURSY / SZKOLENIA / WARSZTATY

17.06.2025	Szkolenie „STRATEG – jako narzędzie do analizy rozwoju przestrzennego” prowadzone przez Urząd Statystyczny w Kielcach
27.03.2025	Warsztaty „Rozwój kariery naukowej – narzędzia, techniki, źródła finansowania”, prowadzone w ramach wydarzenia „Na styku nauki i biznesu”, Kielce
27-28.10.2022	Warsztaty Transmisyjnej Mikroskopii Elektronowej „Obrazowanie i preparatyka próbek”, Rzeszów, Polska
23.11.2022	Szkolenie stacjonarne z obsługi mikroskopu elektronowego Tecna Spirit 120 kV, Labsoft

NAGRODY

06.06.2024	Nagroda PRODOMUS za wystąpienie ustne podczas 7 TH PhD STUDENTS FORUM OF JAN KOCHANOWSKI UNIVERSITY IN KIELCE w dyscyplinie nauk biologicznych
01-02.06.2023	Wyróżnienie nagrody PRODOMUS za wystąpienie ustne podczas 6 TH PhD STUDENTS FORUM OF JAN KOCHANOWSKI UNIVERSITY IN KIELCE w dyscyplinie nauk biologicznych

DZIAŁALNOŚĆ NA RZECZ ŚRODOWISKA AKADEMICKIEGO

18.01.2025	Olimpiada Biologiczna – Członek Komitetu Okręgowej Olimpiady Biologicznej – przeprowadzenie wykładu dla nauczycieli uczestników Olimpiady
10.01.2025	Noc Biologów – pokaz popularnonaukowy „Nano vs Bakterie - walka pod mikroskopem fluorescencyjnym”, Zakład Biologii Medycznej, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
06.06.2024	Członek Komitetu Organizacyjnego Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej VII Forum Doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach
12.01.2024	Noc Biologów – pokaz popularnonaukowy „Zastosowanie transmisyjnej mikroskopii elektronowej w badaniach biologicznych”, Zakład Biologii Medycznej, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
01-02.06.2023	Członek Komitetu Organizacyjnego Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej VI Forum Doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach
13.01.2023	Noc Biologów – pokaz popularnonaukowy „Zastosowanie transmisyjnej mikroskopii elektronowej w badaniach biologicznych”, Zakład Biologii Medycznej, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
14.01.2022	Noc Biologów – pokaz popularnonaukowy „Zastosowanie transmisyjnej mikroskopii elektronowej w badaniach biologicznych”, Zakład Biologii Medycznej, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

10. Oświadczenie

Kielce, dn. 29.12.2025

.....Karolina Lach.....

Imię i nazwisko doktoranta

PESEL

..Nauki ścisłe i przyrodnicze...

Sekcja/dyscyplina

.....Nauki biologiczne.....

Dyscyplina naukowa/artystyczna

OŚWIADCZENIE

Przedkładając rozprawę doktorską pod tytułem

Badanie właściwości przeciwbakteryjnych nanocząstek dendrytycznych wzmacniających działanie endolizyn fagowych przeciwko bakteriom Gram-ujemnym – ocena aktywności przeciwbakteryjnej i działania cytotoksycznego w badaniach *in vitro*

oświadczam, że:

- pracę napisałam/napisałem samodzielnie,
- praca nie stanowi istotnego fragmentu lub innych elementów cudzego utworu,
- praca nie narusza żadnych innych istniejących praw autorskich,
- wykorzystane w pracy materiały źródłowe zastosowane zostały z zachowaniem zasad prawa cytatu,
- przedstawiona praca w całości ani też w części nie była wcześniej podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora,
- wersja elektroniczna (na nośniku elektronicznym) pracy jest tożsama z wersją drukowaną.

29.12.2025 Karolina Lach

data i czytelny podpis doktoranta