

Autoreferat

Dr inż. Piotr Szweda

Katedra Technologii Leków i Biochemii

Wydział Chemiczny

Politechnika Gdańska

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko: Piotr Szweda

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej:

mgr inż. – 20.06.2000; biotechnologia; Politechnika Gdańska

dr inż. – 16.02.2005; nauki techniczne w zakresie technologii chemicznej; Politechnika Gdańska.

Tytuł rozprawy: „Nowe źródła lizostafiny *Staphylococcus simulans* – konstrukcja układów ekspresyjnych, oczyszczanie i badanie właściwości”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.12.2004 – 30.11.2005 – asystent; Katedra Technologii Utrwalania Żywności; Wydział Chemiczny; Politechnika Gdańska

01.12.2005 – 31.08.2007 – adiunkt; Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności; Wydział Chemiczny; Politechnika Gdańska

01.09.2007 – do chwili obecnej – adiunkt; Katedra Technologii Leków i Biochemii; Wydział Chemiczny; Politechnika Gdańska

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art.16 ust.2 ustawy z dnia 14 czerwca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (D.U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi 10 artykułów oryginalnych, 1 publikacja przeglądowa oraz 1 patent polski.

Poniżej przedstawiono zestawienie publikacji z podziałem tematycznym. W przypadku każdej pracy przedstawiono także dane bibliometryczne w postaci parametrów (A/B/C; D), gdzie:

A - IF czasopisma w roku opublikowania pracy;

B - ogólna liczba cytowań pracy w bazie Web of Science;

C - ogólna liczba cytowań w bazie Scopus;

D - liczba punktów wg wykazu MNiSzW w roku ukazania się publikacji.

4a. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Bakteriocyny oraz miody pozyskiwane w krajowych pasiekach jako potencjalne czynniki terapeutyczne infekcji gronkowcowych - badania *in vitro*”

[A-1] Szweda P, Kotłowski R, Łacka I, Synowiecki J. (2007) Protective effect of lysostaphin from *Staphylococcus simulans* against growth of *Staphylococcus aureus* in milk and some other food products. *Journal of Food Safety* 27(3):265-274.

IF₂₀₀₇ = 0,509/5/5; LPK (MNiSzW 2007) – 20

Byłem pomysłodawcą i głównym koordynatorem prowadzonych badań, przygotowałem układ ekspresyjny pBAD2Lys. W oparciu o skonstruowany układ ekspresyjny przygotowywałem preparaty enzymu, uczestniczyłem także w badaniach jego skuteczności w eliminacji gronkowców z produktów żywnościowych. Brałem także aktywny udział w przygotowywaniu tekstu pracy. Mój udział procentowy w przygotowaniu pracy oceniam na 45%.

[A-2] Szweda P, Schielmann M, Kotłowski R, Gorczyca G, Zalewska M, Milewski S. (2012) Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96(5):1157-74. doi: 10.1007/s00253-012-4484-3.

IF₂₀₁₂ = 3,689/30/34; LPK (MNiSzW 2012) – 35

Byłem pomysłodawcą powstania pracy. W oparciu o piśmiennictwo zgromadzone przez współautorów opracowałem tekst artykułu przeglądowego. Mój udział procentowy w powstaniu pracy oceniam na 50%.

[A-3] Szweda P, Schielmann M, Milewski S, Frankowska A, Jakubczak A. (2012) Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. *Polish Journal of Microbiology* 61(1):65-9.

IF₂₀₁₂ = 0,768/24/23; LPK (MNiSzW 2012) – 15

*Byłem pomysłodawcą i głównym koordynatorem prowadzonych badań, uczestniczyłem w badaniach zdolności tworzenia biofilmu metodami fenotypowymi jak i wykrywaniu genów operonu *icaADBC*. Przygotowałem zasadniczą część tekstu publikacji. Mój udział procentowy w powstaniu artykułu oceniam na 45%.*

[A-4] Szweda P, Schielmann M, Frankowska A, Kot B, Zalewska M. (2014) Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. *Journal of Veterinary Medical Science* 76(3):355-62.

IF₂₀₁₄ = 0,782/13/15; LPK (MNiSzW 2014) – 25

Byłem pomysłodawcą i głównym koordynatorem prowadzonych badań. Aktywnie uczestniczyłem we wszystkich etapach badań eksperymentalnych. Tekst artykułu

przygotowałem we współpracy z panią dr inż. Martą Schielmann. Mój udział procentowy w powstaniu pracy oceniam na 45%.

[A-5] Szweda P, Gorczyca G, Filipkowski P, Zalewska M, Milewski S. (2014) Efficient production of *Staphylococcus simulans* lysostaphin in a benchtop bioreactor by recombinant *Escherichia coli*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 44(4):370-81. doi: 10.1080/10826068.2013.829499.

IF₂₀₁₄ = 0,911/3/2; LPK (MNiSzW 2014) – 15

Byłem pomysłodawcą i głównym koordynatorem prowadzonych badań. Aktywnie uczestniczyłem w pracach związanych z optymalizacją wydajności produkcji białka w komórkach bakterii hodowanych w bioreaktorze oraz oczyszczaniu preparatów enzymu. Przygotowałem zasadniczą część tekstu publikacji. Mój udział procentowy w powstaniu pracy oceniam na 35%.

[A-6] Szweda P, Gorczyca G, Tylingo R, Kurlenda J, Kwieciński J, Milewski S. (2014) Chitosan-protein scaffolds loaded with lysostaphin as potential antistaphylococcal wound dressing materials. *Journal of Applied Microbiology* 117(3):634-42. doi: 10.1111/jam.12568.

IF₂₀₁₄ = 2,479/3/4; LPK (MNiSzW 2014) – 30

Byłem pomysłodawcą i głównym koordynatorem prowadzonych badań. Aktywnie uczestniczyłem w pracach związanych z otrzymywaniem i badaniem aktywności materiałów zawierających lizostafynę. Przygotowałem zasadniczą część tekstu publikacji. Mój udział procentowy w powstaniu pracy oceniam na 45%.

[A-7] Kuś PM, Szweda P, Jerković I, Tuberoso CI. (2016) Activity of Polish unifloral honeys against pathogenic bacteria and its correlation with colour, phenolic content, antioxidant capacity and other parameters. *Letters in Applied Microbiology* 62(3):269-76. doi: 10.1111/lam.12541.

IF₂₀₁₆ = 1,575/6/8; LPK (MNiSzW 2016) – 20

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu badań aktywności przeciwbakteryjnej preparatów miodu. Uczestniczyłem także w przygotowywaniu tekstu publikacji. Mój udział w powstaniu artykułu oceniam na 40%.

[A-8] Gorczyca G, Tylingo R, Szweda P, Milewski S, Sadowska M, Zalewska M. Sposób wytwarzania chitozanowo-białkowego materiału biopolimerowego. Patent polski PL 223280B1.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu badań aktywności przeciwbakteryjnej otrzymywanych materiałów. Uczestniczyłem także w przygotowywaniu tekstu zgłoszenia patentowego. Mój udział w powstaniu tego patentu wynosi 29,9%.

[A-9] Kot B, Szweda P, Frankowska-Maciejewska A, Piechota M, Wolska K. (2016) Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis

in eastern Poland. *Journal of Dairy Research* 83(2):228-35.
doi: 10.1017/S002202991600008X.

IF₂₀₁₆ = 1,409/7/8; LPK (MNiSzW 2016) – 30

*We współpracy z panią dr Anetą Frankowską i panią dr Małgorzatą Piechotą oznaczyłem obecność genów kodujących czynniki wirulencji: adhezyny, enterotoksyny i proteazy w genomach izolatów *S. aureus*. Uczestniczyłem także w konsultacjach dotyczących interpretacji uzyskanych wyników. Mój udział w powstaniu artykułu oceniam na 25%.*

[A-10] Szweda P, Gorczyca G, Tylingo R. (2018) Comparison of antimicrobial activity of selected, commercially available, wound dressing materials. *Journal of Wound Care* 27(5):320-326. doi: 10.12968/jowc.2018.27.5.320.

IF₂₀₁₆ = 1,446/0/0; LPK (MNiSzW 2016) – 25

Byłem pomysłodawcą i głównym koordynatorem prowadzonych badań. Uczestniczyłem w badaniach aktywności przeciwbakteryjnej materiałów komercyjnych oraz materiału biopolimerowego zawierającego lizostafinę. Przygotowałem zasadniczą część tekstu publikacji. Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy oceniam na 55%.

[A-11] Zalewska M, Churey JJ, Worobo RW, Milewski S, Szweda P. (2018) Isolation of bacteriocin-producing *Staphylococcus* spp. strains, obtained from human skin wounds, soft tissue infections, and bovine mastitis. *Polish Journal of Microbiology* doi: 10.21307/pjm-2018-018.

IF₂₀₁₆ = 0,746/0/0; LPK (MNiSzW 2016) – 15

Wraz z panią dr inż. Magdaleną Zalewską byłem inicjatorem przeprowadzenia badań, których wyniki opisano w powyższej publikacji. Brałem aktywny udział w prowadzeniu badań eksperymentalnych (selekcja szczepów produkcyjnych, optymalizacja warunków produkcji oraz badanie aktywności i właściwości fizykochemicznych peptydu). Uczestniczyłem też w przygotowaniu tekstu artykułu. Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy oceniam na 35%.

[A-12] Grecka K, Kuś PM, Worobo RW, Szweda P. (2018) Phytochemicals are crucial for peroxide-dependent antimicrobial potential of honeys produced in Northern Poland. *Molecules* 28:23(2). e260. doi: 10.3390/molecules23020260.

IF₂₀₁₆ = 2,861/0/0; LPK (MNiSzW 2016) – 30

Byłem pomysłodawcą i głównym koordynatorem prowadzonych badań. Uczestniczyłem we wszystkich etapach badań eksperymentalnych oraz przygotowałem zasadniczą część tekstu publikacji. Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy oceniam na 40%.

Przedstawione powyżej zestawienie zawiera publikacje z czterech głównych wątków tematycznych:

1. Prace dotyczące lizostafiny – białka enzymatycznego zaliczanego do bakteriocyn, o unikalnej zdolności do wybiórczej hydrolizy peptydoglikanu gronkowców, głównie z gatunku *S. aureus* – A-1, A-2, A-4, A-5, A-6, A-8, A-10;
2. Praca dotycząca peptydów przeciwegronkowcowych wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* wyizolowane z mleka krów, u których stwierdzono zapalenie gruczołu mlekowego oraz z zakażeń ran u ludzi – A-11;
3. Prace dotyczące potencjału przeciwegronkowcowego miodów – A-7, A-12;
4. Prace dotyczące wirulencji szczepów gronkowców pochodzenia weterynaryjnego – A-3 i A-9.

4b. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.1. Wstęp - geneza tematyki i cel badań

Odkrycie i zastosowanie w lecznictwie antybiotyków bez wątplenia należy zaliczyć do największych osiągnięć medycyny w XX wieku. Pierwszy lek z tej grupy, penicylinę, wprowadzono do praktyki klinicznej w latach 40. W przeciągu kolejnych 30 - 40 lat liczba odkrywanych i z powodzeniem wprowadzanych do lecznictwa antybiotyków rosła bardzo szybko. W latach osiemdziesiątych pojawiły się odważne teorie sugerujące, że problem chorób infekcyjnych został ostatecznie rozwiązany. Niestety optymizm ten był przedwczesny i całkowicie nieuzasadniony. Nadużywanie antybiotyków do celów leczniczych, a także masowe stosowanie tych substancji w hodowli zwierząt – głównie do celów profilaktycznych - spowodowało selekcję antybiotykoopornych szczepów bakterii oraz grzybów patogennych. W ciągu ostatnich co najmniej 30 lat obserwuje się zjawisko znaczącego spadku skuteczności stosowanych antybiotyków zaliczanych do różnych grup chemicznych i wykazujących różne mechanizmy działania. Do bakterii, które szczególnie szybko nabywają oporność na antybiotyki należy zaliczyć gronkowce. Niepokojący jest przede wszystkim wzrost liczby izolatów *S. aureus*, a ostatnio także *S. epidermidis*, opornych na metycylinę, tzw. szczepów MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) oraz MRSE (Methicillin Resistant *Staphylococcus epidermidis*). Oporność na metycylinę warunkowana jest nabyciem gronkowcowej kasety chromosomalnej *mec* (SCC*mec* – *Staphylococcal Cassette*

Chromosome mec). Najważniejszym elementem SCC*mec* jest gen *mecA* kodujący białko PBP 2a (określane także jako PBP 2'), kluczowe dla syntezy ściany komórkowej gronkowców, które jednocześnie wykazuje obniżone powinowactwo do antybiotyków β -laktamowych. Dodatkowo, kasetta chromosomalna *mec* jest miejscem na chromosomie (tzw. hot spot), do którego często wbudowywane są geny warunkujące oporność na antybiotyki zaliczane do innych grup pod względem budowy chemicznej i mechanizmu działania. W konsekwencji, szczepy MRSA często wykazują oporność wielolekową – tzw. fenotyp MDR (Multidrug Resistant) (Lowy 2003; Stefani i Goglio 2010). Szacuje się, że w samych tylko Stanach Zjednoczonych, szczepy MRSA są przyczyną zgonu około 11 000 osób w ciągu roku (Anonymus 2013, raport Centers for Disease Control and Prevention). Według danych przedstawionych w raporcie ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), w latach 2013 - 2016, w krajach Unii Europejskiej stwierdzono nieznaczny spadek procentowego udziału szczepów MRSA w ogólnej liczbie zakażeń inwazyjnych powodowanych przez bakterie *S. aureus* z 18,1 (rok 2013) do 13,7% (rok 2016). Bardzo duże różnice zaobserwowano pomiędzy poszczególnymi krajami. Zdecydowanie najniższy odsetek izolatów MRSA (w roku 2016 poniżej 2,5%) odnotowano w Holandii oraz krajach skandynawskich. Z kolei w Rumunii, w całym analizowanym okresie, ponad połowa zakażeń inwazyjnych o etiologii gronkowcowej wywoływana była przez szczepy odporne na działanie metycyliny, przy czym zaobserwowano wyraźną tendencję spadkową (z 64,5% w roku 2013 do 50,5% w roku 2016). W Polsce, szczepy MRSA także stanowią poważny problem kliniczny. W roku 2016, oporność na metycylinę wykazywało 16,5% spośród 1772 szczepów *S. aureus* wyizolowanych z zakażeń inwazyjnych (Raport ECDC 2017). Szacuje się, że dodatkowe roczne koszty leczenia osób zainfekowanych MRSA w europejskich szpitalach to ponad 380 milionów Euro (Kock i wsp., 2010). Leczenie infekcji spowodowanych przez szczepy MRSA prowadzi się głównie za pomocą wankomycyny. Niestety, coraz częstsze są doniesienia o izolacji szczepów o obniżonej wrażliwości (VISA - Vancomycin Intermediate-Resistant *S. aureus*) a nawet całkowicie opornych (VRSA - Vancomycin Resistant *S. aureus*) na działanie także tego antybiotyku (McGuinness i wsp., 2017). Problem lekooporności dodatkowo potęguje fakt, że w przeciągu ostatnich 20 lat do praktyki klinicznej wprowadzono zaledwie kilka nowych chemoterapeutyków skutecznych w terapii infekcji bakteryjnych i tylko niektóre z nich są przydatne w walce z chorobami wywoływanymi przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. Współczesnej medycyny nie sposób wyobrazić sobie bez dostępu do skutecznych leków przeciwdrobnoustrojowych. Poza leczeniem infekcji antybiotyki stosowane są także w profilaktyce okołoperacyjnej, czy do ograniczenia ryzyka powikłań infekcyjnych w trakcie intensywnej terapii onkologicznej oraz stosowania leków immunosupresyjnych.

Ze względu na coraz częstsze izolacje szczepów gronkowców opornych na stosowane aktualnie antybiotyki, poważnym i pilnym wyzwaniem staje się poszukiwanie nowych substancji czy systemów terapii skutecznych w walce z tymi drobnoustrojami. Obiecujące wyniki uzyskano w zakresie badań dotyczących stosowania terapii kombinowanych (chojemu równolegle podaje się co najmniej dwa różne antybiotyki) (Betts i wsp., 2018; Leijtens i wsp., 2017), terapii fotodynamicznej (Fu i wsp., 2013; Almeida i wsp., 2017) czy otrzymywania szczepionek przeciwgronkowcowych (Haghighat i wsp., 2017; Chang i Wang 2017). Zidentyfikowano także szereg bakteriofagów (Sulkavelidze i wsp., 2001; Matsuzaki i wsp., 2003), bakteriocyn (Nascimento i wsp., 2006) czy substancji pochodzenia roślinnego (Kurek i wsp., 2011; Szweda i Kot 2017) wykazujących znaczny potencjał w zwalczaniu gronkowców. Ciekawą alternatywą dla antybiotykoterapii chorób infekcyjnych, w tym także wywoływanych przez *Staphylococcus* spp. jest stosowanie nanocząstek metali, głównie srebra i złota (Kurek i wsp., 2011).

Celem badań prowadzonych przeze mnie w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej było określenie potencjału przeciwgronkowcowego wybranych nieantybiotykowych produktów pochodzenia naturalnego, w tym bakteriocyn: enzymu lizostafiny i peptydów przeciwbakteryjnych wytwarzanych przez izolaty bakterii z rodzaju *Staphylococcus* oraz miodów pozyskiwanych w polskich pasiekach. Istotnym elementem naszych badań było uwzględnienie praktycznych aspektów dotyczących potencjalnych możliwości stosowania tych produktów/substancji jako czynników terapeutycznych. W tym względzie popieram pogląd zaprezentowany w pracy autorstwa Kurlenda i Grinholc (2012), którzy stwierdzili, że stosowanie alternatywnych, nieantybiotykowych produktów przeciwbakteryjnych, np. pochodzenia roślinnego, jest realne głównie w odniesieniu do terapii chorób infekcyjnych o charakterze miejscowym. Ważne są także kwestie ekonomiczne, czyli koszt otrzymywania potencjalnych leków.

Gronkowce często występują w organizmie gospodarza w sposób bezobjawowy (około 30% populacji zdrowych ludzi), należą też do najważniejszych czynników etiologicznych zakażeń zlokalizowanych w obrębie skóry, trudno gojących się ran, błon śluzowych (np. nosa) oraz gruczołu mlekowego u zwierząt. Powszechne stosowanie antybiotyków w terapii tego typu (często niezagrażających bezpośrednio życiu pacjentów lub zwierząt) infekcji jest jedną z głównych przyczyn rozwoju zjawiska antybiotykooporności. Liczne dane literaturowe, a także wyniki badań własnych jednoznacznie potwierdzają, że przypadku miejscowych zakażeń gronkowcowych, ciekawą i obiecującą alternatywą dla antybiotykoterapii mogłoby być stosowanie wybranych (wykazujących znaczną aktywność

przeciwbakteryjną) substancji i produktów naturalnych niebędących produktami metabolizmu wtórnego, a więc niemających charakteru antybiotyków. Podstawową korzyścią wynikającą z takiego podejścia byłoby zdecydowanie ograniczenie ilości stosowanych antybiotyków. To z kolei przyczyniłoby się do spowolnienia procesu selekcji szczepów opornych i wydłużyło okres skutecznego działania tej grupy leków, których stosowanie można by ograniczyć do terapii poważnych infekcji układowych.

Jak już wspomniano, ważnym aspektem naszych badań były kwestie dotyczące praktycznych możliwości stosowania interesujących nas produktów/substancji w terapii zakażeń gronkowcowych. Aktywność wszystkich produktów/substancji weryfikowano względem szczepów *S. aureus* wyizolowanych z zakażeń ran oraz skóry (u ludzi) oraz z mleka krów, u których stwierdzono zapalenie gruczołu mlekowego. W przypadku lizostafiny, podjęto próby opracowania wydajnych metod produkcji rekombinantowego enzymu oraz materiału biopolimerowego zawierającego to białko (docelowo materiału opatrunkowego). Przeprowadzono także badania mające na celu ustalenie możliwości stosowania lizostafiny do eliminacji gronkowców z produktów żywnościowych.

Oprócz wykazania znacznej aktywności przeciwgronkowcowej niektórych miodów przeprowadzono badania mające na celu określenie korelacji pomiędzy potencjałem przeciwbakteryjnym a źródłem botanicznym produktu oraz, co szczególnie istotne, wyjaśnienie mechanizmu działania przeciwbakteryjnego najbardziej aktywnych miodów.

4.2. Lizostafyna jako potencjalny czynnik przeciwgronkowcowy

Hydrolazy peptydoglikanu to grupa enzymów, których wspólną cechą jest zdolność hydrolizy wiązań występujących w peptydoglikanie ścian komórek bakteryjnych. Do grupy tej zalicza się na przykład lizozymy, tj. enzymy, które stanowią element układu odpornościowego wielu zwierząt i człowieka. Występują one w pocie, łzach, wydzielinie nosowej, czy białkach jaj wielu ptaków. Lizozym białka jaja kurzego, jest przykładem hydrolazy peptydoglikanu, która już znalazła szerokie zastosowanie w przemyśle żywnościowym. Jako dodatek do żywności, enzym ten oznaczany jest symbolem E1105. Ze względu na specyficzną budowę chemiczną peptydoglikanu, gronkowce są jednak zupełnie niewrażliwe na działanie lizozymów pozyskiwanych z różnych źródeł, w tym także lizozymu białka jaja kurzego (Bera i wsp., 2005; 2006; 2007). Z punktu widzenia walki z gronkowcami zdecydowanie najbardziej perspektywiczną hydrolazą peptydoglikanu jest lizostafyna. Jest to zewnątrzkomórkowa, glicyno-glicylowa endopeptydaza wytwarzana przez

bakterie *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolitycus*. Enzym ten posiada zdolność hydrolizy peptydoglikanu ścian komórkowych praktycznie wszystkich gatunków bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (Schindler i Schuhardt 1964, 1965; Sloan i wsp., 1982). Z kolei inne Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne bakterie są całkowicie odporne na działanie tego białka. Celem molekularnym działania lizostafiny są pentaglicynowe mostki międzypeptydowe, które są unikalnym elementem peptydoglikanu gronkowców (Schleifer i Kandler 1972; Iversen i Grov 1973). Gronkowce koagulazoujemne oraz szczep producencki, których mostki międzypeptydowe zawierają także serynę lub alaninę są mniej podatne na działanie tego enzymu (Robinson i wsp., 1979; Thumm i Gotz 1997; Ehlert i wsp., 2000; Kiri i wsp., 2002). Lizostafina zaliczana jest do bakteriocyn klasy IIIa, tzw. bakteriolizyn (duże, labilne termicznie białka, wykazujące zdolność lizy komórek bakteryjnych) (Bastos i wsp., 2010). Próby wykorzystania lizostafiny jako potencjalnego czynnika terapeutycznego zostały szeroko opisane w literaturze światowej. Preparaty enzymu z powodzeniem stosowano na przykład w terapii eksperymentalnych gronkowcowych zapaleń rogówki oka (Dajscs i wsp., 2000; 2002) oraz zapalenia wsierdza u królików (Climo i wsp., 1998). Walencka i wsp. (2005 i 2006) oraz zespół Wu i wsp. (2003) potwierdzili wysoką aktywność lizostafiny w stosunku do biofilmu gronkowcowego, z kolei Kokai-Kun i wsp. (2009) wykazali przydatność enzymu do eradykacji biofilmu z powierzchni cewników. Dość powszechnym zjawiskiem u ludzi, a także u zwierząt jest stałe lub okresowe nosicielstwo gronkowców, czyli obecność tych bakterii w organizmie bez objawów stanu chorobowego. Występowanie bakterii w organizmie, w przypadku *S. aureus* głównie w obrębie błon śluzowych nosa i gardła oraz skóry, w sposób zdecydowany zwiększa ryzyko rozwoju infekcji. W zespołach Kokai-Kun (2003) oraz Cui (2010) opracowano kremy zawierające lizostafinę, które z sukcesem zastosowano do eliminacji gronkowców z kanałów nosowych. Kremy takie mogłyby być bardzo przydatne w profilaktyce zakażeń gronkowcowych. Ciekawym kierunkiem zastosowań lizostafiny do celów medycznych było otrzymywanie materiałów opatrunkowych z unieruchomionym białkiem (Miao i wsp., 2011). Otrzymane przez autorów bandaże wykazywały znaczną aktywność przeciwegronkowcową w modelowych układach *in vitro*, przy jednoczesnym braku negatywnego oddziaływania na ludzkie keratynocyty. Przeciwegronkowcowy potencjał lizostafiny wykorzystano także w terapii modelowych infekcji zapalenia gruczołu mlekowego u krów (*mastitis*) (Oldham i Daley 1991). Produkcja rekombinantowego białka w gruczołach mlekowych transgenicznych myszy (Kerr i wsp., 2001) oraz krów (Wall i wsp., 2005) zabezpieczała zwierzęta przed rozwojem infekcji gronkowcowych.

Konieczność stosowania dużych ilości oczyszczonego białka z pewnością tłumaczy mniejsze zainteresowanie wykorzystaniem enzymu do ochrony mikrobiologicznej produktów żywnościowych. Natomiast ciekawym i w mojej ocenie perspektywnym podejściem, jest stosowanie kultur starterowych, np. bakterii fermentacji mlekowej zdolnych do produkcji rekombinantowej lizostafiny. Otrzymane przez Cavadini i wsp. (1996 i 1998) rekombinantowe szczepy *Lactobacillus curvatus* skutecznie eliminowały gronkowce z fermentowanych produktów mięsnych.

Obszerną analizę możliwości wykorzystania przeciwgronkowcowego potencjału lizostafiny, a także innych hydrolaz peptydoglikanu przedstawiono w pracy przeglądowej: [A-2] **Szweda P**, Schielmann M, Kotłowski R, Gorczyca G, Zalewska M, Milewski S. (2012) Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 96(5):1157-74.

Lizostafina stanowiła obiekt moich badań już w trakcie studium doktoranckiego i przygotowywania rozprawy doktorskiej. Wynikiem prowadzonych wówczas prac było otrzymanie trzech układów ekspresyjnych umożliwiających wydajną produkcję tej rekombinantowej bakteriocyny w komórkach bakterii *Escherichia coli* oraz opracowanie metod oczyszczania białka (Szweda i wsp., 2001; Szweda i wsp., 2005). Z kolei celem badań prowadzonych po uzyskaniu stopnia doktora było sprawdzenie w warunkach *in vitro* możliwości wykorzystania lizostafiny jako czynnika przeciwgronkowcowego w medycynie i weterynarii, a także do eliminacji gronkowców z produktów żywnościowych. Badania te przeprowadzono w następujących obszarach:

- optymalizacja warunków produkcji rekombinantowego enzymu (już po uzyskaniu stopnia doktora skonstruowano kolejny układ ekspresyjny oraz zoptymalizowano warunki produkcji białka w komórkach bakterii *E. coli* hodowanych w bioreaktorze),
- określenie skuteczności preparatów oczyszczonego enzymu w eliminacji gronkowców z produktów żywnościowych,
- określenie skuteczności działania lizostafiny w stosunku do szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów, u których stwierdzono zapalenie gruczołu mlekowego,
- otrzymanie i określenie efektywności przeciwgronkowcowej materiałów biopolimerowych (chitozanowo-białkowych) zawierających lizostafinę.

4.2.1. Określenie skuteczności preparatów oczyszczonego enzymu w eliminacji gronkowców z produktów żywnościowych. Optymalizacja warunków produkcji rekombinantowej lizostafiny w komórkach bakterii E. coli.

Jak już wspomniano, badania dotyczące możliwości wykorzystania lizostafiny do eliminacji gronkowców z produktów żywnościowych są zdecydowanie mniej popularne aniżeli badanie potencjału terapeutycznego tej bakteriocyiny. Elementem, który w znacznej mierze ułatwił, czy nawet umożliwił przeprowadzenie tego typu badań w naszym zespole był dostęp do układów ekspresyjnych umożliwiających wydajną produkcję rekombinantowego enzymu. We wstępnej fazie badań korzystano z układów opracowanych przeze mnie w trakcie studium doktoranckiego (pBADLys oraz pETLys). W czasie realizacji badań podjęto decyzję o konieczności przygotowania nowego układu ekspresyjnego – pBAD2Lys. W nowo przygotowanym układzie otrzymywano enzym, w sekwencji którego domenę oligohistydynową (umożliwiającą oczyszczenie białka za pomocą chromatografii metalopowinowactwa) umiejscowiono na C-końcu cząsteczki białka. Jest to modyfikacja opracowanego wcześniej w naszym zespole układu pBADLys. Enzym produkowany w tym układzie zawierał na N-końcu łańcuch polipeptydowego tioredoksynę, domenę oligohistydynową oraz sekwencję rozpoznania dla endoproteazy Factor Xa. W efekcie tak znaczących modyfikacji otrzymywane białko wykazywało niską aktywność właściwą (83 U*/mg), natomiast usuwanie domen fuzyjnych za pomocą endoproteazy było bardzo kosztowne i kłopotliwe (konieczność dodatkowego oczyszczenia po procesie odcinania domen fuzyjnych). Pod względem sekwencji aminokwasowej, enzym otrzymywany w układzie pBAD2Lys był identyczny z enzymem otrzymywanym w układzie pETLys. Aktywność białka otrzymywanego w tym drugim układzie była ponad 10 razy wyższa (970 U/mg) w porównaniu do białka otrzymywanego w układzie pBADLys, jednak produkcja większych ilości białka w układzie pETLys była dość kłopotliwa. Ilość wytwarzanego enzymu była bardzo mocno uzależniona od momentu wprowadzania induktora ekspresji (IPTG - izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozydu) do medium hodowlanego, w efekcie czego w różnych szarżach produkcyjnych uzyskiwano znaczące różnice w wydajności produkcji. Otrzymywanie białka w układzie pBAD2Lys było dużo łatwiejsze i przede wszystkim bardziej powtarzalne. Korzyści te rekompensowały nawet fakt otrzymywania enzymu o niższej aktywności właściwej, około 500 U/mg. Z 1 litra hodowli uzyskiwano około 10 mg oczyszczonego enzymu. Ostatecznie, źródło lizostafiny do dalszych badań stanowił układ ekspresyjny pBAD2Lys.

Ze względu na konieczność przygotowywania znacznych ilości lizostafiny, która była niezbędna do prowadzenia badań mających na celu określenie możliwości wykorzystania tego białka w medycynie, weterynarii, czy przemyśle żywnościowym, opracowaliśmy warunki powiększenia skali procesu biosyntezy rekombinowanej lizostafiny.

Produkcję białka prowadzono w komórkach bakterii *E. coli* TOP10F' transformowanych plazmidem pBAD2Lys (Szweda i wsp., 2007 – [A-1]) w bioreaktorze o objętości całkowitej 5 dm³ (objętość robocza – objętość hodowli bakteryjnej 3 dm³). Przeprowadzone badania wykazały istotny wpływ parametrów hodowli (napowietrzania, pH oraz temperatury) na wydajność produkcji białka. Hodowla szczepu producenckiego w ustalonych, optymalnych warunkach: liczba obrotów mieszadła (determinuje napowietrzenie hodowli) – 400 obr./min, pH 6,0, temperatura 37°C w podłożu LB umożliwiła otrzymywanie 13 000 jednostek enzymu z 1 dm³ otrzymanej zawiesiny komórek bakteryjnych. Dodatkowo niemal dwukrotny wzrost wydajności uzyskano w wyniku suplementowania medium hodowlanego (podłoże LB) glicerolem, w ilości 3 g/dm³ x godz. Ostatecznie z jednej szarży produkcyjnej (3 dm³ hodowli) uzyskiwano niemal 80 000 jednostek enzymu, w porównaniu z 5000 U/dm³ uzyskiwanymi z hodowli prowadzonej w kolbach szklanych. Opracowanie tak wydajnego źródła enzymu było kluczowe z punktu widzenia możliwości wykonania w naszym zespole badań dotyczących otrzymywanych materiałów biopolimerowych z dodatkiem lizostafiny (potencjalnych materiałów opatrunkowych o aktywności przeciwgronkowcowej) oraz określenia aktywności tego białka względem szczepów *S. aureus* wyizolowanych z zapalenia gruczołu mlekowego u krów.

Wyniki badań dotyczących optymalizacji warunków produkcji lizostafiny w komórkach bakterii *E. coli* hodowanych w bioreaktorze przedstawiono w publikacji:

[A-5] **Szweda P**, Gorczyca G, Filipkowski P, Zalewska M, Milewski S. (2014) Efficient production of *Staphylococcus simulans* lysostaphin in a benchtop bioreactor by recombinant *Escherichia coli*. *Prep Biochem Biotechnol.* 44(4):370-81.

W powyższej pracy zamieszczono także wyniki analizy ekonomicznej, która wykazała, że szacunkowy koszt otrzymywania 1000 jednostek enzymu według opracowanej metody wynosi 3,34 euro (około 15 PLN). W naszej ocenie stwarza to realne możliwości stosowania enzymu jako czynnika terapeutycznego, czy nawet do ochrony produktów żywnościowych. Dla porównania, koszt 1 mg lizostafiny o aktywności 500 U/mg sprzedawanej przez firmę Sigma-Aldrich wynosi 585 PLN (<https://www.sigmaaldrich.com>). Z przeprowadzonego przez nas badania rynku wynika, że aktualnie jeden z najtańszych preparatów lizostafiny (nazwa handlowa AMBICIN L) proponowany jest przez firmę AMBI

(<http://www.lysostaphin.com/cofa.html>). Koszt 50 mg białka o aktywności około 4000 U/mg to 600 dolarów amerykańskich (około 3 dolary za 1000 jednostek). W opracowanej, w naszym zespole metodzie hodowlę szczepu produkcyjnego prowadzono w bioreaktorze o objętości roboczej zaledwie 3 litrów. W naszej ocenie jest to bardzo dobra baza wyjściowa, która po zaadoptowaniu do większych urządzeń mogłaby służyć do otrzymywania rekombinantowej lizostafiny w bardzo dużej skali. Bez wątpienia obniżeniu uległyby także koszty otrzymywania białka w przeliczeniu na 1000 jednostek aktywności.

Dysponując preparatem rekombinowanej lizostafiny, przeprowadziliśmy badania mające na celu określenie możliwości praktycznego zastosowania tego białka. W pierwszym etapie, badania te dotyczyły wykorzystania lizostafiny do eliminacji gronkowców z produktów żywnościowych.

Badania skuteczności działania enzymu wykonano dla trzech produktów: mleka UHT, mielonego mięsa wieprzowego oraz sałatki warzywnej. Do wszystkich produktów wprowadzono bakterie *S. aureus* (gęstość końcowa 10^4 (jednostek tworzących kolonie) jtk/ml lub jtk/g) oraz enzym (stężenie końcowe 1,5 lub 3,0 $\mu\text{g/ml}$, w przypadku produktów stałych odpowiednio $\mu\text{g/g}$). Skuteczność działania enzymu analizowano w określonych odstępach czasowych: po 1, 3, 6 i 24 godzinach w przypadku mleka (inkubowanego w temperaturze 20 lub 4°C) oraz po 1, 5 i 24 godzinach w przypadku sałatki i mięsa (oba produkty inkubowano w 4°C) poprzez porównanie liczby żywych komórek *S. aureus* obecnych w produktach suplementowanych enzymem oraz w próbach kontrolnych (produkty zanieczyszczone bakteriami bez dodatku białka). Jedynym produktem, w przypadku którego nie stwierdzono żadnego pozytywnego efektu dodatku enzymu było mleko zawierające niższe stężenie lizostafiny (1,5 $\mu\text{g/ml}$), które inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 20°C. W przypadku produktów zawierających wyższe stężenie białka (3,0 $\mu\text{g/ml}$ lub $\mu\text{g/g}$) inkubowanych przez 24 godziny najniższą aktywność, redukcję liczby bakterii o około 0,5 rzędu logarytmicznego stwierdzono w przypadku sałatki warzywnej. Z kolei najwyższą redukcję liczby bakterii, o około 2,6 rzędu logarytmicznego, zaobserwowano w przypadku mleka inkubowanego w temperaturze 4°C. Przeprowadzone badania wykazały także, że składniki wszystkich badanych produktów wyraźnie wpływały na obniżenie aktywności enzymu. W kontrolnych zawiesinach bakterii (10^4 jtk/ml) sporządzonych w roztworze PBS i inkubowanych w takich samych warunkach (4 lub 20°C) po 24 godzinach inkubacji, analogiczne ilości lizostafiny spowodowały całkowitą eliminację żywych komórek *S. aureus*. Pomimo wyraźnego obniżenia skuteczności działania enzymu w środowisku

produktów żywnościowych, uzyskane wyniki potwierdziły zasadność stosowania lizostafiny do eliminacji gronkowców z produktów spożywczych.

Wyniki uzyskane w ramach tej części badań przedstawiono w pracy:

[A-1] Szweda P, Kotłowski R, Łącka I, Synowiecki J. (2007) Protective effect of lysostaphin from *Staphylococcus simulans* against growth of *Staphylococcus aureus* in milk and some other food products. *J Food Safety* 27(3):265-274.

* - jednostka aktywności lizostafiny (U) definiowana jest jako ilość białka, która powoduje spadek gęstości optycznej (mierzonej w temperaturze 37°C przy długości fali 600 nm) w 6 ml zawiesiny komórek bakterii *S. aureus* z 0,25 do 0,125 w ciągu 10 min.

4.2.2. Określenie skuteczności działania lizostafiny w stosunku do szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów, u których stwierdzono zapalenie gruczołu mlekowego

Celem tej części badań było określenie wrażliwości/oporności 123 szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów, u których stwierdzono podkliniczną postać *mastitis* (zapalenia gruczołu mlekowego) w stosunku do 20 antybiotyków oraz 3 alternatywnych czynników przeciwgronkowcowych: lizostafiny, polimyksyny B oraz nizyny. Najwyższy poziom oporności stwierdzono w przypadku antybiotyków β -laktamowych: penicyliny G (n=29, 23,6%), ampicyliny (n=28, 22,8%) i amoksycyliny (n=22, 17,9%). Jeden z izolatów wykazywał oporność na sześć badanych antybiotyków, kolejne dwa szczepy wykazywały brak wrażliwości w stosunku do pięciu badanych leków. W przypadku dwóch szczepów stwierdzono obecność genu *mecA*. Wyniki uzyskane w tej części badań jednoznacznie potwierdzają konieczność poszukiwania nowych metod walki z gronkowcami, które są czynnikiem etiologicznym stanów zapalnych gruczołu mlekowego u krów, a także innych zwierząt. Spośród trzech przebadanych (w warunkach *in vitro*), alternatywnych substancji przeciwgronkowcowych, zdecydowanie najwyższą aktywność stwierdzono w przypadku lizostafiny. Wszystkie z 37 izolatów, które wykazywały oporność w stosunku do co najmniej jednego antybiotyku oraz 2 szczepy kontrolne (brak oporności na badane antybiotyki) były wrażliwe na działanie tego enzymu. Wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration - Minimalne Stężenie Hamujące) lizostafiny dla wszystkich badanych izolatów mieściły się w zakresie 0,008-0,5 $\mu\text{g/ml}$. Zadawalającą aktywność stwierdzono także w przypadku nizyny. Wrażliwość (MIC \leq 32 $\mu\text{g/ml}$) na działanie tego peptydu stwierdzono w przypadku 21 z 39 przebadanych izolatów. Polimyksyna B wykazywała nieco niższą skuteczność działania; wartości MIC dla badanych szczepów zawierały się w zakresie stężeń od 32 do 128 $\mu\text{g/ml}$.

Wyniki uzyskane w ramach tej części badań przedstawiono w pracy:

[A-4] **Szweda P**, Schielmann M, Frankowska A, Kot B, Zalewska M. (2014) Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. *J Vet Med Sci.* 76(3):355-62.

Możliwości wykorzystania lizostafiny w terapii gronkowcowych zakażeń gruczołu mlekowego u zwierząt wstępnie potwierdzają także badania innych autorów. Ceotto-Vigoder i wsp. (2016) wykazali wysoką skuteczność działania enzymu w stosunku do biofilmu formowanego przez szczepy *S. aureus* wyizolowane z *mastitis* u krów. Z kolei badania zespołu Verbree i wsp. (2017) potwierdziły, że rekombinantowa lizostafyna zachowuje znaczną aktywność gronkowcobójczą w mleku krowim, co jest bardzo istotne z punktu widzenia skuteczności działania tego białka w warunkach *in vivo* – w gruczole mlekowym (analogiczne wyniki uzyskano także w badaniach naszego zespołu – Szweda i wsp. 2007 – [A-1]).

Ostateczna weryfikacja przydatności i skuteczności działania lizostafiny w terapii *mastitis* wymaga przeprowadzenia badań w warunkach *in vivo* - na modelach zwierzęcych. Warto wspomnieć, że w literaturze opublikowano już szereg prac, które pozwalają przypuszczać, że także w środowisku gruczołu mlekowego enzym będzie wykazywał wysoką skuteczność działania. Sugerują to np. wyniki opublikowane przez Kerr i wsp. (2001) oraz Wall i wsp. (2005), którzy otrzymywali transgeniczne zwierzęta produkujące aktywną biologicznie lizostafinę w gruczołach mlekowych.

Dzięki współpracy z grupą prof. Antoniego Jakubczaka z Państwowej Wyższej Szkoły Informatyki i Przedsiębiorczości w Łomży, przeprowadziliśmy bardzo wstępne badania skuteczności otrzymywanej przez nas lizostafiny w warunkach *in vivo*. Roztwory rekombinantowego enzymu wykorzystano w terapii *mastitis* u 10 krów (we wszystkich przypadkach potwierdzono, że czynnikiem etiologicznym schorzenia są bakterie *S. aureus*). Enzym podawano do zainfekowanego gruczołu poprzez kanały strzykowe po trzech kolejnych, wieczornych udojach. Całkowita ilość enzymu wprowadzona do każdej z ćwiartek zakażonych gruczołów wynosiła około 12,5 mg. Pozytywny wynik terapii - brak bakterii *S. aureus* w posiewie mleka po trzech tygodniach od podania ostatniej dawki enzymu stwierdzono w przypadku 7/10 osobników. Uzyskane wyniki opublikowano jedynie w czasopiśmie naukowym o zasięgu lokalnym – *Advances in Agricultural Science* (Jakubczak i wsp., 2010). Prace te miały charakter rozpoznawczy. Jednoznaczne określenie skuteczności działania białka w środowisku gruczołu mlekowego bez wątplenia wymagałoby wykonania

badania w zdecydowanie większej skali, z wykorzystaniem większej grupy zwierząt, bardziej szczegółowy powinien być także monitoring przebiegu procesu terapeutycznego. Niestety, z powodu śmierci prof. Jakubczaka, próby wykorzystania lizostafiny w terapii zapalenia gruczołu mlekowego krów nie były kontynuowane.

W skali globalnej terapia gronkowcowych zakażeń gruczołu mlekowego zwierząt wiąże się ze zużyciem bardzo dużej ilości antybiotyków. W wielu przypadkach nie udaje się uzyskać pożądanego efektu leczenia. Jednak najważniejszą negatywną konsekwencją masowego stosowania antybiotyków w weterynarii jest bez wątpienia selekcja szczepów opornych, które następnie stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi. Poszukiwanie alternatywnych, nieantybiotykowych metod terapii zapalenia gruczołu mlekowego u zwierząt jest więc jak najbardziej uzasadnione. W mojej ocenie, lizostafina jest jedną z najbardziej perspektywicznych nieantybiotykowych substancji, które mogą znaleźć zastosowanie w terapii *mastitis* u krów.

4.2.3. Otrzymywanie i określenie aktywności przeciwgronkowcowej materiałów biopolimerowych (chitozanolowo-białkowych) zawierających lizostafinę

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, głównie *S. aureus* oraz *S. epidermidis* należą do najważniejszych czynników etiologicznych zakażeń skóry oraz ran. Zastosowanie lizostafiny do eliminacji gronkowców w tego typu infekcjach (np. jako przeciwdrobnoustrojowy składnik materiałów opatrunkowych) wydaje się jednym z najbardziej realnych i perspektywicznych kierunków wykorzystania tej bakteriocydu w praktyce klinicznej.

W naszym zespole prowadzone są prace nad materiałami biopolimerowymi, mogącymi znaleźć zastosowanie do wytwarzania opatrunków. Materiały te, składają się wyłącznie z substancji naturalnych: chitozanu (główny komponent), kolagenu i żelatyny (dodawanych w celu uzyskania produktów o pożądanym cechach fizykochemicznych, np. elastyczności), genipiny (czynnik sieciujący) oraz lizostafiny (dodawanej w celu uzyskania materiału o aktywności przeciwgronkowcowej). Gwarantuje to ich biokompatybilność oraz eliminuje ryzyko toksycznego oddziaływania z uszkodzonymi tkankami człowieka lub zwierząt. Elementem unikatowym zaproponowanej przez nas technologii jest rozpuszczanie chitozanu w wodzie nasycanej gazowym CO₂. W wyniku rozpuszczania ditlenku węgla w wodzie tworzy się kwas węglowy. Obniżenie pH roztworu umożliwia rozpuszczenie biopolimeru (chitozanu). Kwas węglowy jest kwasem nietrwałym, który bardzo szybko ulega rozkładowi, a uwalniany w procesie rozkładu CO₂ ulatnia się z mieszaniny, co skutkuje wytrącaniem chitozanu połączonego z pozostałymi składnikami mieszaniny w postaci hydrożelu. Po jego zamrożeniu i liofilizacji otrzymuje się produkt porowaty o strukturze gąbczastej

(Gorczyca i wsp., 2014). W celu uzyskania produktu o odpowiednich właściwościach fizycznych, do mieszaniny dodaje się określoną ilość żelatyny i kolagenu oraz czynnika sieciującego - genipiny. Stosowanie powyższej technologii umożliwia wprowadzenie do struktury otrzymywanych materiałów biopolimerowych białkowej substancji przeciwdrobnoustrojowych bez ryzyka utraty ich aktywności.

Znaczną aktywność przeciwgronkowcową gąbczastych materiałów chitozanowo-białkowych zawierających lizostafinę potwierdzono względem 143 szczepów *S. aureus*, w tym 93 izolatów odzwierzęcych i 50 szczepów klinicznych wyizolowanych z ran, zakażeń skóry oraz tkanek miękkich u ludzi, z których 6 wykazywało fenotyp MRSA. Przeprowadzone badania wykazały, że pomimo stosowania czynnika sieciującego (genipiny), znaczna część immobilizowanego enzymu pozostawała w strukturze biopolimeru w formie niezwiązanej i była stopniowo uwalniana do otoczenia. Jest to bardzo korzystne z punktu widzenia potencjalnego zastosowania tego produktu do konstrukcji materiałów opatrunkowych o aktywności przeciwgronkowcowej. Stwierdzono także, że liofilizowane materiały biopolimerowe zawierające lizostafinę zachowują 100% swojej aktywności biologicznej w trakcie półrocznego przechowywania w temperaturze 4°C.

Wyniki uzyskane w tej części badań stanowią podstawę publikacji oraz uzyskanego patentu:
[A-6] **Szweda P**, Gorczyca G, Tylingo R, Kurlenda J, Kwieciński J, Milewski S. (2014) Chitosan-protein scaffolds loaded with lysostaphin as potential antistaphylococcal wound dressing materials. *J Appl Microbiol.* 117(3):634-42.

[A-8] Gorczyca G, Tylingo R, **Szweda P**, Milewski S, Sadowska M, Zalewska M, Sposób wytwarzania chitozanowo-białkowego materiału biopolimerowego. Patent polski PL 223280 B1.

W toku przeprowadzonych przez nas badań stwierdzono także, że oprócz aktywności przeciwgronkowcowej, otrzymywany materiał biopolimerowy posiada szereg cech korzystnych z punktu widzenia zastosowania go do produkcji opatrunków. Do najważniejszych jego zalet należy zaliczyć: stabilność (brak zauważalnych cech biodegradacji) w warunkach docelowego użytkowania, porowatą strukturę, zdolność pochłaniania znacznych ilości wysięku, umożliwienie wymiany gazowej oraz aktywność przeciwutleniającą. Nie stwierdzono efektu cytotoksycznego względem komórek mysich fibroblastów (Gorczyca i wsp., 2014). Wyniki te dodatkowo potwierdzają możliwość wykorzystania opracowanych materiałów w terapii zakażeń trudno gojących się ran o etiologii gronkowcowej.

W naszym zespole przeprowadzono także badania, których celem było porównanie aktywności bakteriobójczej komercyjnie dostępnych materiałów opatrunkowych

zawierających składniki przeciwbakteryjne: srebro (różne formy), miód manuka, chloroheksydynę, jod w postaci jodopowidonu (rozpuszczalny kompleks jodu i poliwinylpyrrolidonu) oraz przygotowywanego przez nas materiału chitozanowo-białkowego zawierającego lizostafinę. Badania te wykazały, że aktywność gronkowcóbója produktów zawierających lizostafinę była porównywalna z aktywnością najbardziej skutecznych materiałów komercyjnych: Mepilex Ag (zawierającego siarczan srebra jako czynnik przeciwbakteryjny) oraz Inadine (zawierającego jodopowidon jako składnik aktywny). W przypadku każdego z powyższych materiałów zaledwie czterogodzinna inkubacja skutkowała całkowitą eliminacją żywych komórek *S. aureus* z zawiesiny.

Kolejnym ciekawym wynikiem, który uzyskano w tej części badań było wykazanie znacznego potencjału przeciwgronkowcowego komercyjnie dostępnego materiału opatrunkowego Algivon zawierającego miód manuka. W teście krążkowo-dyfuzyjnym produkt ten wykazywał jedną z najwyższych aktywności, z średnicą zahamowania wzrostu wzorcowego szczepu *S. aureus* wynoszącą 20,5 mm. W przypadku najbardziej aktywnych produktów Melgisorb Ag i Mepilex AG średnice zahamowania wzrostu tego samego szczepu wynosiły odpowiednio 21,1 i 20,9 mm. Miód manuka otrzymywany jest z nektaru kwiatów krzewów *Leptospermum scoparium*, występujących głównie w Nowej Zelandii oraz w południowo-wschodniej Australii. Przeprowadzona przez nas analiza rynku wykazała, że materiały opatrunkowe zawierające miód manuka proponowane są przez wielu producentów, natomiast do produkcji materiałów opatrunkowych praktycznie nie stosuje się miodów pozyskiwanych z innych źródeł botanicznych.

Wyniki badań porównawczych materiałów opatrunkowych opisano w publikacji:

[A-10] **Szweda P**, Gorczyca G, Tylingo R. (2018) Comparison of antimicrobial activity of selected, commercially available, wound dressing materials. *J of Wound Care* 27(5):320-326. doi: 10.12968/jowc.2018.27.5.320.

Niewątpliwą wadą materiałów opatrunkowych zawierających miód manuka jest wysoka cena. Skłoniło nas to do podjęcia badań dotyczących aktywności przeciwbakteryjnej (głównie przeciwgronkowcowej) miodów pozyskiwanych w polskich pasiekach oraz weryfikacji przydatności tych produktów w terapii zakażeń gronkowcowych, np. jako składnik materiałów opatrunkowych. Badania te są przez nas kontynuowane.

4.3. Bakterie *Staphylococcus* spp. wyizolowane z mleka krów, u których stwierdzono mastitis, skóry oraz zainfekowanych ran u ludzi jak źródło bakteriocyn polipeptydowych o aktywności przeciwgronkowcowej

Dotychczas w literaturze opisano zaledwie kilka przykładów peptydów przeciwdrobnoustrojowych wytwarzanych zarówno przez koagulazoujemne (CNS – Coagulase-Negative Staphylococci) jak i koagulazodatnie (CPS – Coagulase-Positive Staphylococci) gronkowce. Do najbardziej perspektywicznych należą: Pep5, Epicidyna 280, Epilancyna K7, Epidermina, Nukacyna ISK-1, Simulancyna 3299 (produkowane przez CNS) oraz Aureocyna A53, Aureocyna A70, czy Staphylococyna C55 (syntetyzowane w komórkach gronkowców CPS) (Nascimento i wsp., 2006; Varella Coelho i wsp., 2007; Bastos i wsp. 2009). W przyszłości peptydy tego rodzaju mogą stanowić ciekawą alternatywę dla terapii antybiotykowej infekcji gronkowcowych lub znaleźć zastosowanie do eliminacji tych bakterii z produktów żywnościowych. W ramach prowadzonych w naszym zespole badań, podjęliśmy próbę identyfikacji szczepów bakterii z rodzaju *Staphylococcus* zdolnych do produkcji nowych, nieznanych dotąd bakteriocyn wykazujących aktywność przeciwgronkowcową.

Do badań wykorzystano kolekcję 206 szczepów bakterii *Staphylococcus* spp.: 58 izolatów, które wyodrębniono z infekcji tkanek miękkich lub ran u ludzi oraz 158 szczepów wyizolowanych z mleka krów, u których stwierdzono zapalenie gruczołu mlekowego. Nasze badania wykazały, że 6 izolatów, należących do dwóch gatunków: *S. aureus* i *S. xylosus*, posiada zdolność wytwarzania substancji przeciwgronkowcowych. Testy wrażliwości na działanie enzymów proteolitycznych wykazały polipeptydowy charakter 3 z tych substancji, a wydajną sekrecję potencjalnej bakteriocyny do medium hodowlanego uzyskano tylko w przypadku polipeptydu produkowanego przez szczep M2B (*S. xylosus*), wyizolowanego z gruczołu mlekowego krowy. Produkowany peptyd wykazywał znaczną aktywność bakteriobójczą w stosunku do 13 szczepów odzwierzęcych: 9 szczepów *S. aureus*, 1 szczepu *S. epidermidis* i 3 szczepów *S. xylosus*. Pozostałe szczepy z kolekcji (liczącej 206 izolatów) nie wykazywały wrażliwości na działanie potencjalnej bakteriocyny. Opracowano warunki efektywnej produkcji peptydu i jego sekrecji do podłoża.

Wyniki uzyskane w tej części badań zostały przedstawione w publikacji:

[A-11] Zalewska M, Churey JJ, Worobo RW, Milewski S, **Szweda P.** (2018) Isolation of bacteriocin-producing *Staphylococcus* spp. strains, obtained from human skin wounds, soft

tissue infections, and bovine mastitis. *Pol J Microbiol* 67(2):1-7. doi: 10.21307/pjm-2018-018.

Aktualnie w naszym zespole prowadzone są pod moim kierunkiem badania, których celem jest optymalizacja procesu oczyszczania, ustalenie sekwencji aminokwasowej peptydu oraz ustalenie mechanizmu jego działania przeciwgronkowcowego.

Zamierzam kontynuować badania dotyczące identyfikacji nowych bakteriocyn, w tym także produkowanych przez bakterie izolowane z produktów pszczelich. W naszej ocenie istnieją duże szanse na identyfikację szczepów produkujących bakteriocyny lub inne substancje skutecznie eliminujące gronkowce, w tym szczepy wielolekooporne. W przyszłości mogłyby one znaleźć zastosowanie w profilaktyce i terapii infekcji wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* (głównie miejscowych) oraz do eliminacji tych mikroorganizmów z produktów żywnościowych.

4.4. Miód jako potencjalny czynnik przeciwgronkowcowy

Miód jest nie tylko cenionym produktem spożywczym. Od wieków był to jeden z najważniejszych leków stosowanych w medycynie ludowej. Aktywność przeciwbakteryjną miodu wykorzystywano głównie do leczenia trudno gojących, zainfekowanych ran. Aktualny stan wiedzy z zakresu mechanizmu i metod badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych tego produktu oraz przykłady prób jego stosowania do eliminacji wybranych patogenów w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* zostały przedstawione w 2 pracach przeglądowych mojego autorstwa/współautorstwa, które ukazały się w postaci rozdziałów w książkach wydawnictwa InTech (Szweda 2017; Szweda i Kot 2017).

Pomimo istnienia dość bogatego piśmiennictwa dotyczącego właściwości przeciwdrobnoustrojowych miodów z różnych regionów świata, brak było podobnych danych dotyczących miodów pochodzących z polskich pasiek. W tej sytuacji uznaliśmy za celowe podjęcie badań potencjału przeciwbakteryjnego, głównie przeciwgronkowcowego, miodów pozyskiwanych w polskich pasiekach. Badania te finansowane są przez NCN w ramach grantu „Ocena możliwości wykorzystania produktów pszczelich oraz bakteriocyn syntetyzowanych przez mikroflorę tych produktów jako alternatywę lub uzupełnienie klasycznej antybiotykoterapii”, przyznanego w programie SONATA BIS, którego jestem kierownikiem. Projekt realizowany jest we współpracy z dr Piotrem Kusiem z Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz prof. Randy Worobo z Uniwersytetu Cornell (USA)

Główny materiał badawczy stanowiła kolekcja miodów dostarczonych przez pszczelarzy z regionu północnej Polski (95 próbek). W zdecydowanej większości były to miody wielokwiatowe (64 próbki). Do badań wykorzystano także 22 próbki miodów zakupionych w sklepach ze zdrową żywnością, 12 produktów zakupionych w hipermarketach oraz 15 miodów otrzymanych z pasiek zagranicznych (w tym miód manuka o wysokiej zawartości metyloglioksalu – 550 mg/kg).

Przeprowadzone przez nas testy wykazały, że badane miody różniły się aktywnością przeciwbakteryjną i różnice te związane były m.in. z pochodzeniem geograficznym oraz botanicznym. Zdecydowanie najwyższą aktywność wykazywały miody pozyskiwane w północnej Polsce, w okolicach Gdańska. Pięć z tych produktów hamowało wzrost referencyjnych szczepów *S. aureus* w stężeniu 1,56% (v/v). Jest to wartość dwukrotnie niższa od wartości wykazywanej przez miód manuka. W przypadku *S. epidermidis*, taką samą wartość MIC uzyskano dla siedmiu produktów. Nieco niższy potencjał przeciwbakteryjny stwierdzono w przypadku miodów odmianowych pozyskiwanych w pasiekach zlokalizowanych w południowej części kraju. Rozpatrując pochodzenie botaniczne badanych miodów, najwyższą aktywność przeciwgronkowcową wykazywały miody chabrowe, tymiankowe, gryczane, faceliowe i cząbrowe. Niską aktywność stwierdzono w przypadku miodów rzepakowych oraz pozyskiwanych z kwiatów drzew owocowych (jabłoni i wiśni). Wszystkie miody (z wyjątkiem miodu manuka) były wrażliwe na podgrzewanie i traciły aktywność przeciwbakteryjną w obecności katalazy. Uzyskane w tej części badań wyniki potwierdzają wysoki potencjał przeciwbakteryjny miodów ciemnych, zawierających duże ilości polifenoli.

Wysoką efektywność przeciwgronkowcową najbardziej aktywnych miodów (otrzymanych z pasiek zlokalizowanych w Polsce północnej) potwierdzono także względem 12 izolatów klinicznych *S. aureus*, 6 odzwierzęcych (wyizolowanych z zainfekowanych gruczołów mlekowych krów) oraz 6 wyizolowanych z zainfekowanych ran u ludzi. Wszystkie badane produkty (n=12) skutecznie hamowały wzrost badanych szczepów w zakresie stężeń od 0,78 do 3,12% (v/v). Nieco niższą, ale nadal znaczącą aktywność stwierdzono dla badanych miodów wobec bakterii Gram-ujemnych. Stwierdzono także, że w przypadku wielu miodów uzyskanie efektu bakteriobójczego wymaga stosowania stężeń wyższych aniżeli wartość MIC. Co najmniej dwukrotne różnice w wartościach stężeń MIC i MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*) w stosunku do *S. aureus* ATCC 25923 stwierdzono dla 42 badanych produktów. Test kinetyczny (time-kill assay) wykazał ponadto, że uzyskanie 100% efektu bakteriobójczego wymaga wydłużonej inkubacji komórek gronkowców z

miodem w stężeniu równym, jak i dwukrotnie przewyższającym wartość MBC. Całkowitą eliminację żywych komórek z zawiesiny uzyskiwano dopiero po 24 godzinach. Zdecydowanie niższą efektywność działania miodu zaobserwowano w stosunku do biofilmu formowanego przez badane izolaty *S. aureus*. W przypadku większości badanych produktów skuteczną eradykację biofilmu uzyskano stosując roztwór zawierający miód w stężeniu co najmniej 25% (v/v). Co ciekawe, niższe stężenia (w niektórych przypadkach nawet 25% (v/v)) stymulowały wzrost biofilmu. Biorąc pod uwagę źródło botaniczne nektaru, który wykorzystywały pszczoły do produkcji miodu, najwyższą aktywność (MIC=1,56% (v/v) w stosunku do obydwu szczepów *S. aureus*) wykazywały miody wielokwiatowe (2 produkty) oraz gryczane (3 produkty). Wyniki te dostarczają wielu istotnych wskazówek dotyczących potencjalnego stosowania miodu w praktyce klinicznej, na przykład jako składnik aktywny materiałów opatrunkowych. Biorąc pod uwagę znaczną oporność biofilmu raczej niewskazane byłoby stosowanie rozcieńczonych form miodu o stężeniu poniżej 50% (v/v), należałoby także uwzględnić konieczność wydłużonego oddziaływania składników produktu na bakterie. W zakresie źródła botanicznego produktu największy potencjał terapeutyczny, przeciwbakteryjny, wykazują miody gryczane oraz niektóre wielokwiatowe. W przypadku miodów wielokwiatowych duża grupa badanych produktów wykazywała jednak niską skuteczność działania lub całkowity brak aktywności. Wysoka aktywność przeciwbakteryjna miodów gryczanych jest cechą charakterystyczną tego produktu i najprawdopodobniej wynika z jego składu chemicznego (badania w trakcie).

Wyniki dalszych badań jednoznacznie wykazały, że kluczową rolę w aktywności wszystkich badanych miodów, z wyjątkiem miodu manuka, odgrywała enzymatyczna synteza nadtlenu wodoru, generowanego w katalizowanej przez oksydazę glukozową reakcji utleniania glukozy do kwasu glukonowego. Do ciekawych wniosków doprowadziły analizy statystyczne wyników dotyczące zależności pomiędzy aktywnością przeciwbakteryjną a innymi właściwościami fizykochemicznymi badanych miodów. Wyraźne pozytywne korelacje stwierdzono w przypadku potencjału antyoksydacyjnego oraz zawartości związków fenolowych, w tym polifenoli. Sugeruje to, że fitozwiązki obecne w miodzie w istotny sposób wpływają na aktywność przeciwbakteryjną tego produktu. Analizy statystyczne wykazały także pozytywną korelację pomiędzy efektywnością przeciwgronkowcową a ilością generowanego enzymatycznie H_2O_2 . Przy czym w roztworach miodów charakteryzujące się najniższymi wartościami MIC (1,56% (v/v)) stwierdzono bardzo niskie stężenia tej substancji. W celu wyjaśnienia tego zjawiska przeprowadzono badania, których celem było określenie ilości nadtlenu wodoru, który zostanie wygenerowany w roztworach miodu przygotowanych

nie w wodzie a w 100 μM roztworze H_2O_2 . Zakładaliśmy, że ilości te będą się sumowały. Wynik zgodne z założeniami uzyskano dla wybranych miodów wielokwiatowych, spadziowych oraz lipowych. Natomiast w przypadku produktów odmianowych, gryczanych oraz rzepakowych stwierdzono zanik nadtlenu wodoru. Taki rezultat sugeruje, że fitozwiązki obecne w tych miodach bardzo szybko reagują z H_2O_2 , przy czym produkty reakcji powstające w miodzie gryczanym wykazują bardzo wysoką aktywność przeciwbakteryjną (zdecydowanie przewyższającą efektywność samego nadtlenu wodoru), natomiast produkty powstające w roztworze miodu rzepakowego nie wykazują potencjału bakteriostatycznego czy bakteriobójczego. W mojej ocenie, wyniki tego eksperymentu stanowią istotny wkład w badania mechanizmu przeciwbakteryjnego działania miodu. Pierwotnie zakładano, że czynnikiem, który bezpośrednio decyduje o potencjale przeciwbakteryjnym tego produktu jest wyłącznie obecność H_2O_2 . Badania prowadzone w zespole z Brock University (Kanada) wykazały jednak, że ilości nadtlenu wodoru generowane w roztworach miodów są niemal 900 razy mniejsze od stężenia tej substancji w dezynfektantach i są zbyt niskie by w pełni tłumaczyć efektywność przeciwbakteryjną tego produktu (Brudzynski i wsp., 2011). W kolejnych publikacjach Brudzynski i wsp., stosując miód gryczany jako model, wykazali, że obecne w nim substancje pochodzenia roślinnego, głównie związki fenolowe, katalizują powstawanie z nadtlenu wodoru rodników hydroksylowych, które wykazują bardzo wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową (Brudzynski i wsp. 2012a i b; Brudzynski i Lannigan 2012). Wyniki uzyskane w naszym zespole potwierdzają obserwacje zespołu kanadyjskiego w odniesieniu do miodów gryczanych, jednak w badanych roztworach miodów lipowych, wielokwiatowych oraz spadziowych, które także wykazywały znaczny potencjał przeciwegronkowcowy, nie obserwowaliśmy tak szybkiego zaniku nadtlenu wodoru. Związek ten był raczej kumulowany. Sugeruje to nieco odmienny mechanizm aktywności przeciwbakteryjnej tych produktów, przy czym bez wątpienia nadtlenek wodoru oraz fitozwiązki są w tej kwestii kluczowe.

Aktualnie w naszym zespole prowadzone są badania, których celem jest wyjaśnienie mechanizmów oraz identyfikacja składników chemicznych (fitozwiązków) decydujących o wysokiej aktywności miodów innych niż gryczany.

Zaobserwowana niższa aktywność przeciwbakteryjna miodów kupowanych w sklepach (zarówno hipermarketach jak i sklepach ze zdrową żywnością) jest najprawdopodobniej konsekwencją procesu dekrystalizacji – upłynniania skryzalizowanego produktu poprzez podgrzewanie. Proces ten jest często prowadzony przez sprzedawców hurtowych lub właścicieli dużych pasiek, którzy przetrzymują większe ilości miodu

w opakowaniach zbiorczych – beczkach, w których zachodzi krystalizacja. Przeniesienie miodu do opakowań detalicznych (zwykle słoiki) wymaga jego upłynnienia. W celu zachowania aktywności biologicznej produktu dekrystalizacja powinna być prowadzona w specjalnych urządzeniach (komorach dekrystalizacyjnych) w temperaturze nie wyższej niż 40°C. Jest to proces długotrwały, całkowite rozpuszczenie kryształów trwa zwykle kilka dni. Niska aktywność wielu produktów zakupionych w sklepach (w tym nawet miodów gryczanych) wskazuje, że niektórzy z producentów prowadzą zapewne proces dekrystalizacji w sposób nieprawidłowy, w zbyt wysokiej temperaturze. Zdecydowanie skraca to czas trwania procesu, niestety, bardzo negatywnie wpływa na aktywność biologiczną miodu. W naszej ocenie zdecydowanie najlepszym rozwiązaniem tego problemu byłoby rozlewanie produktów od razu do pojemników docelowych, w których trafią one do konsumenta. W przypadku miodów, które miałyby być wykorzystywane do celów medycznych jako substancje przeciwbakteryjne, jakiegokolwiek działanie podwyższonej temperatury jest wykluczone.

Jak już wspomniano powyżej, z punktu widzenia potencjalnych zastosowań medycznych, na szczególną uwagę zasługuje miód gryczany. Wśród badanych produktów (pochodzących zarówno z pasiek zlokalizowanych w północnej jak i południowej Polsce) zdecydowana większość miodów pozyskiwanych z kwiatów tej rośliny wykazywała aktywność porównywalną lub wyższą od miodu manuka. Biorąc pod uwagę wysoką miododajność gryki (300 kg miodu z 1 ha uprawy, Kołtowski 2006), duży areał jej upraw w Polsce (ponad 82 tys. ha, Raport GUS 2017), znacznie niższą od miodu manuka cenę miodu gryczanego oraz jego wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazaną m.in. w naszych badaniach, należy traktować polski miód gryczany jako potencjalnie konkurencyjny dla miodu manuka do np. konstrukcji opatrunków zawierających miód. Oczywiście należy pamiętać o istotnych ograniczeniach, które aktualnie utrudniają, czy wręcz uniemożliwiają, wykorzystanie potencjału przeciwdrobnoustrojowego miodów (innych niż miód manuka) w praktyce klinicznej, np. jako składników materiałów opatrunkowych. Przede wszystkim należałoby opracować metodę sterylizacji (eliminacji flory bakteryjnej i grzybowej obecnej w miodach), która nie powodowałaby obniżenia aktywności przeciwbakteryjnej, wynikającej przede wszystkim z aktywności oksydazy glukozy, która pod wpływem wysokiej temperatury ulega denaturacji (zjawisko to nie dotyczy miodu manuka, ponieważ jego aktywność wynika z obecności metyloglioksalu, który nie jest substancją termolabilną). Istotnym problemem jest także struktura fizyczna miodów – zjawiskiem naturalnym jest krystalizacja tego produktu, co utrudniałoby na przykład

otrzymywanie materiałów opatrunkowych czy nawet aplikację produktu na zainfekowaną ranę. Aktualnie w naszym zespole prowadzone są badania dotyczące wpływu sterylizacji radiacyjnej (za pomocą promieniowania gamma) oraz kremowania (proces w wyniku, którego miód uzyskuje konsystencję smaru) na aktywność przeciwbakteryjną miodów krajowych.

Istotną zaletą znacznej części produktów pozyskiwanych w pasiekach zlokalizowanych zarówno w południowej, jak i północnej części kraju, jest ich wysoki potencjał antyoksydacyjny. Regularna konsumpcja produktów bogatych w przeciwutleniacze i związki eliminujące wolne rodniki bardzo korzystnie wpływa na zdrowie konsumentów. Obecność przeciwutleniaczy stymuluje także proces regeneracji uszkodzonej tkanki skórnej, co jest dodatkowym, istotnym argumentem przemawiającym za wykorzystaniem miodów do produkcji materiałów opatrunkowych.

Wyniki tej części badań, które jednoznacznie potwierdzają, że miody, szczególnie miód gryczany, należą do bardzo perspektywicznych produktów przeciwegronkowcowych, przedstawiono w dwóch publikacjach:

[A-7] Kuś PM, **Szweda P**, Jerković I, Tuberoso CI. (2016) Activity of Polish unifloral honeys against pathogenic bacteria and its correlation with colour, phenolic content, antioxidant capacity and other parameters. *Lett Appl Microbiol.* 62(3):269-76.

[A-12] Grecka K, Kuś PM, Worobo RW, **Szweda P**. (2018) Phytochemicals are crucial for peroxide-dependent antimicrobial potential of honeys produced in Northern Poland. *Molecules* 28;23(2). pii: E260. doi: 10.3390/molecules23020260.

4.5. Określenie potencjału wirulencji szczepów odzwierzęcych, które wykorzystano w badaniach skuteczności działania alternatywnych czynników przeciwegronkowcowych

Ważnym aspektem prowadzonych przeze mnie i współpracowników badań było weryfikowanie aktywności interesujących nas alternatywnych czynników przeciwegronkowcowych (lizostafiny, peptydów oraz miodu) względem dużej grupy szczepów, głównie izolatów odzwierzęcych (wyizolowanych z mleka krów, u których stwierdzono *mastitis*). Oprócz określenia wrażliwości tych szczepów na antybiotyki i czynniki alternatywne ([A-4]) przeprowadziliśmy badania, których celem było ustalenie szczegółowej charakterystyki genetycznej poszczególnych izolatów pod kątem ich potencjału wirulencji oraz zdolności tworzenia biofilmu. Charakterystykę izolatów z ran oraz infekcji skórnych przedstawiono w pracy Sjolund i Kahlmeter (2008). Badacze ci udostępnili nam szczepy do badań.

Gronkowce rosnące w formie biofilmu wykazują znacząco większą oporność na antybiotyki w porównaniu do bakterii rosnących w zawieszynie, w formie planktonicznej (Melchior i Fink-Gremmels 2006; Wu i wsp., 2015; Manner i wsp., 2017). Przeprowadzone w naszym zespole badania wykazały, że 76 spośród 132 (58%) analizowanych szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów, u których stwierdzono zapalenie gruczołu mlekowego, posiada zdolność wzrostu w formie biofilmu w warunkach *in vitro* – na powierzchni ścianek w celkach płytek titracyjnych. Z kolei, testy genetyczne wykazały obecność operonu *icaADBC* (warunkującego tworzenie biofilmu) w genomach wszystkich badanych szczepów. W związku z tym, wszystkie badane izolaty należy zaklasyfikować jako potencjalnie zdolne do tworzenia biofilmu. Obserwowane różnice w wynikach testu fenotypowego (wzrost biofilmu w celkach płytek titracyjnych) oraz testu genotypowego (obecność genów operonu *icaADBC*) są najprawdopodobniej konsekwencją wpływu warunków wzrostu izolatów na ich zdolność do tworzenia biofilmu.

W grupie 124 izolatów analizowano obecność genów kodujących 30 różnych czynników wirulencji: adhezyn, proteaz oraz toksyn. Badania wykonano za pomocą klasycznej reakcji PCR. Spośród adhezyn najczęściej identyfikowano obecność genów: *eno* (91,1%), kodującego białko wiążące lamininę oraz *fib* (82,3%) kodującego białko wiążące fibrynogen. W przypadku ponad 90% izolatów wykryto obecność genów kodujących proteazy serynowe *splA* oraz *sspA*. Z kolei do najczęściej identyfikowanych genów kodujących enterotoksyny należały: *sei* (21,0%), *sem* (19,4%), *sen* (19,4%), *seg* (18,5%) oraz *seo* (13,7%). Najczęściej identyfikowaną kombinację genów kodujących czynniki wirulencji: *fib*, *eno*, *fnbB*, *splA*, *splE*, *sspA* stwierdzono u 17,7% izolatów.

Uzyskane wyniki potwierdzają znaczny potencjał wirulencji badanych szczepów, w tym zdolność wzrostu w formie biofilmu. W przypadku większości analizowanych czynników trudno przewidzieć ich ewentualny wpływ na skuteczność działania antybiotyków czy alternatywnych czynników przeciwdrobnoustrojowych. W przypadku szczepów zdolnych do efektywnej produkcji proteaz można na przykład zakładać obniżoną wrażliwość w stosunku do substancji białkowych (np. lizostafyna czy nizyna). Bez wątplenia jednak najbardziej znaczące, negatywne konsekwencje w zakresie skuteczności eliminacji infekcji gronkowcowych z wykorzystaniem antybiotyków czy środków alternatywnych mogą być spowodowane wzrostem w formie biofilmu. Przeprowadzone badania wykazały, że jest to cecha bardzo rozpowszechniona wśród odzwierzęcych izolatów *S. aureus*, co prawdopodobnie jest jedną z głównych przyczyn niskiej skuteczności antybiotykoterapii zakażeń gronkowcowych gruczołu mlekowego.

Wyniki tej części badań przedstawiono w postaci dwóch publikacji:

[A-3] **Szweda P**, Schielmann M, Milewski S, Frankowska A, Jakubczak A. (2012) Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. *Pol J Microbiol.* 61(1):65-9

[A-9] Kot B, **Szweda P**, Frankowska-Maciejewska A, Piechota M, Wolska K. (2016) Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. *J Dairy Res.* 83(2):228-35.

4.6. Podsumowanie

W mojej ocenie, wyniki badań przedstawione w powyższych pracach, a także analiza piśmiennictwa, w sposób jednoznaczny potwierdzają przydatność badanych nieantybiotykowych produktów naturalnych jako potencjalnych czynników terapeutycznych mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu zakażeń gronkowcowych.

Za najważniejsze osiągnięcia badawcze uzyskane przeze mnie i współpracowników uważam:

➤ Badania dotyczące bakteriocyn:

- 1) opracowanie nowego układu ekspresyjnego pBAD2Lys oraz określenie optymalnych warunków produkcji lizostafiny w bioreaktorze;
- 2) potwierdzenie skuteczności enzymu w eliminacji gronkowców z produktów żywnościowych oraz wykazanie jego znacznej aktywności w stosunku do szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów, u których stwierdzono *mastitis* (w tym także szczepów lekoopornych);
- 3) opracowanie metody przygotowywania materiałów biopolimerowych zawierających aktywną lizostafinę oraz wykazanie wysokiej aktywności tych materiałów w stosunku do klinicznych i odzwierzęcych izolatów *S. aureus*.
- 4) wykazanie, że izolaty odzwierzęce i kliniczne *Staphylococcus* spp. są potencjalnym źródłem substancji przeciwgronkowcowych oraz identyfikacja jednego szczepu zdolnego do wydajnej produkcji polipeptydowej bakteriocyny o aktywności przeciwgronkowcowej.

➤ Badania dotyczące miodów:

- 1) określenie aktywności przeciwbakteryjnej dużej grupy miodów, zarówno odmianowych (pozyskiwanych w pasiekach zlokalizowanych w Polsce południowej), jak i wielokwiatowych (pochodzących z pasiek z okolic Gdańska);
- 2) identyfikacja miodów (gryczanych i wielokwiatowych, produkowanych w polskich pasiekach) o bardzo wysokiej, w porównaniu z miodami z innych źródeł geograficznych

opisanymi w dotychczasowej literaturze, aktywności przeciwgronkowcowej (MIC = 1,56%) oraz niskiej termostabilności;

- 3) stwierdzenie wysokiej oporności na miód biofilmu formowanego przez izolaty *S. aureus*;
 - 4) wykazanie, że enzymatyczna synteza nadtlenu wodoru jest kluczowym mechanizmem decydującym o potencjale przeciwbakteryjnym polskich miodów oraz wykazanie istotnego udziału fitozwiązków (zarówno pozytywnego, jak i negatywnego) w mechanizmie aktywności przeciwbakteryjnej tych produktów;
- Wykazanie znaczącej wirulencji oraz oporności na antybiotyki wśród szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów, u których stwierdzono zapalenie gruczołu mlekowego.

Przeprowadzone przeze mnie i współpracowników badania jednoznacznie wykazały znaczny potencjał przeciwgronkowcowy wybranych nieantybiotykowych substancji i produktów naturalnych: lizostafiny, miodów produkowanych w polskich pasiekach oraz peptydów syntetyzowanych przez izolaty *Staphylococcus* spp.. W mojej ocenie, uzyskane w toku badań wyniki potwierdzają zasadność kontynuacji działań dotyczących praktycznego wykorzystania tych substancji/produktów jako czynników terapeutycznych w leczeniu infekcji o etiologii gronkowcowej. Przyszłe badania powinny dotyczyć przede wszystkim potwierdzenia skuteczności tych czynników w warunkach *in vivo*, bezpieczeństwa dla pacjentów oraz sposobu ich stosowania, np. jako składnik materiałów opatrunkowych czy kremów wykorzystywanych w terapii zainfekowanych, trudno gojących się ran (ta część badań jest kontynuowana w naszym zespole).

4.7. Literatura

Almeida PP, Pereira ÍS, Rodrigues KB, Leal LS, Marques AS, Rosa LP, da Silva FC, da Silva RAA. (2017) Photodynamic therapy controls of *Staphylococcus aureus* intradermal infection in mice. *Lasers Med Sci* 32(6):1337-1342

Anonymous. (2013) Antibiotic resistance threats in the United States, Centers for Disease Control and Prevention. 2013; <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>

Bastos MC, Ceotto H, Coelho ML, Nascimento JS. (2009) Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr Pharm Biotechnol* 10(1):38-61

Bastos MD, Coutinho BG, Coelho ML. (2010) Lysostaphin: a staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals* 3(4):1139-1161

- Bera A, Herbert S, Jakob A, Vollmer W, Gotz F. (2005) Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 55:778–787
- Bera A, Biswas R, Herbert S, Götz F. (2006) The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. *Infect Immun* 74:4598–4604
- Bera A, Biswas R, Herbert S, Kulauzovic E, Weidenmaier C, Peschel A, Götz F. (2007) Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 189:280–283
- Betts JW, Abdul Momin HF, Phee LM, Wareham DW. (2018) Comparative activity of tedizolid and glycopeptide combination therapies for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections: an in vitro and in vivo evaluation against strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Med Microbiol* 67(2):265-271
- Brudzynski K, Abubaker K, St-Martin L, Castle A. (2011) Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Front Microbiol* 2:213. doi: 10.3389/fmicb.2011.00213. eCollection 2011.
- Brudzynski K, Abubaker K, Miotto D. (2012a) Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chem* 133(2):329-36. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.01.035.
- Brudzynski K, Abubaker K, Wang T. (2012b) Powerful bacterial killing by buckwheat honeys is concentration-dependent, involves complete DNA degradation and requires hydrogen peroxide. *Front Microbiol* 3:242. doi: 10.3389/fmicb.2012.00242. eCollection 2012.
- Brudzynski K, Lannigan R. (2012) Mechanism of honey bacteriostatic action against MRSA and VRE involves hydroxyl radicals generated from honey's hydrogen peroxide. *Front Microbiol* 3:36. doi: 10.3389/fmicb.2012.00036. eCollection 2012.
- Cavadini C, Hertel C, Hammes WP. (1996) Stable expression of the lysostaphin gene meat *Lactobacilli* by introducing deletions within the prosequence. *Syst Appl Microbiol* 19:21–27
- Cavadini C, Hertel C, Hammes WP. (1998) Application of lysostaphin-producing lactobacilli to control staphylococcal food poisoning in meat products. *J Food Prot* 61:419–424
- Chang BC, Wang SJ. (2017) The newly filed patent applications for vaccines against *Staphylococcus aureus*. *Hum Vaccin Immunother* 13(11):2637-2638
- Climo MW, Patron RL, Goldstein BP, Archer GL. (1998) Lysostaphin treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* aortic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1355–1360
- Ceotto-Vigoder H, Marques SL, Santos IN, Alves MD, Barrias ES, Potter A, Alviano DS, Bastos MC. (2016) Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *J Appl Microbiol* 121(1):101-114

- Cui F, Li G, Huang J, Zhang J, Lu M, Lu W, Huang Q. (2010) Extension of nasal anti-*Staphylococcus aureus* efficacy of lysostaphin by its incorporation into a chitosan-o/w cream. *Drug Deliv* 17:617–623
- Dajcs JJ, Hume EBH, Moreau JM, Caballero AR, Cannon BM, O'Callaghan RJ. (2000) Lysostaphin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1432–1437
- Dajcs JJ, Thibodeaux BA, Girgis DO, Shaffer MD, Delvisco SM, O'Callaghan RJ. (2002) Immunity to lysostaphin and its therapeutic value for ocular MRSA infections in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(12):3712-3716
- Ehlert K, Tschierske M, Mori C, Schröder W, Berger-Bächi B. (2000) Site-specific serine incorporation by Lif and Epr into positions 3 and 5 of the staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge. *J Bacteriol* 182:2635–2638
- Fu XJ, Fang Y, Yao M. (2013) Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Biomed Res Int* 2013:159157
- Gorczyca G, Tylingo R, Szweda P, Augustin E, Sadowska M, Milewski S. (2014) Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan-collagen-gelatin scaffolds using chitosan-CO₂ solution. *Carbohydr Polym* 15:102:901-11. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.10.060.
- Haghighat S, Siadat SD, Sorkhabadi SMR, Sepahi AA, Mahdavi M. (2017) A novel recombinant vaccine candidate comprising PBP2a and autolysin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* confers protection in the experimental mice. *Mol Immunol* 91:1-7
- Iversen O, Grov A. (1973) Studies on lysostaphin. Separation and characterization of three enzymes. *Eur J Biochem* 38:293–300
- Jakubczak A, Szweda P, Kur J, Kleczkowski M, Frankowska A. (2010) Possibilities of application of recombined lysostaphin as an alternative agent in the therapy of *Staphylococcus aureus* mastitis. *Adv Agric Sci* 13(1):115-120
- Kerr DE, Plaut K, Bramley AJ, Williamson CM, Lax AJ, Moore K, Wells KD, Wall RJ. (2001) Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. *Nat Biotech* 19:66–70
- Kiri N, Archer G, Climo MW. (2002) Combination of lysostaphin with beta-lactams are synergistic against oxacyllin resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2017–2020
- Kock R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijne JE, Harbarth S, Kluytmans JAJW, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill* 15:1–9
- Kokai-Kun JF, Walsh SM, Canturiya T, Mond JJ. (2003) Lysostaphin cream eradicates *Staphylococcus aureus* nasal colonization in a cotton rat model. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1589–1597

Kokai-Kun JF, Chanturiya T, Mond JJ. (2009) Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. *J Antimicrob Chemother* 64:94–100

Kołtowski Z. (2006) Wielki atlas roślin miododajnych. Przedsiębiorstwo Wydawnicze Rzeczpospolita S.A.

Kurek A, Grudniak AM, Kraczkiewicz-Dowjat A, Wolska KI. (2011) New antibacterial therapeutics and strategies. *Pol J Microbiol* 60(1):3-12

Kurlenda J, Grinholc M. (2012) Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. *Acta Biochim Polon* 59(2):171-184

Leijtens B, Elbers JBW, Sturm PD, Kullberg BJ, Schreurs BW. (2017) Clindamycin-rifampin combination therapy for staphylococcal periprosthetic joint infections: a retrospective observational study. *BMC Infect Dis* 17(1):321

Lowy FD. (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111:1265–1273

Manner S, Goeres DM, Skogman M, Vuorela P, Fallarero A. (2017) Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by antibiotics in 96-microtiter well plates and drip flow reactors: critical factors influencing outcomes. *Sci Rep* 7:43854.

Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, Kuroda M, Ujihara T, Shuin T, Shen Y, Jin Z, Fujimoto S, Nasimuzzaman MD, Wakiguchi H, Sugihara S, Sugiura T, Koda S, Muraoka A, Imai S. (2003) Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *J Infect Dis* 187(4):613-624

McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. (2017) Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med* 90(2):269-281

Melchior MB, Fink-Gremmels JG. (2006) Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53(7):326-332

Miao J, Pangule RC, Paskaleva EE, Hwang EE, Kane RS, Linhardt RJ, Dordick JS. (2011) Lysostaphin–functionalized cellulose fibers with antistaphylococcal activity for wound healing applications. *Biomaterials* 32:9557–9567

Nascimento JS, Ceotto H, Nascimento SB, Giambiagi-Demarval M, Santos KR, Bastos MC. (2006) Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Lett Appl Microbiol* 42(3):215-221

Oldham ER, Daley MJ (1991) Lysostaphin: use of recombinant bactericidal enzyme as a mastitis therapeutic. *J Dairy Sci* 74:4175–4182

Raport ECDC (2017) - European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC

Raport GUS (2017) - Wyniki produkcji roślinnej w 2016 r.

Robinson JM, Hardman JK, Sloan GL. (1979) Relationship between lysostaphin endopeptidase production and cell wall composition in *Staphylococcus staphylolyticus*. *J Bacteriol* 137:1158–1164

Schindler CA, Schuhardt VT. (1964) Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 51:414–421

Schindler CA, Schuhardt VT. (1965) Purification and properties of lysostaphin - a lytic agent for *Staphylococcus aureus*. *Biochim Biophys Acta* 97:242–250

Schleifer KH, Kandler O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 36:407–477

Sjolund M, Kahlmeter G. (2008) *Staphylococci* in primary skin and soft tissue infections in a Swedish county. *Scand J Infect Dis* 40:894–898

Sloan GL, Robinson JM, Kloos WE. (1982) Identification of ‘*Staphylococcus staphylolyticus*’ as a biovar of *Staphylococcus simulans*. *Int J Syst Bacteriol* 32:170–174

Stefani S, Goglio A. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *Int J Infect Dis Suppl* 4:S19–22.

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. (2001) Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45(3):649-659

Szweda P (2017). Antimicrobial activity of honey. Honey analysis, Vagner Arnaut De Toledo (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/67117.

Szweda P, Kot B (2017). Bee products and essential oils as alternative agents for treatment of infections caused by *S. aureus*, *Frontiers in Staphylococcus aureus*, Shymaa Enany (Ed.), InTech

Szweda P, Kotlowski R, Kur J. (2005) New effective sources of the *Staphylococcus simulans* lysostaphin. *J Biotechnol* 117:203–213

Szweda P, Pladzyk R, Kotlowski R, Kur J. (2001) Cloning, expression, and purification of the *Staphylococcus simulans* lysostaphin using the intein-chitin-binding domain (CBD) system. *Protein Expr Purif* 22(3):467–471

Thumm G, Gotz F. (1997) Studies on polysostaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Mol Microbiol* 23:1251–1265

Varella Coelho ML, Santos Nascimento JD, Fagundes PC, Madureira DJ, Oliveira SS, Vasconcelos de Paiva Brito MA, Freire Bastos Mdo C. (2007) Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. *Res Microbiol* 158(7):625–630

Verbree CT, Dätwyler SM, Meile S, Eichenseher F, Donovan DM, Loessner MJ, Schmelcher M. (2017) Identification of peptidoglycan hydrolase constructs with synergistic staphylolytic activity in cow's milk. *Appl Environ Microbiol* 83(7). pii: e03445-16

Walencka E, Sadowska B, Rozalska S, Hryniewicz W, Rozalska B. (2005) Lysostaphin as a potential therapeutic agent for staphylococcal biofilm eradication. *Pol J Microbiol* 54:191–200

Walencka E, Sadowska B, Rozalska S, Hryniewicz W, Rozalska B. (2006) *Staphylococcus aureus* biofilm as a target for single or repeated doses of oxacillin, vancomycin, linezolid and/or lysostaphin. *Folia Microbiol (Praha)* 51:381–386

Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW. (2005) Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol* 23:445–451

Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, Kokai-Kun JF. (2003) Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3407–3414

Wu H, Moser C, Wang HZ, Høiby N, Song ZJ. (2015) Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci* 7(1):1–7.

5. Inne osiągnięcia badawcze

Poniżej przedstawiono krótki opis oraz spis publikacji pozostałych moich osiągnięć badawczych, które nie są bezpośrednio związane z tematyką osiągnięcia habilitacyjnego.

5.1. Otrzymywanie rekombinantowej hirudyny oraz stafylokinazy

W początkowym okresie moje zainteresowania naukowe koncentrowały się na wykorzystaniu technik biologii molekularnej do otrzymywania białek/peptydów o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym. Oprócz otrzymywania lizostafiny brałem udział w opracowaniu układów ekspresyjnych umożliwiających wydajną produkcję hirudyny [B-1] oraz stafylokinazy [B-2]. Obydwie substancje potencjalnie mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii zaburzeń procesu krzepnięcia krwi.

[B-1] Kochanowski R, Kotłowski R, Szveda P. (2006) Novel method of expression and purification of hirudin based on pBAD TOPO, pTYB12 vectors and gene synthesis. *Protein Expression and Purification* 50(1):25-30.

IF₂₀₀₆ = 1,867/7/8; LPK (MNiSzW 2006) – 15

[B-2] Kochanowski R, Kotłowski R, **Szweda P.** (2007) Expression and intein-mediated purification of novel staphylokinase SakSTAR with reduced immunogenicity and antiplatelet and antithrombin activation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 141(2-3):321-33.

IF₂₀₀₇ = 1,643/3/3; LPK (MNiSzW 2007) – 20

5.2. Wykorzystywanie technik genotypowych do różnicowania i badania potencjału wirulencji mikroorganizmów patogennych

Kolejnym obszarem moich zainteresowań naukowych jest wykorzystanie technik biologii molekularnej do identyfikacji, różnicowania oraz określania potencjału wirulencji patogennych drobnoustrojów. We współpracy z dr Katarzyną Wolską z Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach wykazałem przydatność metod ERIC oraz BOX PCR w badaniach zmienności genetycznej izolatów klinicznych oraz odzwierzęcych bakterii *P. aeruginosa* [B-5], [B-10]. Wykazaliśmy także znaczny potencjał wirulencji izolatów bakterii tego gatunku pochodzących od pacjentów szpitala w Siedlcach [B-6]. Efektem współpracy z dr Wolską jest także opracowanie przeglądu dotyczące metod genotypowania drobnoustrojów, które ukazało się w postaci rozdziału w książce pt. „Genetic Diversity in Microorganisms”, wydawnictwa InTech [B-8]. W badaniach przeprowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii, we współpracy z prof. Katarzyną Dzierżanowską-Fangrat i dr Ewą Romanowską z Centrum Zdrowia Dziecka oraz dr Łukaszem Naumiukiem z Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku wykazaliśmy przydatność metody RAPD-PCR do typowania molekularnego izolatów klinicznych *C. glabrata* [B-9].

Polimorfizm sekwencji genów kodujących koagulazę oraz białko A wykorzystano w pracy, której celem było różnicowanie odzwierzęcych izolatów *S. aureus* [B-4]. Z kolei w pracy opublikowanej wraz z pracownikami Uniwersytetu Gdańskiego, dr hab. Julianną Kurlendą oraz dr hab. Mariuszem Grinholcem wykazaliśmy brak jednoznacznych korelacji pomiędzy polimorfizmem sekwencji fragmentu X genu kodującego białko A, a wirulencją klinicznych izolatów MRSA i MSSA [B-7]. Jestem także współautorem pracy, w której polimorfizm sekwencji genów kodujących białka o wspólnej nazwie SPATE (*Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae*) zaproponowano jako cel molekularny przydatny do genotypowania klinicznych izolatów bakterii *E. coli* [B-3].

[B-3] Ziomek M, **Szweda P**, Kurlenda J, Kochanowski R, Sikorska-Wiśniewska G. (2007) The presence and polymorphism of genes encoding serine protease autotransporters (spate)

among the *Escherichia coli* isolated in the region of Gdansk from children with diarrhea. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia* 59(4):343-50. (po polsku)

IF₂₀₀₇ = 0,0/0/0; LPK (MNiSzW 2007) – 6

[B-4] Jakubczak A, Szweda P, Łukaszewska K, Kur J. (2007) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in the east of Poland on the basis of polymorphism of genes coding protein A and coagulase. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 10(4):199-205.

IF₂₀₀₇ = 0,291/7/6; LPK (MNiSzW 2007) – 20

[B-5] Wolska K, Szweda P. (2008) A comparative evaluation of PCR ribotyping and ERIC PCR for determining the diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Polish Journal of Microbiology* 57(2):157-63.

IF₂₀₀₈ = 0,0/20/21; LPK (MNiSzW 2008) – 10

[B-6] Wolska K, Szweda P. (2009) Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Polish Journal of Microbiology* 58(3):255-60.

IF₂₀₀₉ = 0,0/15/23; LPK (MNiSzW 2009) – 6

[B-7] Kurlenda J, Grinholc M, Szweda P. (2010) Lack of correlation between X region spa polymorphism and virulence of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Acta Biochimica Polonica* 57(1):135-8;

IF₂₀₁₀ = 1,234/4/3; LPK (MNiSzW 2010) – 20

[B-8] Wolska K, Szweda P. (2012) Genotyping Techniques for Determining the Diversity of Microorganisms, Genetic Diversity in Microorganisms, Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0064-5, InTech, doi: 10.5772/35101.

IF₂₀₁₂ = 0,0/9/0; LPK (MNiSzW 2012) – 0. Rozdział w książce indeksowany w bazie ISI, liczba cytowań - 9

[B-9] Szweda P, Gucwa K, Naumiuk L, Romanowska E, Dzierzanowska-Fangrat K. (2013) Evaluation of possibilities of genotyping of *Candida glabrata* clinical isolates with RAPD-PCR method and microsatellite analysis. *Scientific Journal of Microbiology* 2:194-200. doi: 10.14196/sjm.v2i10.1052.

IF₂₀₁₃ = 0,0/0/0; LPK (MNiSzW 2013) – 0

[B-10] Wolska K, Szweda P, Lada K, Rytel E, Gucwa K, Kot B, Piechota M. (2014) Motility activity, slime production, biofilm formation and genetic typing by ERIC-PCR for *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from bovine and other sources (human and environment). *Polish Journal of Veterinary Sciences* 17(2):321-9.

IF₂₀₁₄ = 0,604/1/1; LPK (MNiSzW 2014) – 20

5.3. Otrzymywanie materiałów biopolimerowych o potencjalnym zastosowaniu jako materiały opatrunkowe.

Jednym z najbardziej perspektywicznych kierunków wykorzystania badanych przeze mnie i współpracowników nieantybiotykowych produktów naturalnych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych jest ich stosowanie do eliminacji patogenów z zainfekowanych ran. Zespół pracowników Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, którego byłem członkiem, opracował materiały biopolimerowe chitozanowo-białkowe o strukturze gąbek [B-11], [B-12], [B-13]. Polimery te potencjalnie mogą być wykorzystywane jako materiały opatrunkowe. W dalszej części badań wykazaliśmy możliwość wprowadzenia do struktury tych materiałów lizostafiny. Wyniki tej części badań stanowią fragment osiągnięcia naukowego i zostały opisane we wcześniejszej części powyższego opracowania (4.2.3.).

[B-11] Gorczyca G, Tylingo R, **Szweda P**, Augustin E, Sadowska M, Milewski S. (2014) Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan-collagen-gelatin scaffolds using chitosan-CO₂ solution. *Carbohydrate Polymers* 15:102:901-11. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.10.060.

IF₂₀₁₄ = 4,074/31/37; LPK (MNiSzW 2014) – 40

[B-12] Tylingo R, Gorczyca G, Mania S, **Szweda P**, Milewski S. (2016) Preparation and characterization of porous scaffolds from chitosan-collagen-gelatin composite. *Reactive & Functional Polymers* 103:131-140. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2016.04.008.

IF₂₀₁₆ = 3,151/6/6; LPK (MNiSzW 2016) – 35

[B-13] Gorczyca G, **Szweda P**, Tylingo R, Sadowska M, Milewski S, Zalewska M. Sposób przygotowania roztworu chitozanu, kompozycja i sposób wytwarzania hydrożelowej membrany chitozanowej. Patent nr B1 222739.

5.4. Badanie lekooporności i alternatywnych metod zwalczania drożdży z rodzaju *Candida*.

W latach 2011-2014 byłem kierownikiem projektu grantowego: „Mechanizmy oporności na leki z grupy azoli wśród krajowych; klinicznych izolatów drożdży z rodzaju *Candida*”. W wyniku przeprowadzonych badań wykazaliśmy, że podstawowym mechanizmem molekularnym oporności izolatów *C. glabrata* na leki z grupy azoli jest nadprodukcja genów kodujących transportery wielolekowe [B-16]. Stwierdziliśmy ponadto, że dostępny komercyjnie test Integral System Yeast Plus (ISYP) dedykowany do badania lekooporności drożdży nie spełnia oczekiwań [B-14]. Wykazaliśmy także obiecującą aktywność przeciwgrzybową wybranych nieantybiotykowych czynników: olejków eterycznych, ekstraktów etanolowych propolisu oraz nanocząstek srebra [B-15], [B-17].

Jednym z wiodących kierunków badawczych prowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii jest poszukiwanie nowych, potencjalnych leków przeciwgrzybowych. Uczestniczyłem w badaniach aktywności przeciwgrzybowej pochodnych sulfonowych 6-deoxy-D-glukoaminy [B-18] oraz oligopeptydów zawierających w swojej strukturze kwas N³-(4-metoksyfumarilo)-S-2,3-diaminopropanowy (FMDP) [B-19]. Mechanizm molekularny oraz możliwości poprawy transportu oligopeptydów wykazujących działanie przeciwdrobnoustrojowe do komórek drożdży były przedmiotem badań prowadzonych, w ramach studium doktoranckiego przez dr inż. Martę Schielmann. Pełniłem funkcję promotora pomocniczego w Jej przewodzie. Wyniki uzyskanych badań zostały przedstawione w ramach publikacji w czasopiśmie *Frontiers in Microbiology* [B-19].

[B-14] Szweda P, Gucwa K, Naumiuk L, Romanowska E, Dzierzanowska-Fangrat K, Brillowska-Dabrowska A, Wojciechowska-Koszko I, Milewski S. (2014) Evaluation of possibilities in identification and susceptibility testing for *Candida glabrata* clinical isolates with the Integral System Yeast Plus (ISYP). *Acta Microbiologica at Immunologica Hungarica* 61(2):161-72. doi: 10.1556/AMicr.61.2014.2.6;

IF₂₀₁₄ = 0,778/1/1; LPK (MNiSzW 2014) – 15

[B-15] Szweda P, Gucwa K, Kurzyk E, Romanowska E, Dzierzanowska-Fangrat K, Zielińska Jurek A, Kuś PM, Milewski S. (2015) Essential Oils, Silver Nanoparticles and Propolis as Alternative Agents Against Fluconazole Resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* Clinical Isolates. *Indian Journal of Microbiology* 55(2):175-83. doi: 10.1007/s12088-014-0508-2.

IF₂₀₁₅ = 1,143/11/17; LPK (MNiSzW 2015) – 15

[B-16] Szweda P, Gucwa K, Romanowska E, Dzierzanowska-Fangrat K, Naumiuk Ł, Brillowska-Dabrowska A, Wojciechowska-Koszko I, Milewski S. (2015) Mechanisms of azole resistance among clinical isolates of *Candida glabrata* in Poland. *Journal of Medical Microbiology* 64(6):610-9. doi: 10.1099/jmm.0.000062.

IF₂₀₁₅ = 2,269/2/4; LPK (MNiSzW 2015) – 25

[B-17] Zielinska-Jurek A, Wei Z, Wysocka I, **Szweda P**, Kowalska E (2015) The effect of nanoparticles size on photocatalytic and antimicrobial properties of Ag-Pt/TiO₂ photocatalysts. *Applied Surface Science* 353:317-325;

IF₂₀₁₅ = 3,15/26/29; LPK (MNiSzW 2015) – 35

[B-18] Skarbek K, Gabriel I, **Szweda P**, Wojciechowski M, Khan MA, Görke B, Milewski S, Milewska MJ. (2017) Synthesis and antimicrobial activity of 6-sulfo-6-deoxy-D-glucosamine

and its derivatives. *Carbohydrate Research* 448:79-87. doi: 10.1016/j.carres.2017.06.002.

IF₂₀₁₆ = 2,096/0/0; LPK (MNiSzW 2016) – 25

[B-19] Schielmann M, Szweda P, Gucwa K, Kawczyński M, Milewska MJ, Martynow D, Morschhäuser J, Milewski S. (2017) Transport Deficiency Is the Molecular Basis of *Candida albicans* Resistance to Antifungal Oligopeptides. *Frontiers in Microbiology* 7(8):2154. doi: 10.3389/fmicb.2017.02154. eCollection 2017.

IF₂₀₁₆ = 4,076/0/0; LPK (MNiSzW 2016) – 35

5.5. *Badania nieantybiotykowych czynników przeciwgronkowcowych – prace nieuwzględnione bezpośrednio w osiągnięciu będącym podstawą wniosku habilitacyjnego*

We współpracy z prof. A. Jakubczakiem (PWSIP Łomża) przeprowadzono wstępne próby *in vivo* dotyczące możliwości stosowania otrzymywanych w naszym zespole preparatów rekombinantowej lizostafiny w terapii gronkowcowego zapalenia gruczołu mlekowego u krów. Jak już wspomniano we wcześniejszej części opracowania, uzyskano obiecujące wyniki [B-20], jednak z powodu śmierci prof. Jakubczaka badania nie były kontynuowane.

W „erze przed-antybiotykowej” stosowanie produktów naturalnych, w tym ziół, olejków eterycznych, propolisu oraz miodu należało do najważniejszych i najczęściej stosowanych metod zwalczania chorób infekcyjnych. Analizę aktualnego piśmiennictwa dotyczącego aktywności przeciwgronkowcowej olejków eterycznych przedstawiono w opracowaniu przeglądowym [B-21]. Wraz z współpracownikami przeprowadziłem także badania potencjału przeciwgronkowcowego 36 olejków eterycznych pozyskiwanych z różnych źródeł botanicznych. Szczególnie wysoką skuteczność działania (MIC w zakresie od 0,01 do 0,313% (v/v)) stwierdzono w przypadku olejku paczulowego. Nieco niższą skuteczność (MIC w zakresie 0,01 - 0,625% (v/v)) zaobserwowano w przypadku olejków: cedrowego, tymiankowego oraz manuka. Olejki pozyskiwane z *Cinnamomum cassia* i *Pelargonium graveolens* wykazywały niższe aktywności względem badanych izolatów. Wartości MIC dla tych produktów mieściły się odpowiednio w zakresach: 0,02 - 1,25% (v/v) oraz 0,078 - 1,25% (v/v). Wyniki badań przedstawiono w pracy opublikowanej w czasopiśmie *Acta Veterinaria Beograd* [B-22].

W tej części zestawienia dorobku umieściłem także opracowanie przeglądowe dotyczące aktywności przeciwbakteryjnej miodów [B-23], które opublikowano w postaci rozdziału w książce wydawnictwa InTech oraz pracę dotyczącą aktywności przeciwbakteryjnej miodów suplementowanych przyprawami – cynamonem, kardamonem

oraz imbirem [B-24]. Dodatek przypraw nie wpłynął pozytywnie na aktywność przeciwdrobnoustrojową produktów. W przypadku dodatku cynamonu nastąpiło wyraźne obniżenie skuteczności działania. W mojej ocenie, do celów medycznych, na przykład jako składnik materiałów opatrunkowych, powinny być stosowane wyłącznie miody naturalne, niesuplementowane, o potwierdzonej, wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

[B-20] Jakubczak A, Szweda P, Kur J, Kleczkowski M, Frankowska A. (2010) Possibilities of application of recombined lysostaphin as an alternative agent in the therapy of *Staphylococcus aureus* mastitis. *Advances in Agricultural Science* 13(1):115-120,

IF₂₀₁₀ = 0/0/0; LPK (MNiSzW 2010) – 0

[B-21] Szweda P, Kot B (2017). Bee products and essential oils as alternative agents for treatment of infections caused by *S. aureus*, *Frontiers in Staphylococcus aureus*, Shymaa Enany (Ed.), InTech, doi: 10.5772/65978.

IF₂₀₁₆ = 0/1/0; LPK (MNiSzW 2016) – 0. Rozdział w książce wydawnictwa InTech

[B-22] Szweda P, Zalewska M, Pilch J, Kot B, Milewski S. (2018) Essential oils as potential antistaphylococcal agents. *Acta Veterinaria Beograd* 68 (1), 95-107. doi: 10.2478/acve-2018-0008

IF₂₀₁₆ = 0/0/0; LPK (MNiSzW 2016) – 15

[B-23] Szweda P (2017). Antimicrobial activity of honey, *Honey analysis*, Vagner Arnaut De Toledo (Ed.), InTech, doi: 10.5772/67117.

IF₂₀₁₆ = 0/0/0; LPK (MNiSzW 2016) – 0. Rozdział w książce wydawnictwa InTech

[B-24] Wilczyńska A, Newerli-Guz J, Szweda P. (2017) Influence of the addition of selected spices on sensory quality and biological activity of honey. *Journal of Food Quality UNSP* 6963904. doi: 10.1155/2017/6963904.

IF₂₀₁₆ = 0,968/0/1; LPK (MNiSzW 2016) – 20

6. Plany badawcze

Moja działalność badawcza w najbliższym okresie dotyczyć będzie następujących obszarów:

- Kontynuacja badań z zakresu przeciwdrobnoustrojowej aktywności produktów naturalnych, głównie pochodzenia pszczelego i roślinnego. Aktualnie jestem kierownikiem projektu grantowego w ramach programu SONATA BIS dotyczącego tej tematyki. Badania dotyczące aktywności miodów są już bardzo zaawansowane, wyniki zostały częściowo opublikowane w czasopiśmie *Molecules*. Obiecujące są wyniki wstępnych badań dotyczących aktywności ekstraktów etanolowych propolisu. Planujemy także określenie potencjału przeciwbakteryjnego mniej popularnych produktów pszczelich: pyłku, pierzgi

oraz mlecza pszczelego. Badania w zakresie tej tematyki prowadzę we współpracy z dr Piotrem Kusiem z Katedry i Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz prof. Randy Worobo z Uniwersytetu Cornell w USA.

- Kolejnym aspektem badań, które prowadzone są w ramach projektu grantowego, jest izolacja z miodów i produktów pszczelich (głównie pierzgi) szczepów bakteryjnych zdolnych do produkcji bakteriocyn o aktywności przeciwgronkowcowej. Plan badań obejmuje także: 1) opracowanie procedur oczyszczania peptydów wykazujących najwyższą aktywność przeciwbakteryjną; 2) analizę występowania potencjalnych efektów synergicznych pomiędzy bakteriocynami i antybiotykami; 3) określenie aktywności nowo zidentyfikowanych peptydów w stosunku do gronkowców rosnących w formie biofilmu; 4) ustalenie sekwencji genów kodujących bakteriocyny o najbardziej obiecujących właściwościach; 5) charakterystykę fizykochemiczną aktywnych peptydów, łącznie z próbami ustalenia ich struktury przestrzennej. Istotną rolę w badaniach odgrywa współpraca z zespołem prof. Randy Worobo z Uniwersytetu Cornell.
- Drugim z moich wiodących tematów jest badanie lekooporności drożdżaków z rodzaju *Candida* spp. oraz poszukiwanie alternatywnych metod walki tymi patogenami. W zakresie tej tematyki opublikowałem kilka prac. Aktualnie do recenzji w czasopismach z zakresu mykologii wysłano dwa manuskrypty publikacji dotyczące aktywności przeciwgrzybowej etanolowych ekstraktów propolisu oraz olejków eterycznych. Jestem autorem korespondencyjnym obydwu tych prac. Podobnie, jak w przypadku aktywności przeciwgronkowcowej, głównym celem prowadzonych aktualnie badań jest identyfikacja i izolacja składników aktywnych propolisu. W ramach tej tematyki nawiązano współpracę z zespołem prof. Patricka van Dijck z Uniwersytetu Katolickiego w Leuven (Belgia).
- Optymalizacja warunków produkcji antybiotyków polienowych, głównie kandycydyny w hodowlach wybranych szczepów *Streptomyces* spp. Aktualnie w Katedrze Technologii Leków i Biochemii realizowany jest grant badawczy NCN w programie OPUS: „Pochodne aromatycznych makrolidów polienowych o polepszonej selektywnej toksyczności”, kierownikiem projektu jest prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski.

7. Zestawienie osiągnięć naukowych

7.1. Dorobek publikacyjny po uzyskaniu stopnia doktora

Rodzaj osiągnięcia	Liczba
Publikacje w czasopismach indeksowanych w Web of Science*	28
Rozdziały w książkach indeksowanych w Web of Science	1
Publikacje w czasopismach nieindeksowanych w Web of Science	3
Rozdziały w książkach nieindeksowanych w Web of Science (wszystkie w języku angielskim)	2
Patenty	2

*Cztery kolejne prace zaakceptowano do druku w roku 2018

7.2. Dane bibliometryczne

- Sumaryczny IF prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego – 17,175
- Sumaryczna wartość współczynnika IF wszystkich prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora – 44,519
- Sumaryczna liczba punktów MNiSzW prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego – 260
- Sumaryczna liczba punktów MNiSzW wszystkich prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora – 631
- Cytowania prac

	Web of Science	Scopus
Ogólna liczba cytowań	281	319
Liczba cytowań bez autocytowań	254	278
H- index	11	11

Pich Szuda