

AUTOREFERAT

Imię i Nazwisko: Michał Stanisław Arabski

Posiadane stopnie naukowe:

- Dyplom magistra biologii, specjalność biochemia i genetyka uzyskany na Uniwersytecie Łódzkim w 2002 roku
- Dyplom magistra fizjoterapii uzyskany na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi w 2004 roku
- Dyplom doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia uzyskany na Uniwersytecie Łódzkim w 2005 roku.

Dotychczasowe zatrudnienie:

- 2002-2003 – asystent w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego
- od 2005 – adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach
- 2009-2010 – starszy wykładowca na Wszechnicy Świętokrzyskiej w Kielcach

Życiorys

W 1998 podjąłem naukę na kierunku Biologia Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. W latach 1999-2004 studiowałem na Wydziale Fizjoterapii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W 2002 roku uzyskałem tytuł magistra biologii w zakresie biochemii i genetyki. Pracę magisterską wykonałem w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego na temat „Oddziaływanie mutagenów, antymutagenów i komutagenów środowiskowych z DNA limfocytów krwi obwodowej i komórek błony śluzowej jelita grubego” pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Błasiaka. W roku 2004 uzyskałem tytuł magistra fizjoterapii na podstawie pracy „Ocena wad postawy ciała u dzieci ze Szkoły Podstawowej w Zbludowicach” pod kierunkiem prof. dr hab. Krystiana Żołyńskiego. W roku 2002 podjąłem naukę w ramach Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Cytogenetyki, Genetyki Molekularnej i Radiobiologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ. W latach 2002-2003, w trakcie studiów doktoranckich, byłem zatrudniony na stanowisku asystenta w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego. W roku 2005 uzyskałem tytuł doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia na podstawie rozprawy doktorskiej na temat „Uszkodzenia i naprawa DNA oraz działanie amoksycyliny w infekcji *Helicobacter pylori*” pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Błasiaka. W październiku 2005 zostałem mianowany na stanowisko adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach.

I. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Nowe zastosowania interferometrii laserowej w badaniach biomolekuł

Na osiągnięcie to składa się cykl 7 prac opublikowanych w czasopiśmie, których sumaryczny IF (według roku publikacji, dla publikacji z 2011 i 2012 przyjęto IF z 2010 r.) wynosi **12.538**, a liczba punktów MNiSW (punktacja czasopiśm naukowych MNiSW z 2012) wynosi **189**.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Współczynnik oddziaływania *impact factor* podano dla roku w którym ukazała się publikacja, punktację Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego z roku 2012, natomiast ilość cytowań podano według bazy Web of Knowledge bez autocytowań. Oświadczenia współautorów publikacji zawarte są w Załączniku 9.

1. **Arabski M**, Wąsik S, Dworecki K, Kaca W (2007) Laser interferometric determination of ampicillin and colistin transfer through cellulose biomembrane in the presence of *Proteus vulgaris* O25 lipopolysaccharide, *Journal of Membrane Sciences*, 299, 268-275. (IF=2.432, pkt. MNiSW=45, ilość cytowań=3)

Mój udział w wyżej wymienionej publikacji dotyczył koncepcji pracy, przeprowadzenia części doświadczalnej (precypitacja LPS/kolistyna, technika Dot blot, metoda interferometrii laserowej, analiza graficzna programem imageJ), opisu procedur w rozdziale materiały i metody, wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników oraz przygotowania manuskryptu do publikacji. Ogółem mój udział określam na 65 %.

2. **Arabski M**, Wąsik S, Dworecki K, Kaca W (2009) Laser interferometric and cultivation methods for measurement of colistin/ampicilin and saponin interactions with smooth and rough of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides and cells *Journal of Microbiological Methods* 77, 179-183. (IF=2.427, pkt. MNiSW=25, ilość cytowań=1)

Mój udział w wyżej wymienionej publikacji dotyczył koncepcji pracy, przeprowadzenia części doświadczalnej (precypitacja LPS/kolistyna w obecności saponiny, mikrobiologiczne techniki hodowlane, metoda interferometrii laserowej), opisu procedur w rozdziale materiały i metody, wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników oraz przygotowania manuskryptu do publikacji. Ogółem mój udział określam na 65 %.

3. **Arabski M**, Davydova VN, Wąsik S, Reunov AV, Lapshina LA, Solov'eva TF, Yermak I M, Kaca W (2009) Binding and biological properties of lipopolysaccharide *Proteus vulgaris* O25 (48/57)-chitosan complexes. *Carbohydrate Polymers* 78, 481-487. (IF=3.167, pkt. MNiSW=40, ilość cytowań=0)

Mój udział w wyżej wymienionej publikacji dotyczył koncepcji pracy, przeprowadzenia części doświadczalnej (precypitacja, test LAL, metoda interferometrii laserowej), opisu procedur w rozdziale materiały i metody, wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników oraz przygotowania manuskryptu do publikacji. Ogółem mój udział określam na 45 %.

4. **Arabski M**, Wąsik S, Piskulak P, Gózdź N, Ślęzak A, Kaca W (2011) Analiza dyfuzji antybiotyków z żelu agarozowego metodami spektrofotometrii i interferometrii laserowej. *Polimery w Medycynie* 41, 25-32. (pkt. MNiSW=5, ilość cytowań=0)

Mój udział w wyżej wymienionej publikacji dotyczył koncepcji pracy, udział w części doświadczalnej, opisu procedur w rozdziale materiały i metody, wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników oraz przygotowania manuskryptu do publikacji. Ogółem mój udział określam na 60 %.

5. **Arabski M**, Wąsik S, Grześkiewicz H, Drulis-Kawa Z, Gubernator J, Kaca W (2012) Laser interferometric determination of liposome diffusion through artificial membranes, rozdział nr 14 w monografii pt. *Interferometry - Research and Applications in Science and Technology*, ISBN: 978-953-51-0403-2 (pkt. MNiSW=24, ilość cytowań=0)

Mój udział w wyżej wymienionej publikacji dotyczył koncepcji pracy, udział w części doświadczalnej (analiza interferometryczna dyfuzji liposomów przez membrany), opisu procedury badawczej, wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników oraz przygotowania manuskryptu do publikacji. Ogółem mój udział określam na 64 %.

6. **Arabski M**, Węgierek-Ciuk A, Grzegorz Czerwonka, Lankoff A, Kaca W (2012) Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Article ID 286216. (IF=2.436, pkt. MNiSW=20, ilość cytowań=0)

Mój udział w wyżej wymienionej publikacji dotyczył koncepcji pracy, przeprowadzenia części doświadczalnej (efekt saponiny na wzrost *E. coli*, test MTT, ocena właściwości apoptotycznych saponiny wobec komórek CHO), opisu procedur w rozdziale materiały i metody, wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników oraz przygotowania manuskryptu do publikacji. Ogółem mój udział określam na 72 %.

7. **Arabski M**, Fudała R, Wąsik S, Koza A, Futoma-Kołocho B, Bugla-Płoskońska G, Kaca W (2012) The presence of anti-LPS antibodies, human serum activity against *P. mirabilis* S/R forms and *TLR4* (Thr399Ile) gene polymorphism in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry* 45, 1374-1382. (IF=2.076, pkt. MNiSW=30, ilość cytowań=0)

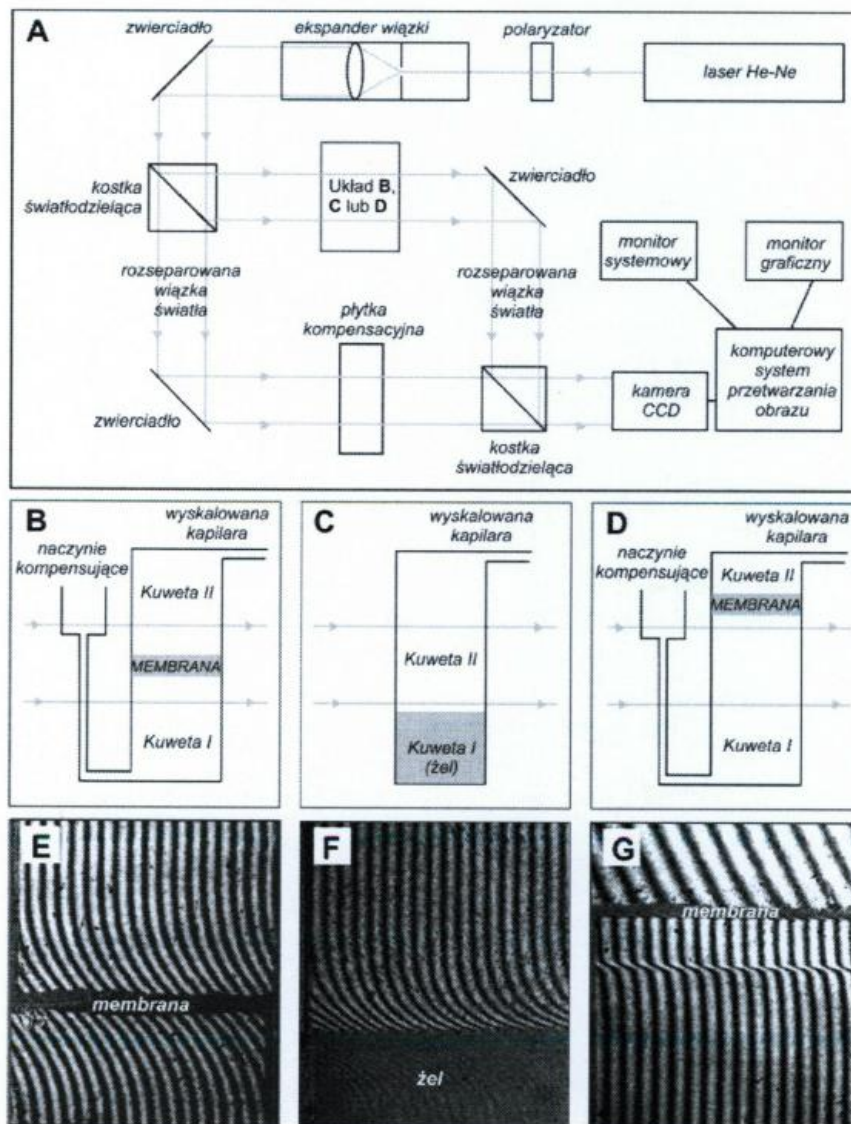
Mój udział w wyżej wymienionej publikacji dotyczył koncepcji pracy, przeprowadzenia części doświadczalnej (ocena poziomu przeciwciał testem ELISA, test LAL, ocena zmienności genetycznej techniką RFLP-PCR, wykonanie pomiarów interferometrycznych), opisu procedur w rozdziale materiały i metody, wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników oraz przygotowania manuskryptu do publikacji. Ogółem mój udział określam na 72 %.

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

C. 1 Wprowadzenie

Właściwości optyczne substancji chemicznych są obecnie szeroko wykorzystywane do ich oznaczeń w różnych dyscyplinach naukowych. Instrumentalne metody optyczne oparte na pomiarze selektywnej absorpcji promieniowania (absorbjometria), kącie skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego (polarymetria) czy też natężenia promieniowania fluorescencyjnego emitowanego przez substancję (fluorymetria) stanowią kanon standartowych technik analitycznych stosowanych w naukach biologicznych. Jedną z technik pomiarowych stosowanych w naukach fizycznych, która może mieć nowe zastosowanie w biologii jest interferometria laserowa. Metoda ta oparta na zjawisku interferencji fal pozwala na ilościowe oznaczanie substancji poprzez pomiar różnicy współczynników załamania światła substancji badanej i wzorcowej. Ponadto, właściwości promieniowania generowanego przez laser tj. mała rozbieżność wiązki, wąskie pasmo spektralne oraz wysoki stopień koherencji wpływają pozytywnie na czułość oznaczeń [1].

W swojej pracy naukowej przedstawionej do oceny wykorzystałem unikalny układ interferometryczny (Ryc. 1ABE) skonstruowany w Zakładzie Fizyki Molekularnej Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach przez dr Kazimierza Dworeckiego przy współpracy z firmą Optel Sp. z o.o. Powyższy układ wykorzystano wcześniej do badań fizycznych mających na celu charakterystykę przepuszczalności membran i analizę ewolucji warstwy stężeniowej w obszarach przymembranowych [2-4], dyfuzji anomalnej substancji w strukturze żelu [5], oceny zaburzeń hydrodynamicznych na efektywność proces dyfuzji [6] oraz w celu wyznaczenia liczby Rayleigh'a [7]. Poniżej przedstawiono zasadę działania powyższego systemu pomiarowego, który wykorzystałem w pracach stanowiących moje osiągnięcie naukowe. Wiązka światła monochromatycznego o długości fali $\lambda=632.8$ nm jest emitowana przez laser He-Ne typu HN 40P firmy Zeiss i ulega osłabieniu w wyniku przejścia przez polaryzator. Następnie po przekształceniu w płaską falę koherentną o średnicy 80 mm dzięki pinholowi wchodzącemu w skład ekspandera pada na kostkę światłdzielącą i jest rozseparowana na dwie wiązki. Pierwsza z nich przechodzi przez układ membranowy (Ryc. 1B, 1D) lub żelowy (Ryc. 1C). Natomiast druga wiązka jest kierowana przez zwierciadło na płytkę kompensacyjną. W wyniku zastosowania kostki światłdzielącej doprowadza się do interferencji obu wiązek. Powstały obraz interferencyjny (interferogram; Ryc. 1E, 1F, 1G) jest rejestrowany przez kamerę CCD i przedstawiony na monitorze graficznym. Komputerowy system przetwarzania obrazu wraz z dedykowanym dla powyższego układu pomiarowego oprogramowaniem pozwala na matematyczną analizę interferogramów przedstawioną na monitorze systemowym. Ponadto wykonując serię zdjęć obrazów interferencyjnych w czasie i przeprowadzając ich analizę matematyczną możliwa jest analiza ilościowa kinetyki uwalniania substancji w czasie rzeczywistym i rozkład jej stężenia w obszarach przymembranowych/powierzchni żelu.



Ryc. 1 Schemat interferometru laserowego (A) oraz zastosowanych w pracach doświadczalnych układów: membranowego I (B), żelowego (C), membranowego II (D) wraz z przykładowymi interferogramami, odpowiednio, E, F, G. Opis zasady pomiaru oraz budowy aparatury pomiarowej w przedstawiono w tekście.

Wynikiem interferencji wiązek światła przechodzących przez ośrodki o różnych współczynnikach ich załamania jest różnica faz pomiędzy nimi, która powoduje przesunięcie prążków interferencyjnych. Program komputerowy skanuje obszary w dowolnej odległości od membrany lub powierzchni żelu z rozdzielczością zastosowanej kamery CCD i określa w każdym punkcie odchylenie prążka od jego biegu prostoliniowego. Analizując ich zakrzywienie można wyznaczyć rozkład stężenia substancji w dowolnej odległości x od membrany/powierzchni żelu ($C(x,t)$). Podstawą określenia wartości $C(x,t)$ jest proporcjonalna zależność pomiędzy zmianami współczynnika załamania roztworu a odpowiadającym im zmianom stężenia substancji. Współczynnik załamania wodnych roztworów substancji wyznacza się refraktometrycznie. Na podstawie uzyskanych danych eksperymentalnych

możliwe jest określenie parametrów transportu poprzez analizę profili stężeniowych, jak grubość warstwy stężeniowej, ilość substancji, strumień, współczynnik przepuszczalności membrany, współczynnik dyfuzji, jak również ewolucję czasową stężenia.

Dane literaturowe dotyczące zastosowania interferometrii laserowej w naukach biologicznych są obecnie ograniczone. Dotychczas analizy te stosowane były w mikrobiologii jedynie w celu analizy aktywności metabolicznej bakterii rodzaju *Mycobacterium* [8,9]. Celem moich badań było nowe zastosowanie techniki interferometrii laserowej w naukach biologicznych. Możliwość analizy w czasie rzeczywistym dyfuzji pomiędzy układami nie mieszającymi się, analiza oparta na zmianie współczynnika załamania roztworu oraz zastosowanie elementu systemu pomiarowego pozwalającego na przeprowadzenie pomiarów w temperaturze 37°C skłoniły mnie do zastosowania tej techniki w analizie oddziaływania biomolekuł opartym na zjawisku dyfuzji. Przedmiotem tych badań były antybiotyki (kolistyna, ampicylina, ciprofloksacyna, streptomycyna), zdefiniowane chemiczne lipopolisacharydy *Proteus* sp. formy S i R oraz chitosan. Technikę tę zastosowałem również do oceny dyfuzji w czasie rzeczywistym antybiotyków oraz liposomów kationowych, jako ich potencjalnych nośników, przez membrany o znaczeniu medycznym.

Czynniki, które wpłynęły na wybór związków chemicznych do analiz ich interakcji z zastosowaniem techniki interferometrii laserowej to ich szeroko rozumiane znaczenie medyczne, specyficzne właściwości biofizyczne opisane poniżej oraz unikalność wiążąca się z ich charakterystyką strukturalną. W pracach zastosowałem zdefiniowane strukturalnie lipopolisacharydy oraz chitosan, wyizolowany oraz scharakteryzowany pod kątem biochemicznym przez zespół prof. I. Yermak z Instytutu Chemii Bioorganicznej Rosyjskiej Akademii Nauk we Władywostoku w ramach współpracy międzynarodowej.

Istotną zaletą techniki interferometrii laserowej jest możliwość analizy oddziaływania związków chemicznych tworzących roztwory quasi-rzeczywiste jak np. lipopolisacharydy bakteryjne czy liposomy. Badania oddziaływań w układach koloidalnych utworzonych przez związki o właściwościach amfifilowych są znacznie utrudnione przy zastosowaniu technik typowych dla nauk biologicznych. Obecnie wykorzystywane w biologii instrumentalne metody analityczne wymagają stosowania układów jednofazowych o dyspersji cząsteczkowej. Hydrofobowość i związana z nią rozpuszczalność substancji znacznie zawęża możliwości wyboru odpowiedniej metody analitycznej. W przypadku interferometrii obecność ugrupowań chemicznych nadających właściwości amfifilowe substancji zwiększa czułość pomiaru. Substancje amfifilowe charakteryzuje wyższy w stosunku do związków hydrofilowych współczynnik załamania roztworu, którego zmiana jest podstawą oznaczeń interferometrycznych. Interferometria laserowa może więc być alternatywą dla analiz ilościowych związków słabo absorbujących promieniowanie, zwłaszcza w oznaczeniach których stosuje się sondy np. fluorescencyjne w celu zwiększenia czułości pomiaru. Tak utworzone kompleksy różnią się jednak pod względem fizyko-chemicznym (masa, rozpuszczalność, ładunek) od form natywnych wyznakowanych substancji. Kompleksy te mogą być przedmiotem analizy ilościowej, jednak ocena zmian ich stężenia w czasie np. w wyniku transportu przez membrany jest problematyczna. Przedstawione powyżej założenia naukowe i ich weryfikacja doświadczalna stały się podstawą mojej działalności naukowej w

ramach współpracy z dr Sławomirem Wąsikiem oraz dr Kazimierzem Dworeckim z Zakładu Fizyki Molekularnej UJK. Dodatkowo, uzyskane wyniki były weryfikowane z zastosowaniem mikrobiologicznych metod hodowlanych, immunochemicznych, cytotoksycznych oraz spektrofotometrycznych.

W pracy doświadczalnej wykorzystałem zarówno układ membranowy jak również żelowy. Układ membranowy (Ryc. 1BD) złożony z dwóch kuwet kwarcowych wykonanych ze szkła o wysokim stopniu jednorodności, przedzielono horyzontalnie membraną przez którą przechodziła stycznie do granicy ośrodków wiązka światła laserowego. Powyższy układ pozwolił na charakterystykę kinetyki dyfuzji antybiotyków oraz liposomów przez membrany celulozowe stosowane jako opatrunki w leczeniu trudno gojących się ran (Biofill, firmy Fibrocel Biotechnological Products Ltd), wykorzystywany w urządzeniach hemodializacyjnych (Nephrophan) oraz membrany nukleoporowe o różnej średnicy porów (Ryc. 1B). Ponadto, moim nowatorskim rozwiązaniem jest zastosowanie układu membranowego do rozdzielania faz wodnego roztwór lipopolisacharydów w celu określenia jego hydrofobowości (Ryc. 1D).

Układ żelowy (Ryc. 1C) stanowił modyfikację powyższego zestawu poprzez wypełnienie jednej z kuwet roztworem żelowym mieszaniny LPS i/lub antybiotyków. Stabilizacja agregatów LPS-antybiotyków w strukturze żelu agarozowego pozwoliła na ocenę wolnej puli antybiotyku nie związanej z heteropolimerem poprzez analizę interferometryczną jego dyfuzji z żelu i pośrednio ilość związanej z lipopolisacharydem (analiza różnicowa). Zastosowany przez mnie układ żelowy w celu badania oddziaływania biomolekuł z zastosowaniem interferometrii laserowej stanowi istotne moje osiągnięcie naukowe. Ponadto, układ ten wykorzystałem w celu analizy porównawczej dyfuzji/uwalniania antybiotyków z żelu za pomocą technik interferometrii laserowej oraz spektrofotometrycznej.

Wynikiem mojej pracy naukowej stanowiącej podstawę do oceny jest cykl 7 publikacji, których wspólnym mianownikiem jest nowatorskie zastosowanie techniki interferometrii laserowej w celu badania oddziaływań biomolekuł. Skróconą charakterystykę poszczególnych prac przedstawiono w dalszej części rozprawy.

C. 2. 1. Ocena oddziaływania lipopolisacharydu ze związkami aktywnymi biologicznie

Jednym z istotnych czynników chorobotwórczości bakterii Gram-ujemnych jest lipopolisacharyd (LPS, endotoksyna). LPS jest heteropolimerem zbudowanym z: ufosforylowanego glikolipidu (lipid A) oraz oligosacharydu rdzeniowego, do którego dołączony jest wielocukier O-swoisty (antygen O) [10]. Wielocukier O-swoisty bezpośrednio oddziałuje ze środowiskiem zewnętrznym i zawiera od kilku do kilkudziesięciu powtarzających się podjednostek oligosacharydowych (2-8 reszt monosacharydowych) połączonych liniowo bądź w sposób rozgałęziony. Ponadto w części O-swoistej wielu gatunków bakterii Gram-ujemnych mogą występować składniki niecukrowe jak: fosforany, aminokwasy, rybitol, glicerol, kwas mlekowy czy kwas pirogronowy [10,11].

Na chorobotwórczość bakterii Gram-ujemnych związaną z aktywnością LPS składają się zarówno mechanizmy umożliwiające skuteczną kolonizację organizmu gospodarza tj. bariera ograniczająca wniknięcie związków hydrofobowych, w tym antybiotyków, do komórki bakteryjnej, ochrona przed litycznym działaniem zaktywowanego dopełniacza czy ograniczenie

skutecznej fagocytozy przez komórki żerne, jak również efekt cytotoksyczny regionu LPS – lipidu A. LPS uwolniony ze ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych m in. pod wpływem antybiotyków o właściwościach detergentów, aktywuje szereg reakcji biochemicznych m in. prowadzi do aktywacji cytokin prozapalnych (czynnika martwicy nowotworów TNF α , interleukin 1, 6, 8, interferonu γ), fosfolipidów (tromboksanu A2, leukotrienów, czynnika aktywacji płytek krwi PAF), proteaz (elastazy, katepsyny) oraz reaktywnych form tlenu [11,12].

Cząsteczki LPS uwolnione ze ściany komórkowej mają silną tendencję do tworzenia przestrzennych struktur lamellarnych, kubicznych oraz form mieszanych, co wynika z ich budowy chemicznej [13,14]. Lipid A jest strukturą hydrofobową zbudowaną najczęściej z dwucukru β -D-glukozamino-(1-6)- α -D-glukozaminy podstawionego hydroksylowymi pochodnymi kwasów tłuszczowych, natomiast heterogeny wielocukier O-swoisty charakteryzują zdecydowanie silniejsze właściwości hydrofilowe. Efektem powyższego zróżnicowania strukturalnego w obrębie cząsteczki LPS jest jej charakter amfifilowy warunkujący formowanie powyższych struktur przestrzennych i tworzenie układów koloidowych o różnym stopniu dyspersji. Powyższa heterogenność zarówno w obrębie budowy cząsteczki LPS, jak również rodzaju i stopnia agregacji decyduje o wyborze techniki analitycznej [15].

Celem pierwszej z prac składających się na moje osiągnięcie naukowe była ocena interferometryczna dyfuzji antybiotyków (kolistyny i ampicyliny) z kompleksów utworzonych z LPS wyizolowanym ze szczepu *Proteus vulgaris* O25 zarówno w formie natywnej, jak również zmodyfikowanym chemicznie do postaci O-deacetylowanej:

1. Arabski M, Wąsik S, Dworecki K, Kaca W (2007) Laser interferometric determination of ampicilin and colistin transfer through cellulose biomembrane in the presence of *Proteus vulgaris* O25 lipopolysaccharide, *Journal of Membrane Sciences*, 299, 268-275.

Badania interferometryczne dyfuzji antybiotyków w obecności LPS pozwoliły pośrednio na wnioskowanie o oddziaływaniu obu komponentów w zastosowanym w powyższej pracy układzie badawczym. W pracy zastosowano dwa antybiotyki: kolistynę o dobrze poznanej jej interakcji z lipopolisacharydem oraz ampicylinę nie tworzącą kompleksów [16,17]. Kolistyna należąca do grupy polimyksyn charakteryzuje się właściwościami amfifilowymi za które odpowiada hydrofilowy deka-peptyd oraz reszty kwasów tłuszczowych [18]. Taka budowa chemiczna sprawia, iż antybiotyk ten jest związkiem powierzchniowo czynnym, który oddziałując z fosfolipidami błony komórkowej, prowadzi do jej dezintegracji i w efekcie śmierci komórki bakteryjnej. Efektem oddziaływania elektrostatycznego reszt fosforanowych w lipidzie A, dodatnio naładowanych reszt aminowych deka-peptydu oraz interakcji pomiędzy resztami acylowymi kwasów tłuszczowych jest wytworzenie kompleksów LPS-kolistyna i reorientacja tak powstałych agregatów. Oddziaływania te w układzie przestrzennym przedstawia symulacja jej dynamiki molekularnej zaproponowana w 2009 roku przez Mares'a i wsp. [19].

Cechą charakterystyczną struktury chemicznej LPS bakterii rodzaju *Proteus* analizowanych w powyższej pracy jest podstawienie reszty fosforanowej w strukturze lipidu A przez 4-amino-

4-deoksy-L-arabinozę. Związek ten znacząco obniża stopień interakcji LPS z kolistyną, czego efektem biologicznym jest naturalna oporność szczepów *Proteus* sp. na powyższy antybiotyk [20,21]. W przypadku analiz interferometrycznych z zastosowaniem natywnej formy LPS *P. vulgaris* O25 nie zaobserwowałem oddziaływania tej formy z antybiotykiem w analizowanym zakresie stężeń, co potwierdziły badania spektrofotometryczne tworzenia precypitatów LPS-kolistyna. Ponadto, usunięcie estrowo związanych trzech z pięciu reszt kwasu tłuszczowego z lipidu A zwiększa rozpuszczalność LPS (forma O-deacetylowana), który w efekcie nie tworzy agregatów. Powyższa modyfikacja chemiczna LPS uniemożliwia analizę formowania jego kompleksów z antybiotykiem opartą na pomiarze stopnia precypitacji. Jednak na podstawie badań opartych na technice interferometrii laserowej zaobserwowałem tworzenie kompleksów w formowaniu których istotne znaczenie może mieć ujemnie ładunek antygeny O, w przypadku izolatu ze szczepu *P. vulgaris* O25 determinowany obecnością reszt kwasu mlekowego. W celu weryfikacji powyższych wniosków określiłem stopień interakcji obu form lipopolisacharydów w obecności kolistyny z użytą membraną celulozową techniką immunochemiczną dot blot. W celu analiz statystycznych wyników zaproponowałem również sposób uzyskania danych liczbowych z subiektywnych wyników jak poziom szarości membrany. Skanowanie membran i konwersja ich stopnia szarości do postaci liczbowej w skali 1-256 z zastosowaniem programu imageJ umożliwiło porównanie statystyczne danych [22].

Zastosowanie zdefiniowanych na podstawie danych literaturowych oddziaływań LPS-antybiotyk, dodatkowo zweryfikowanych doświadczalnie z zastosowaniem techniki interferometrii laserowej, w powyższej pracy pozwoliło ocenić przydatność tej metody w analizie ilościowej dyfuzji antybiotyków pułapkowanych przez agregaty LPS. Pomiary takie mogą mieć w przyszłości znaczenie w charakterystyce zarówno farmakodynamiki, jak również farmakokinetyki antybiotyków. Ponadto technika ta umożliwia specyficzną dla badanej substancji charakterystykę przepuszczalności różnych membran o znaczeniu klinicznym np. wykorzystana w pracy membrana celulozowa Biofill firmy Fibrocel Biotechnological Products Ltd. stosowana w leczeniu oparzeń oraz trudno gojących się ran.

Kolejnym etapem badań była analiza interferometryczna dyfuzji kolistyny i ampicyliny w obecności naturalnej saponiny z kompleksów LPS form gładkich i szorstkich *P. mirabilis*. Wnioski uzyskane na podstawie powyższych badań pozwoliły na ocenę interakcji powyższych związków. Dodatkowo zostały one zweryfikowane mikrobiologicznymi metodami hodowlanymi w celu oceny zastosowania saponiny do przełamania naturalnej oporności szczepów *P. mirabilis* na kolistynę:

2. Arabski M, Wąsik S, Dworecki K, Kaca W (2009) Laser interferometric and cultivation methods for measurement of colistin/ampicilin and saponin interactions with smooth and rough of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides and cells *Journal of Microbiological Methods* 77, 179-183.

Analizy ilościowe dyfuzji oparte na zjawisku interferencji wymagają stosowania układów dwuskładnikowych. Interferometria oparta na obserwacji zmian współczynnika załamania roztworu nie umożliwia specyficznej identyfikacji substancji chemicznych, jak w przypadku selektywnej absorpcji promieniowania tj. przy określonej długości fali. Rozwiązaniem dla ograniczenia użycia tej metody, zwłaszcza w naukach biologicznych jest unikalny układ

żelowy (Ryc. 1ACF), który zastosowałem w powyższej pracy. Układ ten pozwala na ocenę ilości substancji nie związanej ze strukturą związku wysokocząsteczkowego na podstawie analizy jej dyfuzji. Poprzez analizę różnicową można ocenić poziom oddziaływania obu komponentów. Ich mieszanina jest stabilizowana w strukturze żelu agarozowego o niskiej temperaturze topnienia, którego parametry biofizyczne uniemożliwiają uwalnianie związku wysokocząsteczkowego w przeciwieństwie do substancji. Po umieszczeniu układu w aparacie pomiarowym można ilościowo zaobserwować wolną pulę substancji uwalnianej do roztworu wodnego, nie związanej ze strukturą związku wysokocząsteczkowego oraz dyfuzję wody w strukturę żelu (układ dwuskładnikowy).

Na podstawie danych doświadczalnych uzyskanych z zastosowaniem układu żelowego zaobserwowałem, że z kompleksów z formą szorstką (R) LPS *P. mirabilis* (R45) uwalnia się 2.4 razy mniej kolistyny niż z formą gładką (S) LPS S1959, co wskazuje na silniejsze wiązanie antybiotyku przez formę R. Podstawienie jednej z dwóch reszt fosforanowych w strukturze lipidu A przez 4-amino-4-deoksy-L-arabinozę nie blokuje istotnie oddziaływania LPS z kolistyną. Świadczy to o wysokim powinowactwie antybiotyku do LPS, co znalazło potwierdzenie w jego praktycznym zastosowaniu w leczeniu powikłań związanych z sepsą tj. detoksykacja poprzez wiązanie lipidu A jak centrum toksyczności LPS uwalnianego w wyniku antybiotykoterapii i aktywującego ogólnoustrojową odpowiedź zapalną [23]. W moich kolejnych pracach antybiotyk ten stosowałem jako kontrolę pozytywną będącą punktem odniesienia do oceny właściwości detoksykacyjnych innych substancji m in. chitosanu.

Ponadto w powyższej pracy zaobserwowałem wpływ ekstraktu naturalnego saponiny z *Quillaja saponaria* na oddziaływania kolistyny z LPS *P. mirabilis* zarówno form S jak i R. Saponiny jako związki zawierające w strukturze policykliczny aglikon oraz podstawniki cukrowe posiadają właściwości detergentu, przez co znalazły zastosowanie m in. w przemyśle farmaceutycznym jako substraty do syntezy leków steroidowych [24]. Saponina jako związek powierzchniowo czynny interkaluje w strukturę micelną obu form badanych LPS, zwiększając dostępność do lipidu A dla cząsteczek kolistyny. Wskazuje na to wyższy poziom precypitacji LPS z kolistyną w obecności saponiny oraz mniejsza ilość kolistyny uwalnianej z kompleksów LPS/kolistyna/saponina zmierzona interferometrycznie z zastosowaniem układu żelowego. Ponadto wyniki te wskazują na możliwość oddziaływania saponiny z lipidem A, zarówno form S jak i R.

Biorąc pod uwagę fakt, iż oddziaływanie związków powierzchniowo czynnych, jak wcześniej opisywanej kolistyny z LPS, może wiązać się z ich efektami bakteriobójczymi przeanalizowałem efekt saponiny w obecności antybiotyków na szczepy S i R *P. mirabilis* (R45 i S1959). Zaobserwowałem, iż saponina może wpływać na integralność błony komórkowej niezależnie od kolistyny, na którą oba analizowane szczepy S i R są naturalnie odporne (obecność 4-amino-4-deoksy-L-arabinozy w lipidzie A). Efektem biologicznym obu analizowanych związków o właściwościach detergentu jest zahamowanie wzrostu szczepów bakteryjnych. Podobny wynik zaobserwowałem w przypadku efektu bójczego ampicyliny na którą oba analizowane szczepy są wrażliwe, a jej mechanizm działania związany jest z zaburzeniem syntezy peptydoglikanu. Wyniki te mogą dodatkowo świadczyć o wiązaniu saponiny do błony komórkowej bakterii. Kluczowym zagadnieniem dla opisywanego zjawiska

jest jednak oddziaływanie saponiny z błoną komórkową. Interakcje te są dobrze udokumentowane w przypadku eukariotycznych błon komórkowych, zaburzenie integralności których jest związane z oddziaływaniem saponin z cholesterolem, który nie występuje w strukturze błony bakteryjnej [25]. W przypadku komórki bakteryjnej, lipid A będący strukturą kotwiczącą LPS w błonie komórkowej może być miejscem interkalacji saponiny, co w efekcie prowadzi do wzrostu jej przepuszczalności, m in. dla obu badanych antybiotyków. Mechanizm ten może również tłumaczyć wynik Sen'a i wsp. [26]. Obserwowany przez nich intensywniejszy wzrost komórek bakteryjnych *Escherichia coli* w obecności saponiny może być związany ze zwiększeniem przepuszczalności błony komórkowej i wydajniejszym transportem substancji odżywczych z medium hodowlanego do komórki.

Powyższe wnioski sugerują, iż saponina jako związek powierzchniowo czynny może oddziaływać z bakteryjną błoną komórkową poprzez LPS i modyfikować efektywność bójczą antybiotyków. Jednak możliwość jej oddziaływania z eukariotycznymi błonami komórkowymi może wiązać się z efektami cytotoksycznymi wobec tych komórek. Istotnym zagadnieniem jest więc wybór optymalnego stężenia saponiny skorelowany z efektem bakteriobójczym antybiotyków. Stężenie optymalne tzn. przy którym obserwujemy minimalny efekt cytotoksyczny wobec komórek eukariotycznych, a zarazem zahamowanie wzrostu komórek bakteryjnych. Powyższe zagadnienie jest celem kolejnej pracy składającej się na moje osiągnięcie naukowe.

3. Arabski M, Węgierek-Ciuk A, Grzegorz Czerwonka, Lankoff A, Kaca W (2012) Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Article ID 286216.

W pracy tej analizowałem efekt cytotoksyczny ekstraktu naturalnego saponiny z *Quillaja saponaria* na eukariotyczną linię komórkową CHO-K1 (test MTT, właściwości apoptotyczne z wykorzystaniem cytofluorymetrii przepływowej) oraz właściwości hemolityczne. Zaobserwowałem, iż związek ten w stężeniu powyżej 25 µg/mL zwiększa odsetek komórek we wczesnej apoptozie w stosunku do kontroli oraz zaburza integralność błony komórkowej ludzkich erytrocytów. Ocena wpływu saponiny na komórki CHO-K1 z wykorzystaniem testu MTT wskazują na jej właściwości cytotoksyczne w stężeniu powyżej 12 µg/mL. Na podstawie powyższych wyników do dalszej części badań zastosowałem saponinę w stężeniu 12 µg/mL tj. o minimalnym efekcie cytotoksycznym. Saponina w powyższym stężeniu zwiększała wydajność wzrostu wszystkich sześciu analizowanych szczepów klinicznych *E. coli* hodowanych w podłożu bogatym w składniki odżywcze LB w przeciwieństwie do minimalnego podłoża M9. Efekt ten może być związany ze wzrostem przepuszczalności błony komórkowej, której mechanizm analizowałem we wcześniejszej pracy (nr. 2), m in. z zastosowaniem interferometrii laserowej. Saponina w stężeniu 12 µg/mL w obecności ampicyliny, streptomycyny oraz ciprofloksacyny indukowała wzrost szczepów klinicznych *E. coli*. Wynik ten wskazuje, iż zaburzenie integralności błony komórkowej, a zarazem wzrost jej przepuszczalności wiąże się zarówno z efektywniejszym transportem związków bakteriobójczych, jak również substancji odżywczych. Większa dystrybucja substratów energetycznych w komórce bakteryjnej może indukować lub modyfikować mechanizmy

oporności wobec stosowanych antybiotyków, zwłaszcza jeżeli są one stosowane w praktyce klinicznej w dawkach subletalnych. Ryzyko to może być ograniczeniem stosowania saponin naturalnych jako związków zwiększających dystrybucję leków w komórkach bakteryjnych. Jednak w obrębie całej grupy związków należących do rodziny saponin obserwujemy silne zróżnicowanie ich aktywności biologicznej zarówno wobec komórek bakteryjnych jak i eukariotycznych. Szczególnie istotne w powyższej tematyce są prace nad syntezą *de novo* lub modyfikacją chemiczną naturalnych związków chemicznych w kierunku biofarmaceutyków o przewidywanych i porządnym klinicznie właściwościach biologicznych.

Celem mojej kolejnej pracy była ocena wiązania chitosanu, jako związku o potencjalnych właściwościach detoksykacyjnych z lipopolisacharydem z wykorzystaniem techniki interferometrii laserowej oraz ocena efektów biologicznych powstałych kompleksów. Wyniki wcześniejszych badań nad oddziaływaniami LPS z kolistyną i ich modyfikacja w obecności naturalnej saponiny stanowiły punkt odniesienia do oceny efektywności tworzenia kompleksów LPS-chitosan.

4. Arabski M, Davydova VN, Wąsik S, Reunov AV, Lapshina LA, Solov'eva TF, Yermak I M, Kaca W (2009) Binding and biological properties of lipopolysaccharide *Proteus vulgaris* O25 (48/57)-chitosan complexes. *Carbohydrate Polymers* 78, 481-487.

Chitosan jako liniowy polimer złożony z reszt 2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozy oraz 2-acetyloamido-2-deoksy-D-glukopiranozy połączonych wiązaniem β -1,4 glikozydowym jest polikationem [27,28]. Ładunek ten warunkuje jego wiązanie z ujemnymi resztami LPS i wskazuje na potencjalne właściwości detoksykacyjne. Oddziaływanie to zaobserwowałem w powyższej pracy zarówno z użyciem techniki wirowania w gradiencie sacharozy, jak również interferometrii laserowej. Istotnym parametrem fizycznym który odgrywa znaczącą rolę w tworzeniu kompleksów LPS-chitosan jest temperatura. Analizując powyższe interakcje w temperaturze 25°C i 37°C obserwujemy efektywniejsze tworzenie kompleksów, co może być wynikiem zmian termodynamicznych w obrębie reszt acylowych w strukturze lipidu A. Dowodem tego zjawiska jest zmiana kształtu i rozmiarów agregatów LPS [29]. Efekt ten potwierdzają wyniki z zastosowaniem wirowania w gradiencie sacharozy oraz analiza z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej przedstawione w powyższej pracy. Dodatkowo wyniki uzyskane na podstawie tych technik dowodzą iż w obecności chitosanu zmieniają się zarówno kształt, jak również rozmiar kompleksów z LPS *P. vulgaris* O25 w wyniku ich dezintegracji. Podobny efekt opisano we wcześniejszych pracach w przypadku kolistyny oraz hemoglobiny [30,31]. Na podstawie danych uzyskanych z wykorzystaniem interferometrii laserowej zaobserwowałem, iż oddziaływanie chitosanu z LPS *P. vulgaris* O25 jest słabsze niż kolistyny. Polikation ten nie wpływa na wiązanie antybiotyku do lipidu A. Analiza porównawcza tych interakcji wskazuje, iż chitosan może wiązać się do LPS poprzez ujemnie naładowane podstawniki cukrowe w strukturze antygeny O na powierzchni agregatów LPS. Efektem powyższych oddziaływań jest obniżenie aktywności biologicznej LPS *P. vulgaris* O25 w obecności chitosanu mierzona testem LAL oraz o 65% niższa aktywacja TNF α przez *P. vulgaris* O25 w obecności chitosanu, określona w testach *in vivo*.

C 2. 2. Analiza porównawcza dyfuzji antybiotyków

5. Arabski M, Wąsik S, Piskulak P, Góźdź N, Ślęzak A, Kaca W (2011) Analiza dyfuzji antybiotyków z żelu agarozowego metodami spektrofotometrii i interferometrii laserowej. *Polimery w Medycynie* 41, 25-32.

Celem powyższej pracy było porównanie czułości technik spektrofotometrii oraz interferometrii laserowej w ilościowym oznaczeniu dyfuzji ampicyliny, streptomycyny, ciprofloksacyny oraz kolistyny. Zaletami pomiaru ilości substancji na podstawie absorpcji promieniowania w funkcji długości fali (spektrofotometrii) jest selektywność. Oznaczenia te należą do metod porównawczych, w których na podstawie krzywych wzorcowych i założeń prawa Beera możliwe jest wyznaczenie stężenia substancji badanej. Pomimo iż zgodnie z powyższym prawem wielkość absorbancji światła jest wprost proporcjonalna do stężenia substancji je pochłaniającej, to stosuje się ono w specyficznym do analizowanych roztworu zakresie stężeń. W przypadku ich wysokich, a zwłaszcza niskich wartości obserwujemy odstępstwa od tego prawa, a ekstrapolacja wyników na podstawie krzywej wzorcowej jest dyskusyjna. Ponadto brak wiązań m.in. chromatoforowych w strukturze analizowanej substancji uniemożliwia czuły pomiar absorpcji promieniowania. Aktualnie stosowanym rozwiązaniem w analizach spektrofotometrycznych jest znakowanie podwyższające czułość oznaczeń np. pochodne kwasu sulfonowego w oznaczeniach ilościowych ampicyliny [32]. Jednak analiza spektrofotometryczna tak utworzonych kompleksów, mogących różnić się pod względem masy, ładunku czy też rozpuszczalności od natywnej formy substancji bez znacznika ma charakter ilościowy. Prawidłowa ocena dyfuzji kompleksów w funkcji czasu (rozkład stężenia) i ocena ilościowa tego procesu jest problematyczna i nie umożliwia wnioskowania na temat transportu natywnej, niewyznakowanej substancji. Technika alternatywną oceny zmian stężeń w czasie może być interferometria laserowa. Na podstawie wyników uzyskanych w powyższej pracy zaobserwowałem różnice w kinetyce procesu dyfuzji analizowanych antybiotyków. W przypadku pomiarów interferometrycznych ilość dyfundującej substancji jest wprost proporcjonalna do gradientu stężenia, zgodnie z prawem dyfuzji Ficka. Analiza spektrofotometryczna i uzyskane na jej podstawie krzywe dyfuzji mają przebieg prostoliniowy, niezgodny z teoretycznym przebiegiem opisanym przez powyższe prawo. Pomiar interferometryczny lepiej odwzorowuje proces dyfuzji, dodatkowo pozwalając na jej pomiar w niższym zakresie stężeń niż spektrofotometria, w tym związków nie w pełni rozpuszczalnych w wodzie jak leki amfifilowe, np. kolistyna. Istotną zaletą interferometrii jest analiza rozkładu stężenia antybiotyków w dowolnej odległości od powierzchni żelu. Technika ta pozwala na pomiar gradientu stężenia od najwyższej wartości na powierzchni żelu (silne ugięcie prążka interferencyjnego) do coraz niższego w miarę oddalania się od membrany w czasie (prostowanie krzywizny prążka). W przypadku spektrofotometrii pomiar dokonywany jest w ściśle określonej, jednej odległości od powierzchni żelu tj. przechodzenia wiązki światła przez kuwetę pomiarową.

Powyższa ewolucja stężeniowa w czasie umożliwia badanie rozkładów stężeń oraz jego przewidywanie matematyczne. Znając zmierzone interferometrycznie zmiany rozkładów stężenia przed i za membraną możemy obliczyć matematycznie ich rozkład teoretyczny wewnątrz membrany, co jest ważnym elementem modelowania matematycznego procesów

dyfuzji. Jeżeli membranę o dostatecznie dużej średnicy porów zastosujemy jako „rusztowanie” dla biofilmu bakteryjnego i/lub monowarstwy komórek eukariotycznych możemy określić teoretyczny ich rozkład wewnątrz powyższych struktur. Weryfikując w kolejnym kroku model teoretyczny doświadczalnie możemy wnioskować o np. wiązaniu ilościowym antybiotyków przez biofilm czy też tworzeniu wiązań krzyżowych z DNA komórek eukariotycznych. Obecnie na podstawie przeprowadzonych przez mnie pracach doświadczalnych, m in. z wykorzystaniem techniki interferometrii laserowej, opracowywany jest model farmakokinetyki ciprofloksacyny w biofilmie *P. aeruginosa* oraz dyfuzji ampicyliny przez monowarstwę komórek CHO-K1.

C. 2. 3. Analiza ilościowa dyfuzji liposomów przez membrany

6. Arabski M, Wąsik S, Grześkiewicz H, Drulis-Kawa Z, Gubernator J, Kaca W (2012) Laser interferometric determination of liposome diffusion through artificial membranes, rozdział nr 14 w monografii pt. Interferometry - Research and Applications in Science and Technology, ISBN: 978-953-51-0403-2.

Celem naukowym kolejnej pracy jest interferometryczna ocena dyfuzji liposomów kationowych przez różne membrany stosowane jako opatrunki w leczeniu trudno gojących się ran (Biofill, firmy Fibrocel Biotechnological Products Ltd), wykorzystywane w urządzeniach hemodializacyjnych (Nephrophan) oraz membrany nukleoporowe o różnej średnicy porów. Optymalizacja terapii z wykorzystaniem liposomów jako nośników leków wymaga modyfikacji ich właściwości fizykochemicznych, jak skład jakościowy i ilościowy, rozmiar, czy ładunek, które bezpośrednio wpływają na zwiększenie dystrybucji postaci liposomalnej leku. [33,34]. Liposomy jako związki hydrofobowe tworzące roztwory micelarne silnie załamujące światło, którego zmiany współczynnika są bezpośrednim parametrem mierzonym w interferometrii. Technikę tę wykorzystałem więc do optymalizacji kluczowego parametru o znaczeniu klinicznym, na który wpływają powyższe cechy fizykochemiczne liposomów jakim jest ich dyfuzja przez membrany, np. stosowane jako opatrunki w leczeniu zakażeń bakteryjnych ran.

Najważniejszy wniosek z powyższej pracy to fakt, iż kinetyka dyfuzji liposomów silnie zależy od typu membrany. Przez membrany typu splot jak Biofill czy Nephrophan efektywnej dyfundują liposomy kationowe w porównaniu to membran nukleoporowych. Faza nasycania obu membran celulozowych przez liposomy i następnie ich uwalnianie wpływa na efektywniejszą ilościowo dyfuzję niż w przypadku membran nukleoporowych. Z kolei wysoka polaryzacja stężenia liposomów po obu stronach membrany nukleoporowej o średnicy porów 0.9 μm skutkuje, iż po czasie 40 min. zarówno ze stężenia początkowego liposomów 1 mg/mL jak i 2 mg/mL przedyfundowała ta sama ilość substancji. Na podstawie analiz krzywych kinetyki dyfuzji wywnioskowałem, że w przypadku wyższego stężenia wyrzut substancji w pierwszych 18 min. dyfuzji powoduje na tyle wysoki wzrost stężenia za membraną, iż różnica stężeń w stosunku do przedziału przed nią jest niewielka. Niski gradient stężenia hamuje proces dyfuzji. W przypadku stężenia początkowego 1 mg/mL gradient stężenia liposomów w funkcji czasu pomiędzy membraną utrzymuje się na wyższym poziomie, co w efekcie może tłumaczyć tą samą ilość przedyfundowanej substancji. Zagadnienie polaryzacji stężeniowej odgrywa

ważną rolę w kontekście oczekiwanych efektów terapeutycznych leków oraz ich efektów ubocznych. Zastosowanie nośników leków, jak liposomy umożliwia uzyskanie tego samego efektu przy niższym stężeniu, a przez to słabszych efektach ubocznych. Natomiast zastosowanie ich optymalnego stężenia dodatkowo może sprzyjać skuteczności terapii. Powyższe wyniki wskazują, iż technika interferometrii laserowej może mieć zastosowanie w analizie tego zjawiska, zwłaszcza w kontekście liposomów jako nośników leków.

C 2. 4. Ocena hydrofobowości izolatów LPS w celu optymalizacji metody ELISA

7. Arabski M, Fudała R, Wąsik S, Koza A, Futoma-Kołoch B, Bugła-Płoskońska G, Kaca W (2012) The presence of anti-LPS antibodies, human serum activity against *P. mirabilis* S/R forms and TLR4 (Thr399Ile) gene polymorphism in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry* PMID: 22749779.

Celem kolejnej pracy była ocena depozycji składników dopełniacza w zależności od struktury chemicznej antygeny O LPS *P. mirabilis* oraz korelacja poziomu przeciwciał anti-LPS *P. mirabilis* form S (O3, O23, O9, O40, O49, O10) i form R (R110 i R45) w surowicy pacjentów z reumatycznym zapaleniem stawów (RZS) z polimorfizmem genu *tlr4*. Podstawową techniką immunochemiczną, którą zastosowałem w powyższej pracy był test ELISA. Początkowym etapem w procedurze tego testu jest opłaszczenie płytek titracyjnych izolatami LPS. Heterogenność LPS wiąże się z jego różnym stopniem agregacji, ładunkiem oraz powinowactwem do powierzchni płytki zastosowanej w badaniach. Istotnym zagadnieniem jest więc możliwość oceny stopnia pokrycia jej powierzchni przez różne izolaty LPS, co bezpośrednio rzutuje na poziom identyfikowanych przeciwciał w badanych surowicach ludzkich. Zastosowany przez mnie współczynnik pokrycia na podstawie danych uzyskanych testem ELISA i LAL wraz z pomiarem hydrofobowości wodnych roztworów LPS pozwala na dokładniejszą interpretację poziomu przeciwciał w badanych surowicach z zastosowaniem testu ELISA.

Wykorzystany nowatorsko w pracy układ membranowy wchodzący w skład systemu interferometrycznego umożliwia rozdział faz wodnego roztworu LPS, dzięki użytej membranie oraz pomiar grubości warstwy stężeniowej (δ). Zaobserwowałem, iż grubość tej warstwy jest dodatnio skorelowana z większą rozpuszczalnością agregatów LPS, stopniem pokrycia powierzchni płytki titracyjnej zmierzonym testem LAL i w konsekwencji poziomem przeciwciał anti-LPS określonym z użyciem testu ELISA. Na podstawie wyników uzyskanych z zastosowaniem powyższych technik zaobserwowałem, iż poziom przeciwciał anti-LPS form R jest wyższy w porównaniu do form S u pacjentów z RZS. Prawdopodobnie rozchwianie odpowiedzi immunologicznej w RZS prowadzi do produkcji przeciwciał wobec słabo immunogennych frakcji LPS, jak rdzeń czy lipid A, konserwatywnych pod względem budowy dla *Enterobacteriaceae*.

Analizując uzyskane wyniki zaobserwowałem również wyższy poziom przeciwciał anti-LPS O3, O23, O40 i O49 w surowicy pacjentów RZS w stosunku do kontroli, co potwierdzają wcześniej opublikowane dane [35]. Rolę *P. mirabilis* w patogenezie RZS w stosunku do innych *Enterobacteriaceae* potwierdza obecność unikalnych podstawników chemicznych w strukturze LPS, jak 4-amino-4-deoksy-L-arabinozy w lipidzie A, kwasu D-galaktouronowego w części

rdzeniowej oraz kwasów uronowych w antygenie O [36]. W przypadku oceny poziomu przeciwciał anti-O10 nie zaobserwowałem różnic w grupie pacjentów z RZS oraz kontrolnej, co może być związane z obecnością bardzo specyficznego i immunogennego kwasu L-alturonowego w strukturze antygeny O [36]. Podobna zależność charakteryzuje poziom przeciwciał anti O9, co może wynikać z linearnej, a przez to słabiej immunogennej struktury antygeny O. Ponadto na powierzchni agregatów LPS O9 poziom depozycji białek układu dopełniacza (C3d i C5b) jest wyższy, co może sprzyjać formowaniu kompleksu atakującego błonę bakteryjną MAC i eradykacji bakterii. W przypadku rozgałęzionego antygeny O LPS O49 poziom depozycji jest niższy, dzięki czemu może on pełnić funkcję ochronną wobec aktywności bakteriobójczej dopełniacza. Przedłużająca się infekcja bakteryjna może więc sprzyjać indukcji przeciwciał anti-O49 *P. mirabilis*. Ponadto, poziom przeciwciał anti-LPS *P. mirabilis* w surowicach pacjentów z RZS nie jest zależny od zmienności polimorficznej w obrębie genu *tlr4* (Thr399Ile), co potwierdzają dane literaturowe [37,38].

C. 3 Główne osiągnięcia naukowe

Na podstawie przedstawionego powyżej streszczenia prac składających się na jednotematyczny cykl publikacji przedstawiony do oceny, za swoje główne osiągnięcia uważam nowatorskie zastosowanie techniki interferometrii laserowej w celu:

- oceny oddziaływania lipopolisacharydów z kolistyną, saponiną oraz chitosanem,
- charakterystyki ilościowej dyfuzji antybiotyków oraz liposomów kationowych przez membrany o znaczeniu medycznym,
- oceny ilościowej uwalniania antybiotyków (ampicyliny, kolistyny, streptomycyny, ciprofloksacyny) z żelu,
- opracowanie nowego układu żelowego pozwalającego na ocenę oddziaływania biomolekuł z polimerami,
- nowatorskie wykorzystanie układu membranowego wchodzącego w skład systemu interferometrycznego do pomiaru hydrofobowości izolatów LPS.

C.4 Piśmiennictwo

1. Patorski K., Kujawińska M., Sałbut L. Interferometria laserowa z automatyczną analizą obrazów. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2005.
2. Dworecki K. (1995) Interferometric investigation of near-membrane diffusion layers. *J. Biol. Phys.* 21, 37-49.
3. Dworecki K., Wąsik S. (1997) The investigation of time-dependent solute transport through horizontally situated membrane: the effect of configuration membrane system. *J. Biol. Phys.* 23, 181-195.
4. Dworecki K., Wąsik S., Ślęzak A. (2003) Temporal and spatial structure of the concentration boundary layers in a membrane system. *Physica A* 326, 360-369.
5. Dworecki K. (2006) Experimental investigation of the subdiffusion in a membrane system. *Physica A* 359, 24-32.
6. Dworecki K., Ślęzak A., Ornal-Wąsik B., Wąsik S. (2005) Effect of hydrodynamic instabilities on solute transport in a membrane system. *J. Memb. Sci.* 265, 94-100.

7. Ślęzak A., Dworecki K., Jasik-Ślęzak J., Wąsik J. (2004) Method to determine the critical concentration Rayleigh number in isothermal passive membrane transport processes. *Desalination* 168, 397-412.
8. Machado R.R., Lima Filho E.S., Jardim D.F., Ferreira M.A., de Faria C.G., Duarte R.S., Lesche B. (2008) Metabolic activity interferometer: description and calibration of an interferometric method to measure growth of mycobacteria. *Eur Biophys. J.* 38, 111-119.
9. Jardim D.F., Santiago Neto R.B., Machado R.R., Aarestrup F.M., de Mendonça J.P., Lesche B. (2003) Observing bacterial activity interferometrically. *Eur. Biophys. J.* 32, 159-162.
10. Kaszowska M. (2004) Budowa chemiczna i biosynteza lipopolisacharydu-ważnego składnika osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 58, 333-342
11. Caroff M., Karibian D. (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research* 338, 2431-2447.
12. Saluk-Juszczak J. (2007) Znaczenie lipopolisacharydu bakteryjnego w procesie aktywacji płytek krwi. *Postępy Biologii Komórki* 34, 159-172.
13. Seydel U., Brandenburg K., Koch M.H.J., Rietschel E.T. (1989) Supramolecular structure of lipopolysaccharide and free lipid A under physiological conditions as determined by synchrotron small-angle X-ray diffraction. *Eur J Biochem* 186, 325-332.
14. Brogden K.A., Phillips M. (1988) The ultrastructural morphology of endotoxins and lipopolysaccharides. *Electron Microsc. Rev.* 1, 261-278.
15. Lodowska J., Zięba A., Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z. (2006) Metody derywatywacji komponentów lipopolisacharydów w ocenie ich struktury chemicznej technikami chromatograficznymi. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 60, 113-128.
16. Brandenburg K., Arraiza M.D., Lehwark-Ivetot G., Moriyon I., Zähringer U. (2002) The interaction of rough and smooth form lipopolysaccharides with polymyxins as studied by titration calorimetry. *Thermochemica Acta* 394, 53-61.
17. Brandenburg K., Moriyon I., Arraiza M.D., Lehwark-Ivetot G., Koch M.H.J., Seydel U. (2002) Biophysical investigations into the interaction of lipopolysaccharide with polymyxin. *Thermochemica Acta* 382, 189-198.
18. McCoy A.J., Liu H., Falla T.J., Gunn J.S. (2001) Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 2030-2037.
19. Mares J., Kumaran S., Gobbo M., Zerbo O. (2009) Interactions of lipopolysaccharide and polymyxin studied by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 284, 11498-11509.
20. Kaca W., Ujazda E. (1996) Studies of antibiotic resistance of rough and smooth *Proteus mirabilis* strains and influence of polymyxin E on their lipopolysaccharide composition. *Acta Microbiol Pol.* 45, 161-168.
21. Boll M., Radziejewska-Lebrecht J., Warth C., Krajewska-Pietrasik D., Mayer H. (1994) 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose in LPS of enterobacterial R-mutants and its possible role for their polymyxin reactivity. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 8, 329-341.
22. Rasband W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.
23. David S.A., Silverstein R., Amura C.R., Kielian T., Morrison D.C. (1999) Lipopolyamines: novel antiendotoxin compounds that reduce mortality in experimental sepsis caused by gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 912-919.
24. Spark, S.G., Light, M.E., van Staden, J. (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94, 219-243.

25. Karabaliev M., Kochev V. (2003) Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. *Sensors and Actuators B88*, 101-105.
26. Sen S., Makkar H.P.S., Muetzel S., Becker K. (1998) Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 27, 35-38.
27. Davydova V.N., Bratskaya S.Y., Gorbach V.I., Solov'eva T.F., Kaca W., Yermak I.M. (2008) Comparative study of electrokinetic potentials and binding affinity of lipopolysaccharides-chitosan complexes. *Biophysical Chemistry* 136, 1-6.
28. Davydova V.N., Yermak I.M., Gorbach V.J., Krasikova I.N., Solov'eva T.F. (2000) Interaction of bacterial endotoxins with chitosan. Effect of endotoxin structure, chitosan molecular mass, and ionic strength of the solution on the formation of the complex. *Biochemistry (Mosc)* 65, 1082-1090.
29. Brandenburg K., Wiese A. (2004) Endotoxins: Relationships between structure, function and activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4, 1127-1146.
30. Lopes L., Innis W.E. (1969) Electron microscopy of effect of polymyxin on *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology* 5, 1128-1130.
31. Roth R., Wong J.S., Hamilton R.J. (1996) Ultrastructural changes in bacterial lipopolysaccharide induced by human hemoglobin. *Journal of Endotoxin Research* 3, 361-366.
32. Lixiao X., Huaiyou W., Yan X. (2004) Spectrophotometric determination of ampicillin sodium in pharmaceutical products using sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic as the chromogenic reagent. *Spectrochimica Acta Part A* 60, 3007-3012.
33. Ulrich A.S. (2002) Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci. Rep.* 22, 129-150.
34. Gregoriadis G. (1995) Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol.* 13, 527-537.
35. Senior E.B.W., Anderson G.A., Morley K.D., Kerr M.A. (1999) Evidence that patients with rheumatoid arthritis have asymptomatic 'non-significant' *Proteus mirabilis* bacteriuria more frequently than healthy controls. *J. Infect.* 38, 99-106.
36. Knirel Y.A., Perepelov A.V., Kondakova A.N., Senchenkova S.N., Sidorchuk Z., Rozalski A., Kaca W. (2011) Structure and serology of O-antigens as the basis for classification of *Proteus* strains. *Innate Immun.* 17, 70-96.
37. Zheng B., Li Q., Wei C., Qin J., Shou T., Zhou R., Shao J., Yang Y., Xiao C. (2010) Lack of association of TLR4 gene Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with rheumatoid arthritis in Chinese Han population of Yunnan Province. *Rheumatol. Int.* 30 (2010) 1249-1252.
38. Sánchez E., Orozco G., López-Nevot M.A., Jiménez-Alonso J., Martín J. (2004) Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 63, 54-57.

D. Plany na przyszłość

W najbliższej przyszłości planuję wykorzystanie techniki interferometrii laserowej w badaniu dyfuzji nanozwiązków srebra przez monowarstwy komórek eukariotycznych z jednoczesnym określeniem ich efektu cytotoksycznego we współpracy z firmą ANT Advanced Nanotechnologies Sp z o.o. oraz Zakładem Radiobiologii i Immunologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach. Ponadto w ramach projektu NCN (2012/04/M/NZ6/00335) realizuję zadanie związane z oceną eradykacji biofilmów *P. aeruginosa* przez inaktywowane cząstki fagowe oraz ekspresjonowane białka fagowe z wykorzystaniem interferometrii

laserowej w ramach międzynarodowego projektu COST działanie BM1003. Powyższe wyniki zostaną wykorzystane do modelowania matematycznego analizowanych procesów dyfuzji.

ZESTAWIENIE SUMARYCZNE DOROBKU NAUKOWEGO

Artykuły opublikowane	Punktacja	
	<i>impact factor</i>	pkt. MNiSW
przed doktoratem (7*)	14.538	180
po doktoracie (23*)	36.035	483
- w tym wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (7*)	12.538	189
Sumaryczny <i>impact factor</i> i pkt. MNiSW	50.573	663

* ilość publikacji naukowych

Kielce, 18 marca 2013



Michał Arabski