



*Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
i Parazytologii
Uniwersytet Medyczny
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. Borowska 211a, 50 - 556 Wrocław*

Autoreferat

Przedstawiający opis osiągnięcia naukowego:

Nowe metody diagnostyki i zwalczania biofilmów w przewlekłych zakażeniach ran i kości

Adam Feliks Junka

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wrocław, 2018

Spis treści:

| | |
|---|----|
| 1. Imię i nazwisko habilitanta..... | 3 |
| 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe habilitanta..... | 3 |
| 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu habilitanta w jednostkach naukowych..... | 3 |
| 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym (Dz. U. nr. 65, poz. 595 ze zm.)..... | 4 |
| 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego..... | 4 |
| 4.2. Autorzy i tytuły publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego..... | 4 |
| 4.3. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania..... | 7 |
| 4.4. Podsumowanie do części 4 Autoreferatu..... | 34 |
| 5. Piśmiennictwo do części 4 Autoreferatu..... | 35 |
| 6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych..... | 37 |
| 6. 1. Analiza dorobku naukowego niewchodzącego w skład osiągnięcia..... | 37 |
| 6.2. Kierunki badań naukowych w dotychczasowej działalności naukowej niewchodzące w skład osiągnięcia..... | 38 |
| 6.2.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora..... | 39 |
| 6.2.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora..... | 42 |
| 7. Podsumowanie zbiorcze autoreferatu..... | 46 |
| 8. Zestawienie dorobku naukowego habilitanta..... | 47 |
| 9. Piśmiennictwo do części 6 Autoreferatu..... | 48 |

1. Imię i nazwisko habilitanta:

Adam Feliks Junka

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe habilitanta:

2006 - Tytuł zawodowy **magistra biotechnologii**, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Akademia Medyczna w Gdańsku – Uniwersytet Gdański - Politechnika Gdańska, 2006 r.

2014 - Stopień **doktora nauk medycznych**, specjalność mikrobiologia medyczna uzyskany na podstawie rozprawy: „Wpływ erytromycyny na biofilm *Klebsiella pneumoniae*” przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyny Gościński w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Rozprawa została wyróżniona przez Radę Naukową Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (12.03. 2015).

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu habilitanta w jednostkach naukowych:

2008-2014: *starszy referent inżynierjno-techniczny* w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

2014-2015: *asystent* w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

2015-obecnie: *adiunkt* w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

2017 – obecnie: *kierownik* Laboratorium Mikrobiologii Polskiego Ośrodka Rozwoju Technologii PORT (dawniej EIT+) we Wrocławiu

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
FARMACEUTYCZNEJ I PARAZYTOLOGII
adiunkt

dr n. med. Adam Junka

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym (Dz. U. nr. 65, poz. 595 ze zm.):

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Nowe metody diagnostyki i zwalczania biofilmów w przewlekłych zakażeniach ran i kości”

Podstawę habilitacji stanowi cykl sześciu powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w latach **2015-2018** o sumarycznym **IF** (Impact Factor według Journal Citation Reports JCR) wynoszącym **19,304** oraz liczbie punktów **MNiSW** wynoszącej **200**.

4.2. Autorzy i tytuły publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

[H-1] Junka AF, Wojtowicz W, Ząbek Z, Krasowski G, Smutnicka D, Bakalorz B, Boruta B, Dziadas M, Młynarz P, Sedghizadeh P, Bartoszewicz M: *Metabolic profiles of exudates from chronic leg ulcerations* **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 2017 Vol.137; s.13-22 (IF: **2,831**; MNiSW: **35 pkt.**)

Udział własny: koncepcja pracy, kierowanie zespołem badawczym, udział w wykonywaniu badań, opracowanie wyników, opracowanie manuskryptu, przygotowanie pracy do druku. Mój wkład własny szacuję na 60%.

[H-2] Junka AF, Żywicka A, Szymczyk P, Dziadas M, Bartoszewicz M, Fijałkowski K: *A.D.A.M. test (Antibiofilm Dressing's Activity Measurement) - simple method for evaluating anti-biofilm activity of drug-saturated dressings against wound pathogens.* **Journal of Microbiological Methods** 2017 Vol.143; s.6-12 (IF: **1.701**; MNiSW: **20 pkt.**)

Udział własny: koncepcja pracy i testu A.D.A.M., kierowanie zespołem badawczym, udział w wykonywaniu badań, opracowanie wyników, opracowanie manuskryptu, przygotowanie pracy do druku, kierowanie zespołem badawczym. Mój wkład własny szacuję na 75%.

[H-3] Junka AF, Rakoczy R, Szymczyk P, Bartoszewicz M, Sedghizadeh P, Fijałkowski K: *Application of rotating magnetic fields increase the activity of antimicrobials against wound biofilm pathogens* **Scientific Reports** 2018 Vol.8; art.167 (IF: **4.122**; MNiSW: **40 pkt.**)

Udział własny: koncepcja pracy, kierowanie zespołem badawczym, udział w wykonywaniu badań, opracowanie wyników, opracowanie manuskryptu, przygotowanie pracy do druku, kierowanie zespołem badawczym. Mój wkład własny szacuję na 75%.

[H-4] **Junka AF**, Szymczyk P, Smutnicka D, Kos M, Smolina I, Bartoszewicz M, Chlebus E, Turniak M, Sedghizadeh P.: *Microbial biofilms are able to destroy hydroxyapatite in the absence of host immunity in vitro* **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2015 Vol.73 no.3; s.451-46 (IF: **1.631**; MNiSW: **25** pkt.)

Udział własny: koncepcja pracy, kierowanie zespołem badawczym, udział w wykonywaniu badań, opracowanie wyników, opracowanie manuskryptu, przygotowanie pracy do druku, kierowanie zespołem badawczym. Mój wkład własny szacuję na 70%.

[H-5] **Junka AF**, Szymczyk P, Ziółkowski G, Karuga-Kuźniewska E, Smutnicka D, Bil-Lula I, Bartoszewicz M, Mahabady S, Sedghizadeh P: *Bad to the bone: on in vitro and ex vivo microbial biofilm ability to directly destroy colonized bone surfaces without participation of host immunity or osteoclastogenesis* **Public Library of Science One (PLOS One)** 2017 Vol.12 no.1; art.e0169565 (IF: **2.766**; MNiSW: **35** pkt.)

Udział własny: koncepcja pracy, kierowanie zespołem badawczym, udział w wykonywaniu badań, opracowanie wyników, opracowanie manuskryptu, przygotowanie pracy do druku. Mój wkład własny szacuję na 60%.

[H-6] Sedghizadeh P, Shuting S, **Junka AF**, Richard E, Sadreraf K, Mahabady S, Bakhshalian N, Tjokro N, Bartoszewicz M, Oleksy M, Szymczyk P, Lundy M, Neighbors J, Russell M, McKenna K, Ebetino FE: *Design, synthesis, and antimicrobial evaluation of a novel bone-targeting bisphosphonate-ciprofloxacin conjugate for the treatment of osteomyelitis biofilms* **Journal of Medicinal Chemistry** 2017 Vol.60 no.6; s.2326-234 (IF: **6.253**; MNiSW: **45** pkt.)

Udział własny: W pięciu z wyżej przytoczonych prac (**HI-H5**) jestem pierwszym autorem, natomiast w pracy [**H-6**] stworzonej przez multidyscyplinarny i wielośrodkowy zespół badawczy byłem odpowiedzialny za stworzenie i nadzorowanie pracy zespołu polskiego (w jego skład wchodził pracownicy Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz Politechniki Wrocławskiej), koncepcję analiz mikrobiologicznych (w tym opracowanie modelu badań pozwalających na ocenę oddziaływania nowych środków przeciwdrobnoustrojowych względem biofilmu stworzonego na hydroksyapatycie), przeprowadzenie analiz mikrobiologicznych, opracowanie wyników, analizę statystyczną,

opracowanie rycin, przygotowanie pracy do druku. Mój wkład własny w zakresie całej pracy szacuję na 20%, a w części analiz mikrobiologicznych na 90% (co potwierdzone jest przez koordynatora projektu prof. Sedghizadeha w oświadczeniu znajdującym się w Załączniku 5) Ze względu na fakt, że podstawę części mikrobiologicznej stanowi opracowany oraz przebadany przeze mnie, wcześniej nie wykazywany, model biofilmu tworzącego się na hydroksyapatycie, umieściłem pracę **H-6** wśród artykułów składających się na osiągnięcie naukowe. Wyniki badań opublikowanych w **H-6** mają istotny wpływ na rozwój nowych metod leczenia infekcji kości, a sama publikacja **H-6** została wyróżniona przez redakcję periodyku Journal of Medicinal Chemistry (drugie w kolejności rankingowej JCR czasopismo zajmujące się tematyką chemii medycynej) jako najistotniejsza praca numeru, co zostało zauważone także przez krajową prasę i media.

Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączono oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład każdego z nich w ich powstanie (Załącznik 5).

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
FARMACEUTYCZNEJ I PARAZYTOLOGII
Adiunkt

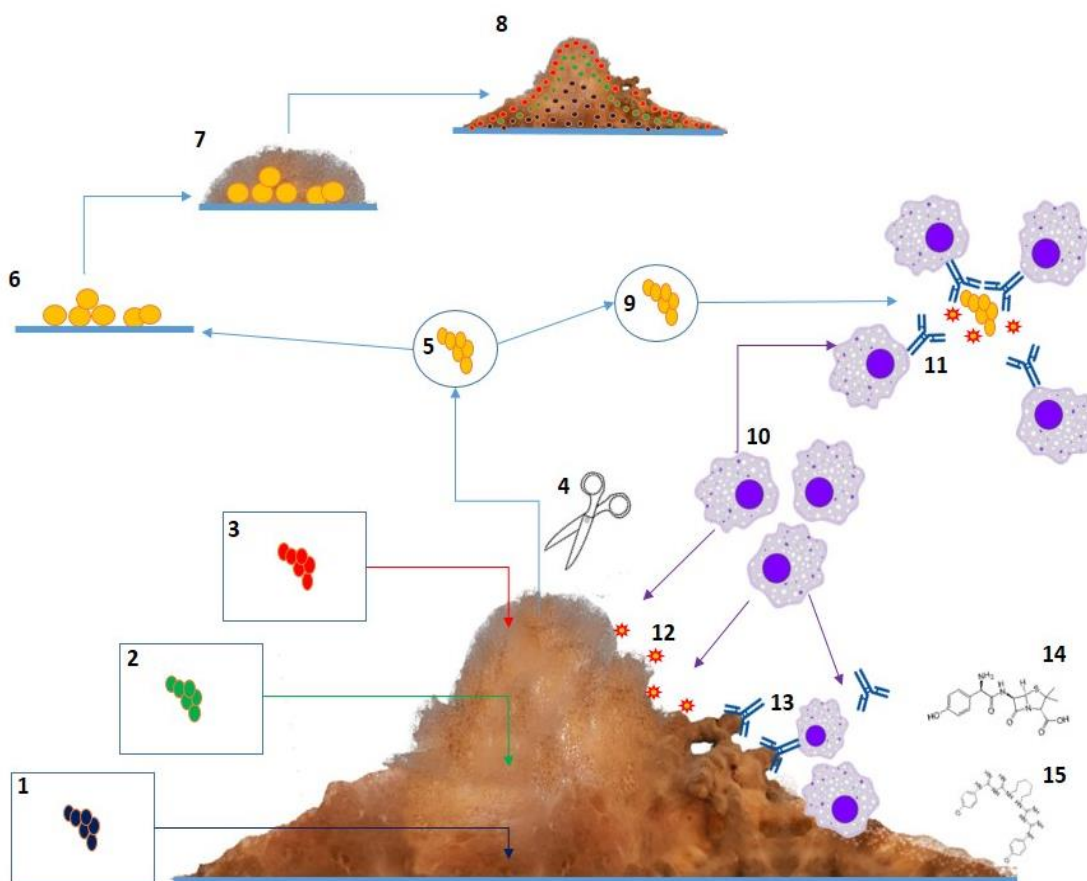
dr n. med. Adam Junka

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

4.3.1. Wprowadzenie

Odkrycie, że zdecydowana większość bakterii i grzybów występuje w formie wielokomórkowych agregatów, a nie jak uprzednio uważano, w postaci wolno pływających komórek, odmieniło oblicze współczesnej mikrobiologii medycznej. Wielokomórkowe społeczności drobnoustrojów, nazwano **biofilmem** (czyli „biologiczną warstwą”). Znaczna część istotnych z punktu widzenia medycyny biofilmów to osiadłe w tkankach lub na powierzchniach implantów struktury otoczone zewnątrzkomórkową, ochronną macierzą (ang. matrix). Przykładem są biofilmy w jelicie grubym, płucach, jamie ustnej, w ranach, kościach oraz biofilmy tworzące się na i wewnątrz cewników, śrubach ortopedycznych, sztucznych zastawkach czy protezach kostnych [1]. W odróżnieniu od komórek planktonicznych (niezadherowanych, wolno-pływających), komórki w biofilmie charakteryzują się wysokim zróżnicowaniem procesów metabolicznych. Jak wykazano w badaniach laboratoryjnych, drobnoustroje tworzące najniższą, podstawną, warstwę biofilmu, cechują się spowolnioną bądź zatrzymaną aktywnością metaboliczną. W warstwie tej obecne są także komórki martwe, wykorzystywane przez żywe drobnoustroje jako źródło substancji odżywczych oraz do budowy macierzy. Z kolei mikroorganizmy wyższych warstw biofilmu charakteryzują się wysokim poziomem aktywności metabolicznej oraz krótkim czasem podziału dzięki dostępowi do substancji odżywczych. Okresowo, w warstwie szczytowej biofilmu, dochodzi do rozluźnienia struktury macierzy i odrywania się agregatów komórkowych, które dryfując z prądem cieczy (np. krwi) zasiedlają oraz wywołują infekcje kolejnych obszarów ciała [Ryc.1].

Obecnie uważa się, że nawet 99% biomasy bakteryjnej występuje w formie biofilmów, a biofilmy odpowiedzialne są za 60-80% wszystkich zakażeń związanych z opieką zdrowotną (ang. HAI -healthcare associated infection) [2]



Ryc.1. Biofilm tworzony w patogenezie zakażeń. W centralnej części ryciny przedstawiony jest dojrzały, pokryty zewnątrzkomórkową macierzą, biofilm utworzony na schematycznie uwidocznionej powierzchni [błękitna linia]. W zależności od umiejscowienia w strukturze biofilmu, komórki drobnoustroju cechują się niską/wstrzymaną [1], umiarkowaną [2], wysoką [3] aktywnością metaboliczną. Okresowo, ze szczytowej warstwy biofilmu dochodzi do enzymatycznego rozcięcia [4] macierzy i uwolnienia się agregatów komórkowych [5], które dają początek nowemu biofilmowi tworzącemu się na skutek adhezji komórek do powierzchni [6] i syntezy macierzy [7]. Efektem tych procesów jest dojrzały, wielowarstwowy biofilm [8]. Uwolnione agregaty komórek [9], pozbawione ochronnej warstwy macierzy, są podatne na eradykację na skutek aktywności komórek efektorowych układu odpornościowego [10] – m.in. wydzielania opsonin [11] oraz reaktywnych form tlenu ROS [12]. Te same mechanizmy działania systemu immunologicznego [13] są nieskuteczne względem biofilmu. Na skutek obecności ochronnej macierzy oraz niskiej aktywności metabolicznej komórek warstw podstawnych biofilmu, aktywność środków przeciwdrobnoustrojowych – antybiotyków [14] oraz antyseptyków [15] ulega znacznemu osłabieniu. **Rycina własna.**

Biofilmy posiadają także zdolność do jednoczesnej (symultanicznej) odpowiedzi na bodźce określaną mianem systemu wyczuwania liczebności (ang. Quorum Sensing System, QS). Jest to złożony mechanizm pozwalający na koordynację aktywności miliardów komórek tworzących biofilm. Quorum Sensing reguluje każdy aspekt życia pojedynczego drobnoustrojów oraz całej ich społeczności, w tym przyleganie do powierzchni, wytwarzanie macierzy, odrywanie się agregatów komórkowych. Ponadto odgrywa istotną rolę w koordynacji procesu syntezy i sekrecji enzymów, między innymi toksyn/enzymów rozkładających poszczególne elementy tkanki gospodarza [3]. Wysokie zagęszczenie komórek w obrębie struktury biofilmu umożliwia także transfer genów zjadliwości oraz oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe.

Wyżej wzmiankowane cechy biofilmu sprawiają, że charakteryzuje się on niezwykle wysoką tolerancją na antybiotyki oraz antyseptyki. Usunięcie dojrzałego biofilmu z organizmu jest zadaniem trudnym do wykonania i cechującym się wysokim ryzykiem niepowodzenia terapeutycznego [4]. Dlatego zakażenia związane z obecnością biofilmu przyczyniają się do znacznego pogorszenia stanu zdrowotnego pacjenta, obniżenia jego statusu socjo-ekonomicznego oraz olbrzymich strat finansowych dla jednostek służby zdrowia. Zgodnie z obecnymi zaleceniami, pokryty biofilmem implant lub zainfekowaną tkankę należy (w miarę możliwości) usunąć (np. chirurgicznie) i przeprowadzić antyseptykę oraz antybiotykoterapię systemową w celu zahamowania propagacji drobnoustrojów w głąb ciała pacjenta.

Często działanie takie jest niemożliwe do wykonania, a zakażenia związane z obecnością biofilmu mają charakter nawracający i przewlekły [5]. Przykładem są przewlekłe zakażenia ran związane z obecnością biofilmu. Prowadzą one do znacznego pogorszenia się stanu pacjenta (a nawet do jego śmierci) oraz do istotnych obciążeń dla systemu służby zdrowia. Szacuje się, że leczenie ran przewlekłych – odleżyn, owrzodzeń goleni, owrzodzeń stopy cukrzycowej, ran oparzeniowych, owrzodzeń neoplastycznych pochłania aż 2-4% budżetów przeznaczonych na opiekę zdrowotną państw członkowskich Unii Europejskiej [6]. Chroniczność infekcji jest następstwem złożonych interakcji między wydolnością układu krążenia oraz systemu immunologicznego gospodarza, chorobami współistniejącymi a drobnoustrojami tworzącymi biofilm.

Macierz pozakomórkowa biofilmu tworzącego się w ranach przewlekłych jest jednym z kluczowych czynników podnoszącym oporność tej struktury względem antybiotyków i antyseptyków w porównaniu do drobnoustrojów bytujących w formie planktonicznej [7]. Macierz chroni bakterie także przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza.

Neutrofile i makrofagi są w uszkodzić górne warstwy macierzy, odsłaniając ukryte tam komórki, nie potrafią natomiast przeniknąć do głębszych warstw biofilmu. Paradoksalnie, komórki odpornościowe uruchamiając kaskadę odpowiedzi immunologicznej (polegającej m.in. na „wybuchu tlenowym”, czyli uwolnieniu reaktywnych form tlenu o silnym działaniu przeciwbakteryjnym) prowadzą do poważnych uszkodzeń tkanek gospodarza, ale nie do całkowitego zniszczenia biofilmu. Składniki uszkodzonych tkanek gospodarza stają się natomiast źródłem pożywienia dla drobnoustrojów, które odtwarzają pełną strukturę biofilmu. Jakkolwiek nie można pomijać pozostałych czynników zaburzających proces gojenia się rany (np. hipoksji w owrzodzeniu stopy cukrzycowej, zaburzeń ukrwienia, zaburzeń odpornościowych czy wielu innych), to jednak obecność w ranach przewlekłych biofilmu powinna być uznana za jeden z najistotniejszych czynników hamujących i spowalniających proces gojenia [8]. Infekcja w ranie może rozwijać się przez długi czas niezauważona, ponieważ drobnoustroje namnażają się pod warstwą skrzepu, włókniaka czy wewnątrz komórek tkanki przyrannej [9], przez co nie dochodzi do wystąpienia odpowiedzi immunologicznej i rozwoju objawów klinicznych. W sytuacji, gdy liczba komórek drobnoustrojów przekroczy jednak określone miano (zwyczajowo przyjmuje się jako wartość krytyczną 10^5 komórek/gram tkanki), dochodzi do pojawienia się silnych oznak infekcji, stan rany ulega znaczącemu pogorszeniu, a dalszy rozwój zakażenia może prowadzić do propagacji drobnoustrojów np. drogą krwi i w efekcie do sepsy [10]. Obecnie, mimo licznych prób podejmowanych przez środowiska naukowe i przemysł medyczny, brakuje szybkich metod detekcji biofilmu w ranach, sposobów na szybkie (i ekonomicznie opłacalne) określenie wrażliwości szczepów infekujących ranę względem konkretnych leków i wyrobów medycznych oraz metod umożliwiających szybką eradykację patogenów z rany.

Infekcja w ranie, niezależnie od jej etiologii może doprowadzić do translokacji drobnoustrojów z tkanek miękkich w głąb organizmu pacjenta i utworzenia biofilmu na powierzchni kości. Charakterystycznym przykładem takiego zjawiska jest zakażenie stopy cukrzycowej. Ta jednostka chorobowa, będąca jednym z najczęstszych powikłań cukrzycy, charakteryzuje się niedostatecznym ukrwieniem stóp, co zmniejsza ich wrażliwość bólową, utrudnia gojenie się ran i owrzodzeń świadczących o postępującym procesie martwiczym. Zakażenie owrzodzenia (często wywoływana przez gronkowca złocistego bądź pałeczkę ropy błękitnej) prowadzić może do penetracji tych drobnoustrojów w głąb tkanki skórnej i mięśni, a w efekcie do kości stopy. Postępująca destrukcja tkanek miękkich i twardych mająca miejsce na skutek aktywności litycznej drobnoustrojów oraz zagrożenie infekcją systemową jest przyczyną, dla której konieczne bywa przeprowadzenie amputacji stopy a nawet całej

kończyny [11]. Innym obszarem ciała, w którym stosunkowo często dochodzi do przeniesienia infekcji z tkanek miękkich na kość jest jama ustna. Naruszenie ciągłości błon śluzowych czy stany patofizjologiczne przyzębia umożliwiają drobnoustrojom migrację w głąb organizmu pacjenta i osadzenie się między innymi na powierzchni kości [12]. Do zakażenia kości może także dochodzić drogą krwi albo na skutek działań okołozabiegowych. Rozwój zakażenia mającego swój początek na powierzchni kości, protezy czy urządzenia stabilizującego może trwać kilka miesięcy lub nawet lat, nie dając przy tym żadnych specyficznych objawów lub jedynie niewielką reakcję zapalną.

To maskowanie rozwijającej się przez długi okres czasu infekcji jest jedną z cech wspólnych zakażeń związanych z obecnością biofilmu zarówno w ranach, jak i w kościach. Kolejnymi cechami wspólnymi jest nieskuteczność systemu immunologicznego oraz środków przeciwdrobnoustrojowych w eradykacji dojrzałego biofilmu ran i kości, chroniczność i nawracanie infekcji, silne uszkodzenie tkanek gospodarza sąsiadujących z biofilmem.

Podobnie jak w przypadku biofilmu tworzonego w ranach, także w przypadku biofilmu na powierzchni kości uważa się, że za destrukcję tkanek (poza aktywnością lityczną drobnoustrojów), odpowiedzialne są wytwarzane przez komórki efektorowe układu immunologicznego reaktywne formy tlenu (ang. ROS, reactive oxygen species) [Ryc.2].



Ryc.2. Podobieństwa w rozwoju biofilmu tworzonego w ranach i na powierzchni kości oraz w odpowiedzi układu immunologicznego. [Rycina własna].

W procesie infekcyjnym obserwowane jest odłączanie się fragmentów obumarłej kości (inaczej martwaków lub sekwestrów) [13]. Fragmenty te tworzą nowe ogniska zakaźne, w których dochodzi do gwałtownego rozwoju drobnoustrojów. Kość jest tkanką, która stanowi trudną do przeniknięcia barierę dla większości podanych systemowo antybiotyków. W przypadku zakażenia, antybiotyki muszą penetrować nie tylko przez kość, ale i przez macierz biofilmową. Ponadto, część komórek w biofilmie cechuje się spowolnionym bądź zatrzymanym wzrostem, co w znaczący sposób podnosi ich tolerancję na działanie znacznej części antybiotyków. Dlatego też dochodzi do przypadków, gdy mimo prowadzenia terapii przeprowadzonej zgodnie z rekomendacjami, skuteczność kliniczna leczenia infekcji kości jest niezadawalająca.

Zakażenie kości, niezależnie od etiologii - długotrwałego procesu zapalnego stawów, urazu, czy wprowadzenia implantu, stanowi tak istotny problem nowoczesnej medycyny, że Światowa Organizacja Zdrowia nazwała ostatnie dziesięciolecie dekadą chorób kości i stawów, a chirurgię ortopedyczną „chirurgią ryzyka i niepewnych gwarancji” [14].

Dlatego też konieczne jest nie tylko wprowadzenie nowych, skuteczniej penetrujących do miejsca infekcji leków, ale także zrozumienie i poznanie przyczyn, dla których infekcje kości przez długi czas mogą rozwijać się w sposób niezauważony.

Infekcje związane z obecnością biofilmu w ranach i kościach prowadzą do znacznego pogorszenia się stanu pacjenta. Nielezione – prowadzić mogą do śmierci. Leczone w sposób

niewzględniający specyfiki biofilmu prowadzić mogą do utrzymywania się lub nawracania infekcji, a w efekcie do wykluczenia pacjenta z życia socjoekonomicznego społeczeństwa na przykład na skutek ograniczonej zdolności do poruszania się, wysokiego poziomu doświadczanego bólu czy nawet nieprzyjemnego zapachu (malodor) wydzielającego się z rany.

Dlatego też podjąłem się opracowania i zbadania przydatności nowych technik i metod badawczych pod kątem ich zastosowania jako potencjalnych narzędzi do wykrywania zakażeń związanych z obecnością biofilmu tworzonego w ranach oraz kościach, a także zrozumienia mechanizmu unikania przez patogeny odpowiedzi immunologicznej oraz aktywności środków przeciwdrobnoustrojowych.

4.3.2. Cel badawczy

Podstawowym celem publikacji, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i stanowiących podstawę o ubieganie się o stopień naukowy doktora habilitowanego, było uzyskanie i opracowanie sposobów służących wykrywaniu, określaniu lekowrażliwości oraz zwalczaniu infekcji ran przewlekłych i kości wywoływanych przez drobnoustroje rosnące w postaci biofilmu.

Szczegółowe cele badawcze to:

1. Analiza składu metabolitów wydzielanych przez drobnoustroje izolowane z ran przewlekłych w celu określenia ich przydatności jako biomarkerów zakażenia oraz określenia przydatności Spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego jako narzędzia do szybkiej diagnostyki mikrobiologicznej służącej wykrywaniu drobnoustrojów izolowanych z ran przewlekłych [**publikacja H-1**]
2. Opracowanie metody umożliwiającej szybką i powtarzalną ocenę wrażliwości biofilmu utworzonego przez mikroorganizmy izolowane z ran przewlekłych na substancje przeciwdrobnoustrojowe zawarte w opatrunkach aktywnych [**publikacja H-2**]
3. Określenie przydatności wirującego pola magnetycznego do zwiększenia aktywności wybranych antybiotyków oraz antyseptyków względem biofilmów tworzonych przez drobnoustroje wywołujące infekcje ran przewlekłych [**publikacja H-3**]
4. Określenie wpływu drobnoustrojów rosnących w postaci biofilmu na powierzchnię głównego mineralnego składnika kości - hydroksyapatytu [**publikacja H-4**]
5. Określenie zdolności drobnoustrojów rosnących w postaci biofilmu do destrukcji powierzchni kości bez udziału układu immunologicznego gospodarza [**publikacja H-5**]
6. Określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowego leku, hybrydowej cząsteczki bisfosfonian-ciprofloksacyna, względem biofilmów tworzących się na powierzchni hydroksyapatytu [**publikacja H-6**]

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
FARMACEUTYCZNEJ I PARAZYTOLOGII
Adiunkt

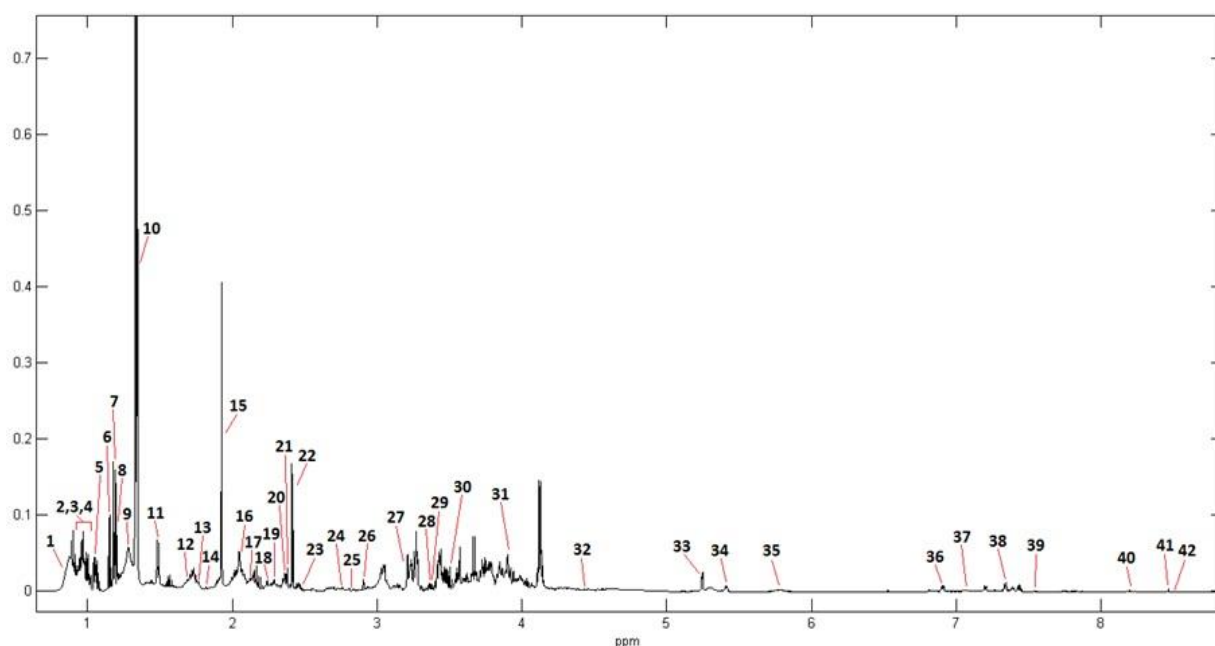
dr n. med. Adam Junka

4.3.3. Uzyskane wyniki

H-1: Junka AF, Wojtowicz W, Ząbek Z, Krasowski G, Smutnicka D, Bakalorz B, Boruta B, Dziadas M, Młynarz P, Sedghizadeh P, Bartoszewicz M: *Metabolic profiles of exudates from chronic leg ulcerations Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2017 Vol.137; s.13-22 (IF: 2.831; MNiSW: 35 pkt.)*

W ranach przewlekłych drobnoustroje namnażają się w kieszonkach rany, pod warstwą skrzepu czy tkanek nekrotycznych. Powstanie biofilmu prowadzi do rozwoju przewlekłego zakażenia i destrukcji tkanek pacjenta [Ryc.2]. Dlatego wczesne wykrycie drobnoustrojów patogennych i ich eradykacja są wymagane dla poprawy stanu rany i zdrowia pacjenta. W badaniu H-1, do szybkiej detekcji drobnoustrojów w przewlekłych owrzodzeniach goleni wykorzystałem nową dziedzinę nauki określaną mianem metabolomiki. W badaniu metabolomicznym analizie poddawane są wszystkie aminokwasy, lipidy, peptydy, witaminy, kwasy organiczne i węglowodany powstałe w wyniku przemian fizjologicznych lub patologicznych zachodzących w komórkach gospodarza oraz - w przypadku chorób o etiologii infekcyjnej - w komórkach drobnoustrojów [15]. **W badaniu H-1 założyłem, że wysięk gromadzący się w większości przewlekłych owrzodzeń goleni może stanowić cenny materiał diagnostyczny**, gdyż występują w nim metabolity wydzielane przez drobnoustroje, komórki tworzące łożysko rany, komórki układu immunologicznego a także metabolity osoczowe [16]. Do detekcji i identyfikacji metabolitów z wysięku posłużyłem się spektroskopią Magnetycznego Rezonansu Jądrowego NMR (ang. Nuclear Magnetic Resonance) [Wyk. 1] a do określenia istotności statystycznej uzyskanych wyników zastosowałem algorytm chemometryczny określanym mianem metody najmniejszych kwadratów PLS-EDA (ang. Partial Least Squares Discriminant Analysis). Dodatkowo w pracy H-1 wykonane zostały posiewy mikrobiologiczne wysięków z owrzodzeń oraz zebrane zostały dane związane ze stanem zdrowotnym pacjentów (masa ciała, wiek, choroby współtowarzyszące i inne). Wykazałem, że najmniejsza objętość wysięku potrzebna do przeprowadzenia analizy wynosi 600 μ L. Pobranie tak niewielkiej objętości płynu za pomocą jałowej pipety nie wywołuje bólu pacjenta (inaczej niż w przypadku pobierania bioptatów czy wymagających zastosowania ucisku wymazów bakteriologicznych) oraz nie wymaga użycia specjalistycznych drenaży. Wykazałem, że przeprowadzenie badania i uzyskanie wyników zajmuje około 4 godzin, podczas gdy diagnostyka mikrobiologiczna opierającej się na posiewach na odpowiednie podłoża zajmuje min. 48 godzin (lub dłużej, jeśli za infekcję odpowiedzialne są drobnoustroje beztlenowe lub

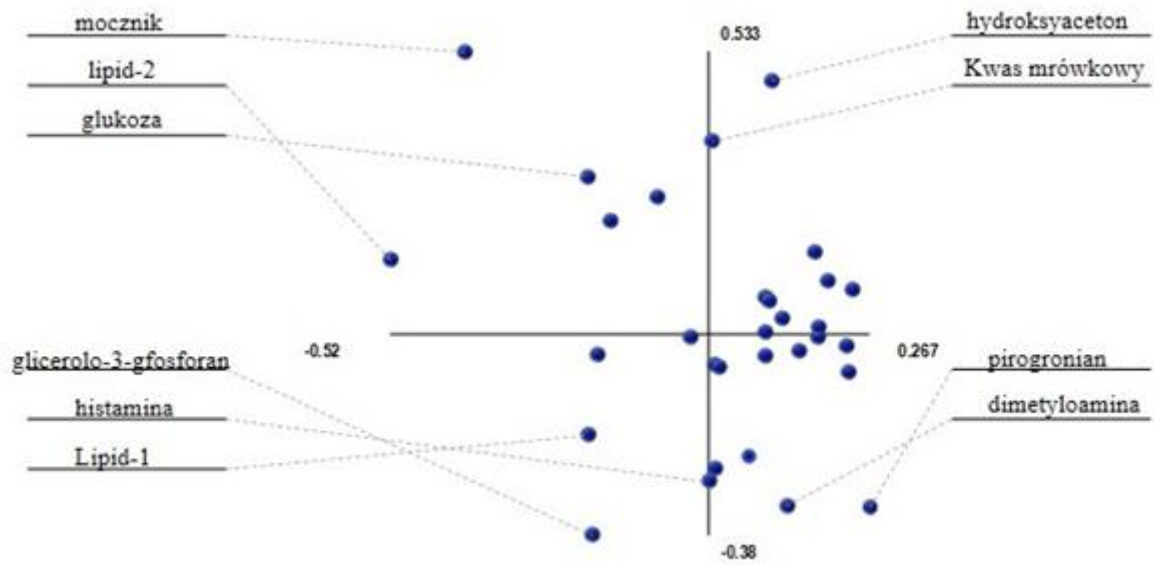
grzyby). Czas konieczny do przeprowadzenia badania metabolitów z wysięku jest zatem porównywalny do czasu koniecznego do przeprowadzenia diagnostyki opierającej się na detekcji kwasu nukleinowego DNA/RNA, np. łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR, ang. Real-Time Polymerase Chain Reaction,) Należy jednak zauważyć, że wykorzystanie techniki analizy metabolomicznej umożliwia uzyskanie w trakcie jednego pomiaru istotnych danych dotyczących nie tylko stanu mikrobiologicznego i potencjalnej infekcji rany pacjenta, ale także chorób współtowarzyszących, np. cukrzycy (zob. **Fig. 2., str. 20 dołączonej pracy H-1**), mogących wikłać proces gojenia rany.



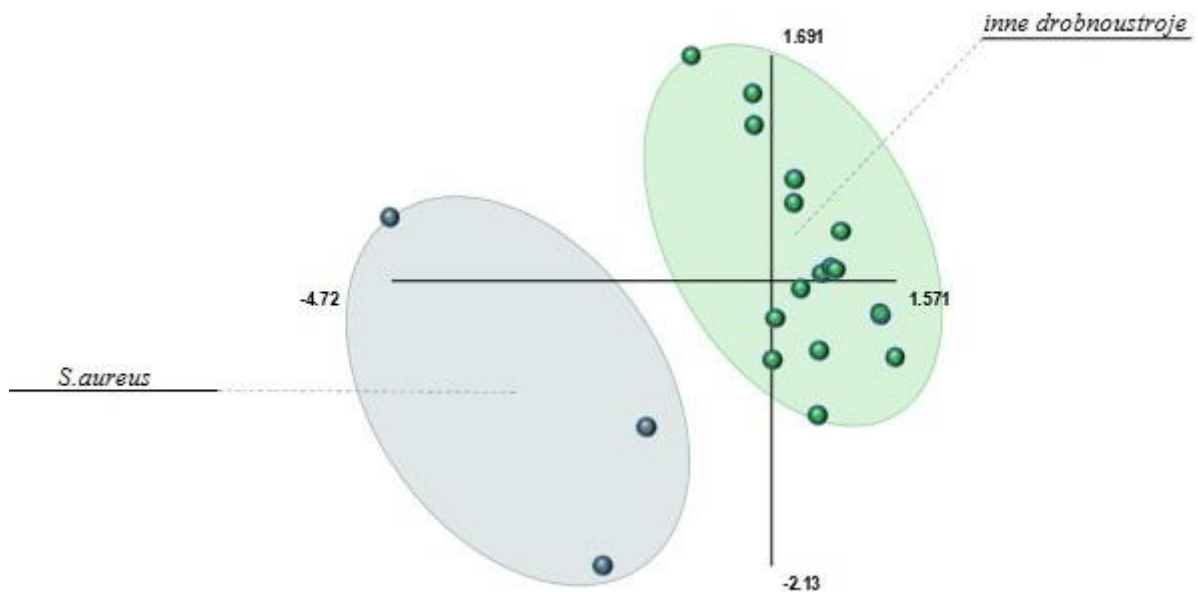
Wykres 1. Widmo zbiorcze 1H NMR analizowanych próbek wysięków. 1–lipid; 2–leucyna, 3 – walina, 4 – izoleucyna, 5 – propionian, 6 – glikol propylenowy, 7 – 3-hydroksymaślan, 8 – etanol, 9 – lipid 2, 10 –mleczan, 11 – alanina, 12 – leucyna, 13 – lizyna, 14 –metabolit nieznany 1, 15 – aceton, 16 – lipid 3, 17 – metabolit nieznany 2, 18 – metabolit nieznany 3, 19 - metabolit nieznany, 20 – glutaminian, 21 – pirogronian, 22 – bursztynian, 23 – metabolit nieznany 4, 24 – dimetyloamina, 25 – asparginian, 26– N.N-dimetyloglicyna, 27 – sn-glicero-3-fosfocholina, 28 – metabolit nieznany 5, 29 – metanol, 30 – glukoza 1, 31 – metabolit nieznany 6, 32 – hydroksyaceton, 33 – glukoza 2, 34 – metabolit nieznany 7, 35– mocznik, 36 –Tyrozyna, 37 – histamina, 38 – fenyloalanina, 39 – metabolit nieznany 8, 40 – metabolit nieznany 9, 41–mrówczan, 42 – metabolit nieznany 10. Na wykresie przedstawione są stężenia względne metabolitów. **Oryginalny wykres: Fig. 2, str. 16 dołączonej pracy H-1**

Na **Wyk.2** przedstawiony jest wynik analizy dyskryminacyjnej PLS-DA, pozwalającej na rozróżnienie pomiędzy charakterystycznym zbiorem metabolitów gronkowca złocistego, a metabolitami innych gatunków drobnoustrojów zasiedlających rany przewlekłe.

A.



B.



Wykres 2. Analiza metabolitów wydzielanych do wysięku przez gronkowca złocistego w porównaniu do metabolitów wydzielanych przez inne gatunki drobnoustrojów izolowanych z owrzodzeń goleni. A – metabolity o najwyższym stężeniu względnym. B - Grupowanie metabolitów gatunkowo-specyficznych za pomocą algorytmu PLS-EDA. Oryginalny wykres: Fig.4, str. 19 dołączonej pracy H-1

Należy zauważyć, że przedstawione na **Wyk. 2.** wysokie stężenie względne metabolitów powstających w wyniku oddychania beztlenowego może świadczyć o występowaniu dojrzałych postaci biofilmu gronkowca z charakterystycznym dla tej struktury zróżnicowaniem aktywności metabolicznej i mieszanym (tlenowo-beztlenowym) typem metabolizmu.

Praca H-1 jest (według najlepszej wiedzy Autora) pierwszym doniesieniem, w którym zademonstrowano przydatność diagnostyczną metabolomiki do analiz metabolitów z wysięku pobranego z przewlekłych owrzodzeń goleni. Ekstrapolacja opracowanej metodologii może potencjalnie służyć do analiz wysięku pochodzącego z każdego typu ran przewlekłych. Wcześniejsze doniesienia, takie jak na przykład badania amerykańskiego zespołu Ammons i wsp. (2014) skupiały się jedynie na analizach przeprowadzonych *in vitro* oraz na modelu zwierzęcym [17].

Przedstawione powyżej wyniki wykazują przydatność nowoczesnej techniki spektroskopowej NMR oraz algorytmów chemometrycznych do zarówno szybkiego wykrywania drobnoustrojów w ranie (oraz określenia ich profilu metabolicznego), jak i do analiz istotnych procesów zachodzących nie tylko w obrębie rany, ale i w organizmie pacjenta. Wykazano także wysoką przydatność wysięku jako materiału, który może zostać wykorzystany do badań metabolomicznych. Wyniki analiz przedstawionych w pracy H-1 w połączeniu z danymi uzyskanymi drogą wywiadu klinicznego mogą stanowić niezwykle cenne narzędzie diagnostyczne, którego zastosowanie przełożyć się może na istotne skrócenie czasu oczekiwania na wynik mikrobiologiczny, dostarczenie informacji o formie bytowania drobnoustrojów w ranie (społeczności osiadłe a formy planktoniczne), dodatkowo może być pomocne w określeniu ogólnego stanu zdrowotnego pacjenta.

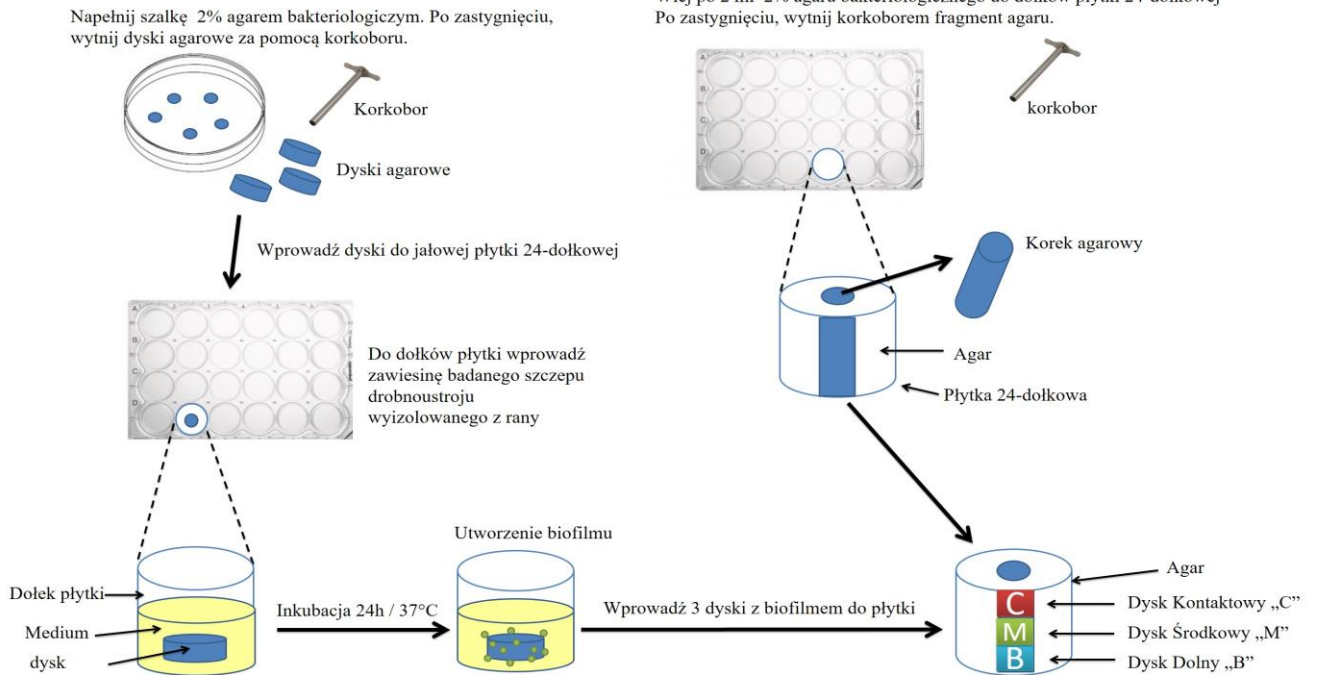
Upowszechnienie metody analizy metabolicznej wymaga stworzenia bazy danych metabolitów (lub zbiorów metabolitów) specyficznych dla poszczególnych gatunków drobnoustrojów na takiej samej zasadzie, na jakiej stworzono bazy danych biochemicznych służące identyfikacji i określaniu lekowrażliwości drobnoustrojów. Jednakże zalety badania metabolomicznego, takie jak bardzo krótki czas badania, możliwość szybkiego wykrycia drobnoustrojów (bez konieczności ich długotrwałej hodowli na podłożach różnicująco-wzrostowych), rozróżnienie metabolitów charakterystycznych dla szlaków oddychania tlenowego i beztlenowego drobnoustrojów sprawiają, że analiza metabolomiczna może znaleźć zastosowanie w intensywnie obecnie rozwijanej koncepcji leczenia ran powikłanych zakażeniem infekcją związanym z obecnością drobnoustrojów rosnących w postaci biofilmu.

[H-2] **Junka AF**, Żywicka A, Szymczyk P, Dziadas M, Bartoszewicz M, Fijałkowski K: *A.D.A.M. test (Antibiofilm Dressing's Activity Measurement) - simple method for evaluating anti-biofilm activity of drug-saturated dressings against wound pathogens. Journal of Microbiological Methods 2017 Vol.143; s.6-12 (IF: 1.701; MNiSW: 20 pkt.)*

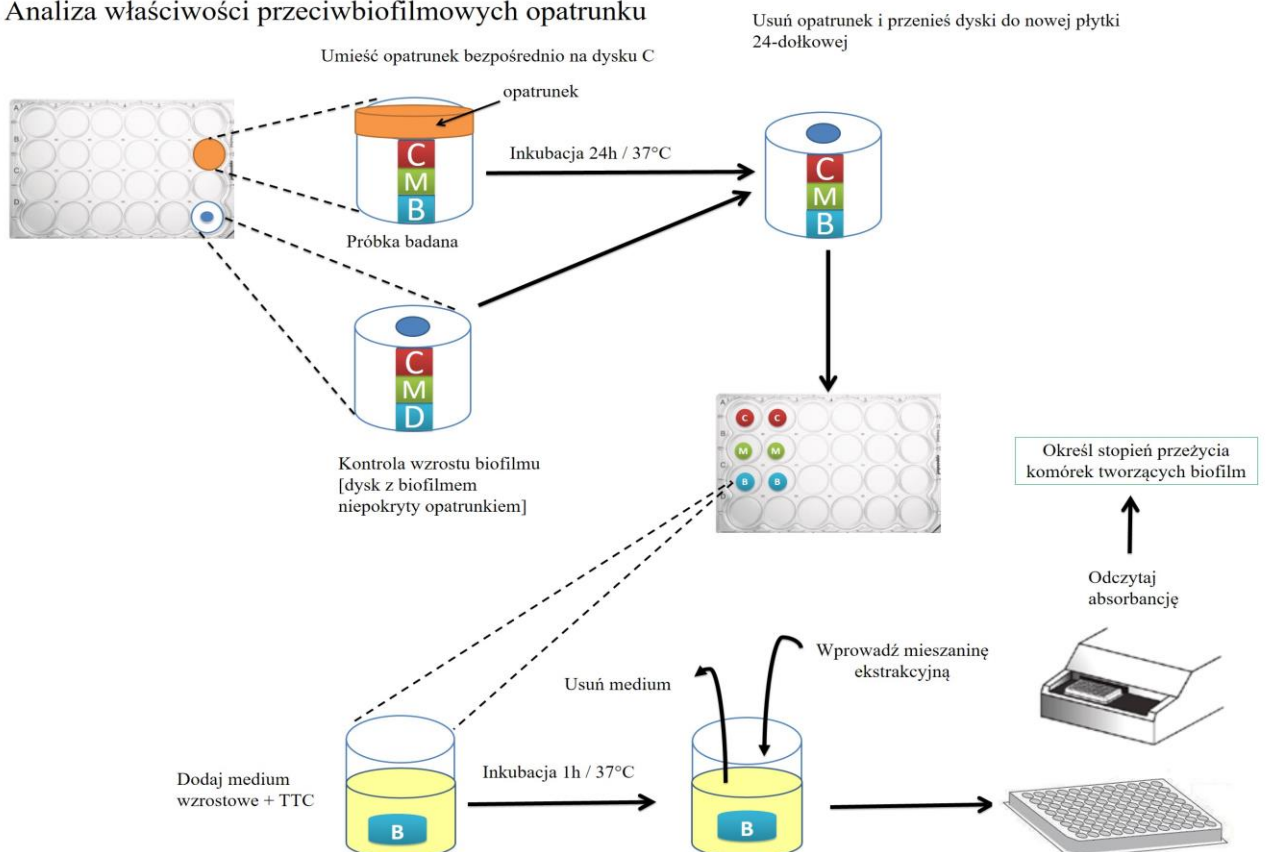
Jak wykazano w pracy H-1, szybka detekcja patogenów w ranie umożliwia podjęcie działań leczniczych adekwatnych do stanu mikrobiologicznego rany oraz ogólnego stanu pacjenta. Zgodnie z obowiązującymi wytycznymi, leczenie ran przewlekłych objętych procesem infekcyjnym wymaga stosowania antyseptyków (miejscowo stosowanych środków przeciwdrobnoustrojowych) oraz opatrunków wysyconych związkiem przeciwdrobnoustrojowym. Opatrunki takie mają za zadanie chronić ranę przed kontaminacją drobnoustrojami pochodzącymi ze środowiska zewnętrznego oraz zwalczać zakażenie toczące się w łożysku rany [18].

W roku 2013 zaproponowałem metodę laboratoryjnej oceny aktywności bójczej antyseptyków względem biofilmu tworzonego przez drobnoustroje wywołujące zakażenie w ranach - B.O.A.T (ang. Biofilm-Oriented Antiseptic Test) [19]. Do chwili obecnej istniała natomiast potrzeba opracowania szybkiej i ekonomicznie przystępnej metody oceny aktywności bójczej opatrunków względem biofilmu infekującego rany przewlekłe. Celem pracy H-2 było stworzenie takiej metody – umożliwiającej hodowlę biofilmu tworzonego przez drobnoustroje pozyskane z rany pacjenta, a następnie ocenę skuteczności opatrunków aktywnych względem takich biofilmów w ściśle kontrolowanych warunkach *in vitro*. Zasada opracowanej przeze mnie metody, którą nazwałem A.D.A.M. [ang. Antibiofilm Dressing's Activity Measurement czyli Pomiar Aktywności Przeciwbiofilmowej Opatrunku] przedstawiona jest na **Rycinie 3**. Zaletami zaproponowanej metody jest powtarzalność, krótki czas wykonania oraz możliwość realizacji przez laboratoria kliniczne, często niedysponujące zaawansowaną aparaturą badawczą stosowaną do analiz biofilmów tworzonych przez drobnoustroje w patogenezie zakażeń.

I. Utworzenie biofilmu na dysku agarowym



II. Analiza właściwości przeciwbiofilmowych opatrunku



Ryc.3. Schemat wykonania metody A.D.A.M. Oryginalna rycina: Fig. 4, str. 19 dołączonej pracy H-2

Do przeprowadzenia testu A.D.A.M. potrzebne są jedynie podstawowe materiały i odczynniki mikrobiologiczne. Metoda cechuje się możliwością wykonywania 24 powtórzeń pomiarowych podczas jednej analizy. Aktywność przeciwbiofilmowa opatrunku określana jest poprzez analizę dwóch parametrów:

- stopnia eradykacji biofilmu z ułożonych na sobie trzech dysków agarowych na skutek aktywności bójczej substancji aktywnej opatrunku
- zdolności penetracji substancji aktywnej opatrunku przez poszczególne krążki agarowe i warstwy biofilmu.

Skuteczność eradykacji biofilmu z poszczególnych dysków agarowych obliczana jest poprzez zastosowanie następującego wzoru:

$100\% - \left(\frac{(OD_{\text{biofilmu z próbki badanej}})}{(OD_{\text{próbki kontrolnej}})} \times 100\% \right)$, gdzie „OD biofilmu z próbki badanej” to wartość pomiaru absorbancji wskazującej w sposób półilościowy na liczbę komórek w biofilmie, które przeżyły kontakt z opatrunkiem aktywnym; „OD próbki kontrolnej” to wartość pomiaru absorbancji wskazującej w sposób półilościowy na liczbę komórek w biofilmie niepoddanemu działaniu opatrunku (próba kontrolna dodatnia).

lub jeśli wykonywano posiewy ilościowe:

$100\% - \left(\frac{(CFU_{\text{biofilmu z próbki badanej}})}{(CFU_{\text{próbki kontrolnej}})} \times 100\% \right)$, gdzie cfu –liczba komórek w biofilmie, które przeżyły kontakt z opatrunkiem aktywnym; cfu próbki kontrolnej: liczba komórek w biofilmie niepoddanemu działaniu opatrunku (próba kontrolna dodatnia).

W metodzie A.D.A.M. dyski agarowe imitują warstwy skrzepu oraz tkanki martwicze, pod którymi może rozwijać się biofilm w ranie. Metoda umożliwia modyfikację składu dysków poprzez wprowadzenie do agaru takich „obciążników” jak elementy morfotyczne krwi, białko albuminę czy mucynę, które imitują warunki panujące w ranach silnie zanieczyszczonych i pokrytych śluzem. Liczne substancje antyseptyczne na skutek swej budowy chemicznej i mechanizmów działania charakteryzują się w obecności wyżej wzmiankowanych obciążników znacznie niższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową niż mogłoby to wynikać z karty charakterystyki leku czy wyrobu medycznego [20]. Dlatego też drugim parametrem ocenianym w metodzie A.D.A.M jest opracowana przeze mnie bezwymiarowa jednostka, którą określiłem mianem Indeksu Przenikania (ang. Permeability Index, PI), a która wskazuje

na zdolność penetracji substancji aktywnej z opatrunku przez macierz biofilmową i przez poszczególne dyski agarowe.

PI obliczane jest według następującego wzoru:

$$PI = \frac{C}{B} - \left(\frac{\left(\frac{C}{M} \right)}{\left(\frac{M}{B} \right)} \right)$$

Gdzie: **PI** – indeks przenikania; **C,M,B** - poziom redukcji biofilmu dyskach agarowych (**C** - kontaktowych, **M** -środkowych oraz **B** - dolnych).

Wartość $PI \leq 1$ opisuje opatrunki, których substancja czynna wykazuje dobrą przenikalność; $PI < 1 > 2$ opisuje opatrunki, których substancja czynna wykazuje umiarkowaną przenikalność; $PI \leq 2$ opisuje opatrunki, których substancja czynna wykazuje niską przenikalność. Zaproponowane rozwiązanie pozwala zatem na szybkie i ekonomicznie opłacalne określenie skuteczności eradykacji biofilmu (tworzonego przez patogeny wyizolowane z rany chorego) przez specyficzne typy opatrunków oraz określenie zdolności substancji aktywnej z opatrunku do przenikania w głąb rany. Wyniki uzyskiwane są w ciągu 72 h, a w ramach jednego badania możliwe jest badanie kilkunastu typów opatrunków. Otrzymane dane pozwalają na zastosowanie względem hospitalizowanego pacjenta najskuteczniejszego z dostępnych w danej jednostce opieki zdrowotnej opatrunku aktywnego względem patogenów faktycznie zasiedlających ranę chorego. Połączenie metody A.D.A.M wraz z przytoczonym uprzednio opracowanym przeze mnie testem B.O.A.T (służącym ocenie skuteczności antyseptyków względem biofilmu) [19] prowadzić może do skutecznego leczenia ran przewlekłych objętych procesem infekcyjnym wywołanym przez drobnoustroje w formie biofilmu, a co za tym idzie skróceniem czasu hospitalizacji pacjentów i znaczącego obniżenia kosztów leczenia. Stworzona przeze mnie metoda umożliwia także badanie skuteczności eradykacji i indeksu przenikalności **PI** opatrunków eksperymentalnych, jeszcze nie wprowadzonych do leczenia, dając wyobrażenie o ich przypuszczalnej aktywności w warunkach klinicznych.

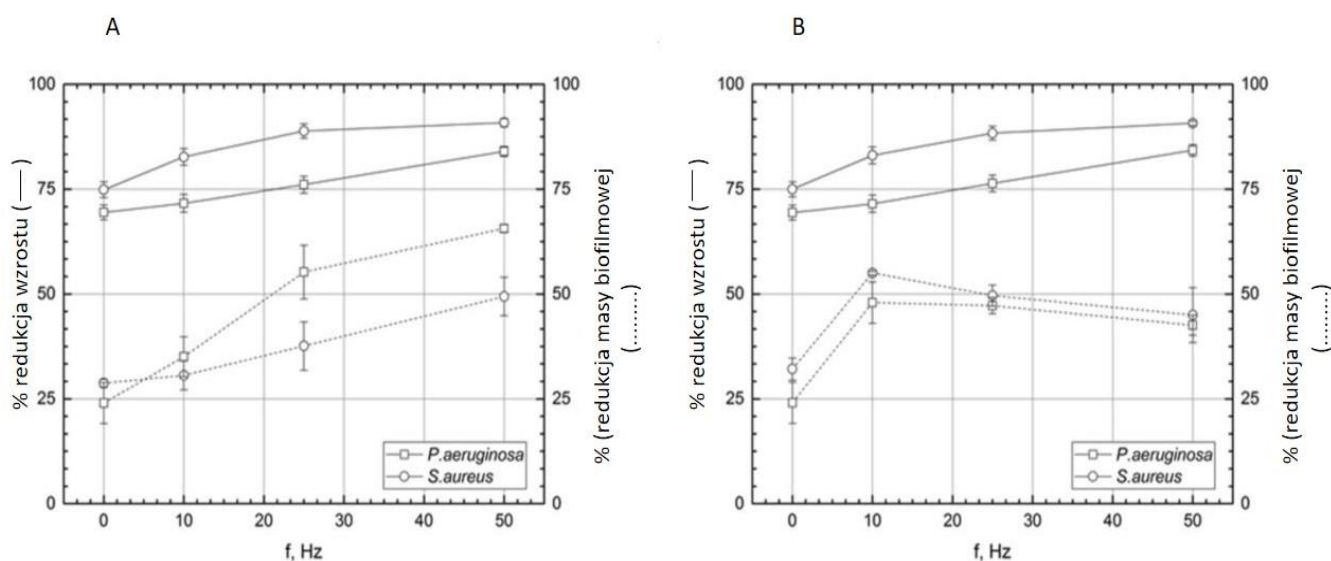
H-3: Junka AF, Rakoczy R, Szymczyk P, Bartoszewicz M, Sedghizadeh P, Fijałkowski K: *Application of rotating magnetic fields increase the activity of antimicrobials against wound biofilm pathogens. Scientific Reports 2018 Vol.8; art.167 (IF: 4.122; MNiSW: 40 pkt.)*

Wczesne wykrycie patogenów w ranie [H-1] oraz określenie wrażliwości biofilmu na substancje aktywne zawarte w opatrunku [H-2] czy antyseptyku [19] pozwala na wdrożenie działań terapeutycznych prowadzących do poprawy stanu zdrowia pacjenta cierpiącego od rany przewlekłej niezależnie od jej etiologii. Jednakże niezwykle wysoka tolerancja biofilmu na antybiotyki i antyseptyki jest wciąż przyczyną licznych niepowodzeń leczniczych. Dochodzi do tego między innymi na skutek słabej penetracji leku przez warstwy skrzepu, tkanki martwiczej, przez macierz biofilmu (w przypadku określonych grup antybiotyków) i obecnością w biofilmie komórek przetrwałych. Z tego powodu stężenie leku w miejscu docelowym jest zbyt niskie, by doprowadzić do eradykacji biofilmu. Z kolei zastosowanie wyższych stężeń środków przeciwdrobnoustrojowych prowadzi do podwyższonej cytotoksyczności i uszkodzeń komórek oraz tkanek gospodarza [21]. W przypadku infekcji ran obiecującym podejściem mogącym przełamać tę niekorzystną sytuację jest zastosowanie nie wyższych stężeń leków/wyrobów medycznych, ale czynników zwiększających ich zdolność do penetracji przez wyżej wzmiankowane przeszkody.

W badaniu H-3 wchodzącym w skład osiągnięcia naukowego, **założyłem, że czynnikiem mogącym podnieść aktywność bójczą antyseptyków oraz antybiotyków względem biofilmu tworzonego przez drobnoustroje izolowane z ran przewlekłych może być Wirujące Pola Magnetyczne (WPM).**

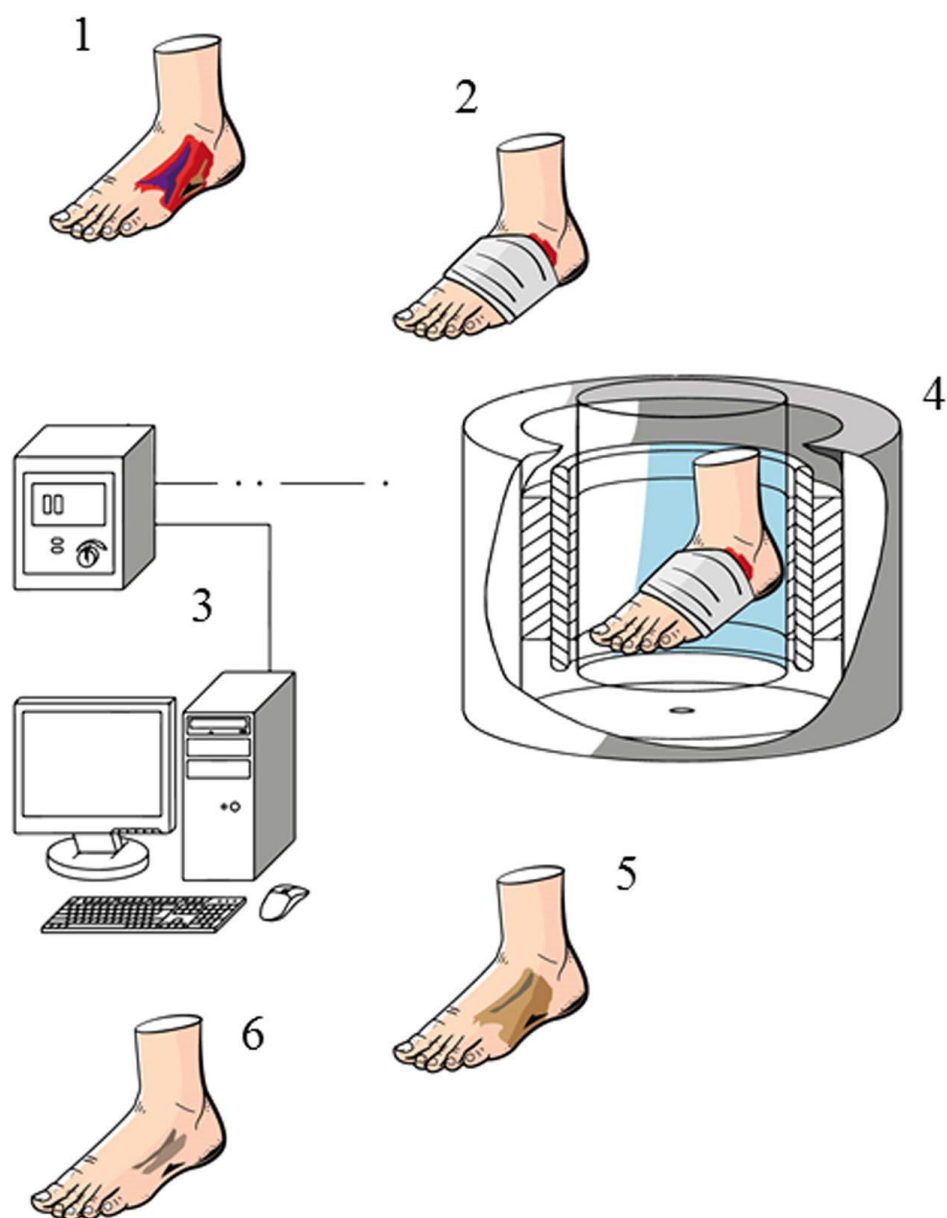
Badania związane z wpływem pól magnetycznych na różnorodne aspekty funkcjonowania drobnoustrojów oraz na zdolność penetracyjną związków przeciwdrobnoustrojowych prowadzono do tej pory głównie z zastosowaniem prostych generatorów statycznego pola magnetycznego. W badaniu H-3 wykorzystałem zaprojektowany i skonstruowany przez dr hab.inż Rafała Rakoczego oraz dr hab.inż Karola Fijałkowskiego [22] zaawansowany technologicznie generator WPM. Pole tego typu jest stałe w czasie, lecz zmienne w przestrzeni i powstaje w wyniku superpozycji dwóch lub więcej pulsujących pól magnetycznych o identycznych częstotliwościach, lecz przestrzennie przemieszczonych w stosunku do siebie. Założyłem, że wytwarzane przez generator WPM siły Lorenza, wywołujące ruch w płynie [23], doprowadzą do zwiększonej intensywności mieszania naładowanych elektrycznie związków przeciwdrobnoustrojowych i w efekcie do zwiększenia stopnia penetracji użytych w badaniu antybiotyków (gentamycyny i ciprofloksacyny) oraz

antyseptyków (oktenidyny, chlorheksydy, poliheksanidyny i mleczanu etakrydyny) przez macierz biofilmu *Staphylococcus aureus* oraz *Pseudomonas aeruginosa* – istotnych czynników etiologicznych zakażeń ran przewlekłych. Uzyskane wyniki wykazały nawet 2-krotnie wyższą redukcję biofilmów wzmiankowanych drobnoustrojów na skutek zastosowania wyżej wymienionych substancji leczniczych w połączeniu z różnymi kombinacjami ekspozycyjno-częstotliwościowymi WPM (5min-17h/10-50Hz) [Wykres 3.A; 3.B.].



Wykres 3. Zwiększenie poziomu redukcji [%] wzrostu i biomasy biofilmu *P.aeruginosa* i *S.aureus* inkubowanych w obecności wirującego pola magnetycznego oraz gentamycyny (A) i ciprofloksacyny (B) f, Hz – częstotliwość zastosowanego pola magnetycznego wyrażona w hercach. Oryginalne wykresy Fig. 3, str. 4 dołączonej pracy H-3

Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań, które od października 2018 wykonywane są w ramach grantu NCN OPUS: „Analiza mechanizmów zwiększonej efektywności substancji przeciwdrobnoustrojowych względem biofilmu w obecności wirującego pola magnetycznego”. Wyniki posłużą do stworzenia przyszłych procedur leczniczych, w których generator wirującego pola magnetycznego zostanie zastosowany do leczenia ran przewlekłych objętych procesem infekcyjnym [Ryc.3].



Ryc.3. Schemat potencjalnej procedury wykorzystującej generator wirującego pola magnetycznego do leczenia zainfekowanych ran przewlekłych. 1 – zainfekowane owrzodzenie stopy cukrzycowej; 2 – owrzodzenie pokryte opatrunkiem zawierającym substancję przeciwdrobnoustrojową; 3 – stacja komputerowa i falownik tranzystorowy; 4 – stopa cukrzycowa wprowadzona do generatora WPM; 5 – eradykacja biofilmu na skutek zwiększonej aktywności substancji przeciwdrobnoustrojowej w obecności WPM; 6 –przyspieszenie procesu gojenia

[H-4] **Junka AF, Szymczyk P, Smutnicka D, Kos M, Smolina I, Bartoszewicz M, Chlebus E, Turniak M, Sedghizadeh P.: *Microbial biofilms are able to destroy hydroxyapatite in the absence of host immunity in vitro.* Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2015 Vol.73 no.3; s.451-46**

Biofilmy tworzące się w ranach przewlekłych oraz w obrębie tkanki kostnej łączą liczne podobieństwa, z których najistotniejsze przedstawione są na **Ryc.2 (str. 12)**. Przewlekłość zakażeń kości, występowanie objawów infekcji po długim okresie utajenia, a także doniesienia grup badawczych zajmujących się problematyką diagenetycznych zmian kostnych [24], sprawiły, że w **pracy H-4** wysunąłem hipotezę o **zdolności niszczenia i re-modelowania powierzchni kości przez biofilm tworzony przez drobnoustroje bez udziału układu odpornościowego**. Potwierdzenie tej hipotezy stanowiłoby silny dowód na słuszność koncepcji, według której biofilm może rozwijać się w głębi uszkodzonej tkanki kostnej maskując swoją obecność przed układem odpornościowym. Podobnie jak w przypadku biofilmów tworzonych w ranach, maskowanie się drobnoustrojów w głębi struktury kostnej tłumaczyłoby niską skuteczność antybiotyków stosowanych systemowo w tego typu zakażeniach. Najtwardszą składową kości jest hydroksyapatyt (HA), minerał zbudowany z hydroksyfosforanu wapnia - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Potwierdzenie zdolności drobnoustrojów do wywoływania uszkodzeń w hydroksyapatycie byłoby zatem równoznaczne z udowodnieniem ich zdolności do re-modelowania kości, jako że destrukcja organicznych elementów macierzy zewnątrzkomórkowej kości (np. kolagenu) na skutek wydzielania przez drobnoustroje enzymów i toksyn oraz umiejętności ich inwazji do wnętrza komórek kościotwórczych została już wykazana przez inne zespoły badawcze [25].

Do określenia zdolności biofilmu do wywoływania uszkodzeń powierzchni hydroksyapatytu posłużyłem się krążkami utworzonymi z tego minerału, cechującymi się wysokim poziomem gładkości powierzchni (**sekcja „Material and Methods: Manufacture of HA Discs załączonej pracy H-4**). Krążki HA wprowadziłem do zawiesin zawierających *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans* oraz *Streptococcus mutans* i poddałem inkubacji, w czasie której drobnoustroje utworzyły biofilm na powierzchni HA. Obecność biofilmu potwierdziłem za pomocą Skaningowej Mikroskopii Elektronowej, a obecność żywych komórek drobnoustrojów wykorzystując technikę posiewów ilościowych. Następnie za pomocą łagodnego detergentu usunąłem biofilm z powierzchni dysków odsłaniając strukturę hydroksyapatytu. W porównaniu do prób kontrolnych (krążków jałowych, poddanych analogicznym procedurom badawczym jak krążki pokryte biofilmem), próbki badane

charakteryzowały się licznymi zmianami powierzchniowymi, co wykazałem za pomocą mikroskopii elektronowej oraz trójwymiarowej analizy planimetrycznej wykonanej z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. Stosując spektroskopię dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDX, ang. Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy Analysis) wykazałem, że skład chemiczny zmian strukturalnych jest tożsamy ze składem chemicznym natywnej powierzchni HA, co oznaczało, że obserwowane za pomocą mikroskopii struktury nie są artefaktami (np. pozostałymi po oczyszczaniu krążków z warstwy biofilmowej), lecz uszkodzonymi fragmentami powierzchni hydroksyapatytowej.

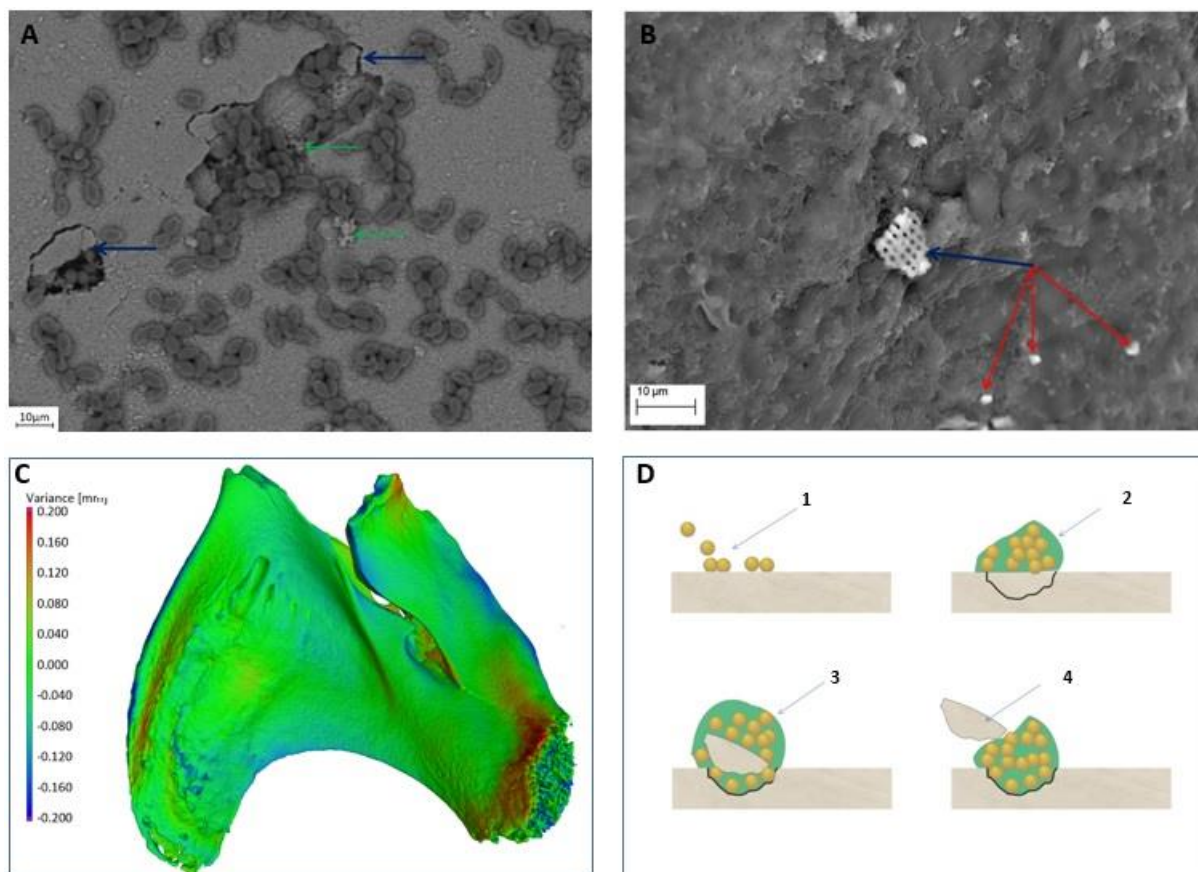
Rozwój biofilmów *S. aureus*, *C. albicans*, *S. mutans* oraz biofilmu mieszanego *C. albicans* + *S. mutans* na powierzchni hydroksyapatytu przekładał się na istotne zmniejszenie wartości pH zawiesiny w porównaniu do wyjściowego pH wynoszącego 7,0. Z kolei rozwój biofilmu *P. aeruginosa* prowadził do podniesienia pH środowiska (**Tab. 5, str. 462 załączonej pracy H-4**). Mimo tego, obecność biofilmu *P. aeruginosa* przekładała się na uszkodzenia struktury hydroksyapatytu w podobnym zakresie, co obecność biofilmów pozostałych analizowanych gatunków. Oznacza to, że za zmiany strukturalne w hydroksyapatycie odpowiedzialne są także inne czynniki niż stężenie jonów wodorowych.

Uzyskane wyniki wykazały zdolność biofilmu tworzonego przez drobnoustroje do wywoływania uszkodzeń najtwardszego składnika kości, hydroksyapatytu, bez udziału układu immunologicznego. Ekstrapolując przedstawione w pracy H-4 wyniki na warunki *in vivo* można przyjąć, że destrukcja kości umożliwia biofilmowi narastanie w głąb tej tkanki, a następnie rozprzestrzenianie się po całym organizmie pacjenta (np. drogą krwi). Wykazana w pracy H-4 zdolność drobnoustrojów do re-modelowania powierzchni hydroksyapatytu jest kolejnym czynnikiem tłumaczącym niską efektywność antybiotyków stosowanych w tym obszarze ciała pacjenta. Uzyskane wyniki wykazują pilną konieczność opracowania i wdrożenia substancji przeciwdrobnoustrojowych zdolnych do przenikania do miejsca zakażenia kości w stężeniach terapeutycznych.

H-5. Junka AF, Szymczyk P, Ziółkowski G, Karuga-Kuźniewska E, Smutnicka D, Bil-Lula I, Bartoszewicz M, Mahabady S, Sedghizadeh P: *Bad to the bone: on in vitro and ex vivo microbial biofilm ability to directly destroy colonized bone surfaces without participation of host immunity or osteoclastogenesis* Public Library of Science One (PLOS One) 2017

Praca H-4 stanowiła dowód istotnej dla zrozumienia patogenezy zakażeń kości koncepcji wykazującej zdolność biofilmów do bezpośredniej degradacji hydroksyapatytu. Celem pracy **H-5** było dostarczenie parametrycznych danych określających zakres analizowanego zjawiska w warunkach *in vitro* odtwarzających te panujące w obrębie tkanki kostnej *in vivo*. Do tego celu w publikacji **H-5** jako powierzchnię do utworzenia biofilmu wykorzystałem nie tylko krążki HA, ale także kości żuchwy szczurów laboratoryjnych (materiał *ex vivo*), a jednym z podłoży użytych przeze mnie do hodowli biofilmu na kościach żuchwy była sztuczna ślina wzbogacona o dodatek sacharozy (jeden z głównych cukrów pokarmowych). Zastosowana metodologia obejmowała skaningową mikroskopię elektronową, spektroskopię dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego EDX (wykorzystałem uprzednio w pracy H-4), a także mikrotomografię komputerową umożliwiającą określenie zmian w geometrii oraz objętości kości na skutek aktywności biofilmów tworzonych przez *S.aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. mutans* oraz biofilm mieszany *C. albicans*+*S.mutans*.

Ocena mikroskopowa oraz posiewy ilościowe wykazały, że wszystkie badane gatunki drobnoustrojów są w stanie utworzyć dojrzałe postacie biofilmu na zastosowanych powierzchniach zawierających hydroksyapatyt. W obrazie mikroskopowym zaobserwowano także liczne zmiany strukturalne na powierzchni hydroksyapatytowej będące efektem rozwoju biofilmu [**Ryc. 4A**], a które morfologicznie przypominały tzw. sekwestry czyli martwiaki kostne [**Ryc. 4B**]. Analiza EDX wykazała, że składają się one z wapnia (22,74%), fosforu (10,64%) oraz tlenu (66,62%). Skład pierwiastkowy analizowanych struktur był zatem silnie zbliżony do składu czystego chemicznie hydroksyapatytu (wapń – 35,84%; fosfor – 18,25%; tlen – 45,91%). pH środowiska reakcji cechowało się wysoką zmiennością w zależności od gatunku tworzącego biofilm, typu powierzchni oraz podłoża mikrobiologicznego, a także od stężenia sacharozy wprowadzonej do sztucznej śliny. Z powodu zaobserwowanej sekwestracji kości wysunąłem hipotezę, że obecność biofilmu przekładać się może na ubytek (masowy i objętościowy) kości oraz na zmianę jej geometrii. W celu parametrycznego potwierdzenia tej hipotezy zastosowałem technikę mikrotomografii komputerowej.



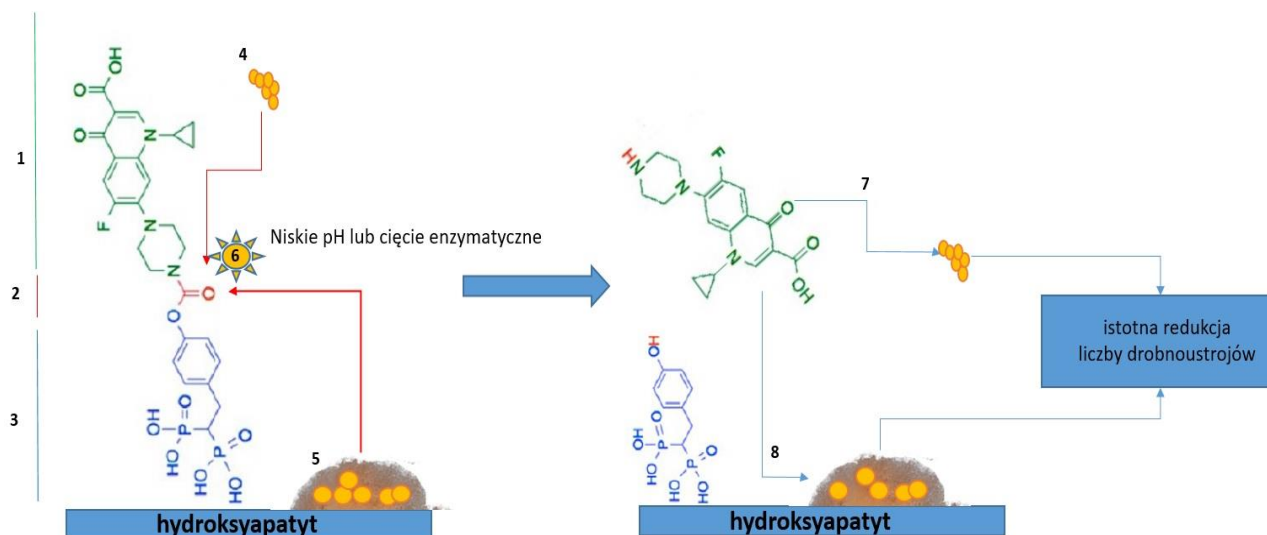
Ryc.4. Zdolność drobnoustrojów rosnących w postaci biofilmu do destrukcji i re-modelowania tkanki kostnej, w tym hydroksyapatytu. **A** - komórki *C. albicans* uszkodzające powierzchnię hydroksyapatytową. Strzałki niebieskie wskazują na zmiany strukturalne (wgłębienia) w powierzchni HA, strzałki zielone – uszkodzone fragmenty HA. **B** – biofilm *P. aeruginosa* pokrywający kość żuchwy szczura. Strzałka niebieska –odłączony od kości fragment o składzie chemicznym wskazującym na zawartość hydroksyapatytu wypchnięty na zewnątrz struktury biofilmu; strzałki czerwone – zniszczone fragmenty kości. **C** - zmiany kształtu kości na skutek aktywności biofilmu *S. aureus* – kolor zielony wskazuje na obszary, które nie uległy istotnej zmianie; kolor niebieski wskazuje na obszary, które uległy zapadnięciu; kolor czerwony wskazuje na obszary, które uległy uwypukleniu. **D** – model mechanizmu prowadzącego do sekwestracji kostnej na skutek aktywności drobnoustrojów. **1** – adhezja drobnoustrojów planktonicznych do powierzchni kości; **2** – tworzenie biofilmu na powierzchni kości; **3** – usuwanie fragmentu kostnego z zagłębienia; **4** – wnikięcie biofilmu w głąb tkanki i postępująca sekwestracja kości. **Rycina powstała przez złożenie Ryc. 7,10,12,13, dołączonej publikacji H-5.**

Analiza kości żuchwy szczurów, pokrytej przez okres 30 dni biofilmem gronkowca złocistego wykazała istotny statystycznie w porównaniu do próbek kontrolnych ubytek objętości wynoszący $20.17 \pm 2.93\%$ ($p < 0.05$, ANOVA) oraz 3-krotnie wyższy średni poziom zmian geometrii kości w porównaniu do jałowej kości inkubowanej przez 30 dni w płynnej pożywce mikrobiologicznej ($98.16 \mu\text{m}$ a $28.5 \mu\text{m}$, odpowiednio) [**Ryc.4C**]. Uzyskane w pracy H-5 wyniki pozwoliły mi na stworzenie modelu wykazującego sposób, w jaki biofilm wnika w głąb kości chroniąc się przed aktywnością układu immunologicznego oraz aktywnością antybiotyków [**Ryc.4D**].

[H-6] Sedghizadeh P, Shuting S, **Junka AF**, Richard E, Sadreraf K, Mahabady S, Bakhshalian N, Tjokro N, Bartoszewicz M, Oleksy M, Szymczyk P, Lundy M, Neighbors J, Russell M, McKenna K, Ebetino FE: *Design, synthesis, and antimicrobial evaluation of a novel bone-targeting bisphosphonate-ciprofloxacin conjugate for the treatment of osteomyelitis biofilms* **Journal of Medicinal Chemistry** 2017 Vol.60 no.6; s.2326-234 (IF: **6.253**; MNiSW: **45 pkt.**)

Dane przedstawione w pracy H-5 wskazują na olbrzymią plastyczność oraz wysoką zdolność adaptacyjną biofilmów wywołujących zakażenia kości oraz konieczność implementacji teorii oraz metodyki analiz biofilmu do projektowania oraz tworzenia skutecznych w zwalczaniu infekcji kości rozwiązań terapeutycznych. Jednym z podstawowych problemów, dla których zdecydowana większość stosowanych klinicznie antybiotyków charakteryzuje się niską skutecznością w zwalczaniu zakażeń tego typu jest ich niska zdolność penetracyjna i niskie powinowactwo do tkanki kostnej. **W publikacji H-6 będącej efektem analiz międzynarodowego zespołu badawczego, do rozwiązania wyżej wzmiankowanego problemu wykorzystano wysokie powinowactwo związków chemicznych – bisfosfonianów do składnika mineralnego kości, hydroksyapatytu.** Bisfosfoniany są stabilnymi chemicznie pochodnymi pirofosforanów, których dwie grupy fosforanowe połączone są wiązaniem estrowym. Co istotne dla omawianych zagadnień, bisfosfoniany, które nie ulegną retencji (związaniu) w układzie kostnym są usuwane z układu krążenia i wydalane wraz z moczem [26]. W badaniu H-6 grupa chemików wchodzących w skład interdyscyplinarnego i wielośrodkowego zespołu badawczego za pomocą metod zaawansowanej syntezy chemicznej zsyntetyzowała koniugat, w którym antybiotyk ciprofloksacyna oraz osteoadsorbcyjny bisfosfonian połączone zostały cząsteczką karbaminianowego łącznika („linkera”) [Ryc. 5]. Wykorzystując wysokie powinowactwo bisfosfonianu do cząsteczek hydroksyapatytu, związek hybrydowy dociera i łączy się z powierzchnią kości. Jak wykazałem w pracy H-4 oraz H-5 obecność biofilmów na powierzchni kości koreluje z wartościami pH odbiegającymi od obojętnego. Prowadzi to do zerwania wiązań tworzonych przez pH-labilny łącznik i uwolnienie się antybiotyku bezpośrednio w miejscu infekcji. W celu potwierdzenia skuteczności koniugatu *in vitro* wykorzystałem modele badawcze stworzone dla potrzeb badań H-4 i H-5 oraz technikę opracowaną przeze mnie specjalnie do celów omawianego projektu, w której sferyczne ziarna hydroksyapatytowe o średnicy 100 µm poddawałem mieszaniu magnetycznemu w zawiesinie zawierającej *S. aureus*, *P. aeruginosa* lub *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (bakteria wywołująca agresywne zapalenia przyzębia) prowadząc do wytworzenia biofilmu na ich

powierzchni. Następnie do środowiska reakcji wprowadzałem koniugat i oceniałem jego aktywność przeciwbiofilmową. W odrębnym układzie eksperymentalnym wprowadzałem koniugat do jałowych mikrobiologicznie ziaren HA, a następnie tak zmodyfikowane powierzchnie wprowadzałem do zawiesin zawierających komórki planktoniczne wybranych gatunków drobnoustrojów.



Ryc.5. Mechanizm aktywności przeciwdrobnoustrojowej koniugatu bisfosfonian-ciprofloksacyna. Składowe koniugatu: **1** – ciprofloksacyna; **2** – łącznik karbaminianowy; **3** – bisfosfonian połączony z hydroksyapatytem. **4,5** – komórki planktoniczne i biofilm tworzony przez drobnoustroj, odpowiednio. **6** – destabilizacja i zerwanie wiązań łączących antybiotyku i bisfosfonian; uwolniona z koniugatu ciprofloksacyna redukuje liczbę drobnoustrojów w formie planktonicznej (**7**) oraz biofilmowej (**8**). **Rycina własna.**

Uzyskane przeze mnie wyniki *in vitro* wykazały w obu układach badawczych wyższą skuteczność koniugatu w porównaniu do macierzystego antybiotyku – ciprofloksacyny. Pozwoliły także na wykazanie, że połączony z antybiotykiem bisfosfonian zachował powinowactwo do hydroksyapatytu. Zaobserwowana niska aktywność przeciwdrobnoustrojowa koniugatu względem biofilmu utworzonego na powierzchni polistyrenowej pozwoliła na wysnucie hipotezy, że cząsteczka ta potrzebuje połączenia z hydroksyapatytem do prawidłowego (założonego) działania przeciwdrobnoustrojowego. Uzyskane przeze mnie wyniki dotyczące aktywności przeciwdrobnoustrojowej koniugatu znalazły odzwierciedlenie w przeprowadzonych (przez prof. Sedghizadeha i wsp. w ramach tego samego projektu) badaniach na modelu zwierzęcym, w którym także wykazano wyższą zdolność koniugatu do redukcji miana bakteryjnego w porównaniu do antybiotyku

macierzystego ciprofloksacyny (**Fig.11 oraz 12 załączonej pracy H-6**). Kolejnym znaczącym osiągnięciem z przeprowadzonego badania, a które wysnuto na podstawie wykonanych przeze mnie badań mikrobiologicznych, było zaobserwowanie faktu, że karbaminianowy łącznik ulega rozerwaniu nie tylko w niskim (jak zakładano) pH, ale także w pH o wartości powyżej 7,0. Biorąc pod uwagę budowę chemiczną łącznika należy zatem założyć, że za zerwanie jego wiązań odpowiedzialne są enzymy drobnoustrojów. **Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w obiecujący kierunek badań, jakim jest celowane dostarczenie leku w miejsce infekcji kości.** W chwili obecnej nasz wielośrodkowy zespół kontynuuje badania nad tymi zagadnieniami, a zespół polski, którego pracą kieruje, przeprowadza testy *in vitro* z wykorzystaniem koniugatów zawierających nowe typy łączników oraz inne niż ciprofloksacyna antybiotyki macierzyste (między innymi tedizolid).

4.4. Podsumowanie

Zakażenia ran oraz kości stanowią poważny problem współczesnej medycyny. Prowadzą do znacznego pogorszenia sprawności fizyczno-ruchowej pacjentów, bólu, spadku statusu socjo-ekonomicznego, a nie leczone w sposób właściwy do poważnych powikłań – amputacji kończyn a nawet śmierci. Wysoka zdolność adaptacyjna biofilmów oraz złożoność procesów zachodzących na skutek interakcji drobnoustrojów z tkankami ciała pacjenta sprawiają, że konieczne jest poszukiwanie wiedzy i metod mogących rozwinąć się w nowe sposoby i schematy diagnostyki i leczenia zakażeń ran oraz kości wywołanych przez drobnoustroje w formie biofilmowej. W pracach wchodzących w skład osiągnięcia wykazałem możliwość wykorzystania wysięku jako materiału diagnostycznego w badaniach metabolicznych służących szybkiemu wykryciu złożonych społeczności drobnoustrojów infekujących rany przewlekłe [praca **H-1**]; zaproponowałem metodę za pomocą której można w sposób powtarzalny, wiarygodny i ekonomicznie opłacalny dokonać wyboru opatrunku w celu usunięcia biofilmu z ran przewlekłych [**H-2**]; wykazałem użyteczność wirującego pola magnetycznego do podnoszenia aktywności bójczej antyseptyków i antybiotyków względem biofilmów tworzących się ranach przewlekłych [**H-3**]; następnie wykazałem, że biofilmy są w stanie dokonywać uszkodzeń w mineralnej składowej kości, hydroksyapatycie [**H-4**], oszacowałem potencjalny rozmiar i znaczenie tego zjawiska dla w patogenezy kości i możliwości eradykacji biofilmu z jej powierzchni [**H-5**], a także wykazałem za pomocą stworzonych przeze mnie modeli badawczych wysoką aktywność przeciwbiofilmową zawierającego bisfosfonian koniugatu zdolnego do łączenia się z kością i uwalniania ze swojej struktury cząsteczki antybiotyku w obecności drobnoustrojów planktonicznych i zadherowanych [**H-6**]. Wyniki prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego służą zatem udzieleniu rozwiązań/odpowiedzi na palące w znaczeniu potrzeby klinicznej problemy dotyczące diagnostyki i leczenia infekcji wywołanych przez biofilmy ran przewlekłych i kości.

5. Piśmiennictwo do części 4 Autoreferatu:

1. Fleming D, Rumbaugh KP. *Approaches to Dispersing Medical Biofilms*. Donelli G, Vuotto C, eds. *Microorganisms*. 2017;5(2):15. doi:10.3390/microorganisms5020015.
2. Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. *Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control*. *J Med. Microbiol* 2015;64:323-334
3. Li Y-H, Tian X. *Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms*. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2012;12(3):2519-2538. doi:10.3390/s120302519.
4. Wu H, Moser C, Wang HZ, Hoiby N, Song ZJ. *Strategies for combating bacterial biofilm infections*. *Int J Oral Sci* 2014;7: 1-7
5. Omar A, Wright JB, Schultz G, Burrell R, Nadworny P. *Microbial Biofilms and Chronic Wounds*. Donelli G, Vuotto C, eds. *Microorganisms*. 2017;5(1):9. doi:10.3390/microorganisms5010009.
6. Järbrink K, Ni G, Sönnergren H, et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review. *Systematic Reviews*. 2017;6:15. doi:10.1186/s13643-016-0400-8.
7. Attinger C, Wolcott R. *Clinically Addressing Biofilm in Chronic Wounds*. *Adv Wound Care*. 2012;1(3):127-132. doi:10.1089/wound.2011.0333.
8. Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, Wolcott BM, Gogokhia L, Costerton JW, Dowd SE. *Chronic wounds and the medical biofilm paradigm*. *J Wound Care* 2010;19(2):45-53
9. Zapotoczna M, O'Neill E, O'Gara JP (2016) *Untangling the Diverse and Redundant Mechanisms of Staphylococcus aureus Biofilm Formation*. *PLoS Pathog* 12(7): e1005671. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005671>
10. Metcalf DG, Bowler PG. *Biofilm delays wound healing: A review of the evidence*. *Burns & Trauma*. 2013;1(1):5-12. doi:10.4103/2321-3868.113329.
11. Weledji EP, Fokam P. *Treatment of the diabetic foot – to amputate or not?* *BMC Surgery*. 2014;14:83. doi:10.1186/1471-2482-14-83.
12. Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. *Microbial biofilms in osteomyelitis of the jaw and osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy*. *J Am Dent Assoc*. 2009; 140:1259-65
13. Panteli M, Giannoudis PV. *Chronic osteomyelitis: what the surgeon needs to know*. *EFORT Open Reviews*. 2016;1(5):128-135. doi:10.1302/2058-5241.1.000017.
14. World Health Organization, Meeting Report on Trauma Care 2009: http://www.who.int/emergencycare/trauma/global_forum_meeting_report.pdf
15. Zimny D, Szatkowska M, Połubok J, Maciaszek J, Machaj M, Barg E. *The use of metabolomics in medicine - some examples of oncological and metabolic diseases*. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*. 2015;20(2):55-62. doi: 10.18544/PEDM-20.02.0003.
16. Spear M. *Wound exudate--the good, the bad, and the ugly*. *Plast Surg Nurs*. 2012; 32:77-9. doi: 10.1097/PSN.0b013e318256d638.

17. Ammons MCB, Tripet BP, Carlson RP, et al. *Quantitative NMR Metabolite Profiling of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Discriminates between Biofilm and Planktonic Phenotypes*. J Proteome Res. 2014;13(6):2973-2985. doi:10.1021/pr500120c.
18. Jawień A, Bartoszewicz M, Przondo-Mordarska A, Szewczyk MT, Kaszuba A, Urbanek T, Staszkievicz W, Sopata M, Kuchrzewski M, Korzon-Burakowska A, Krasowski G, Kózka M, Sikorski J, Junka A. *Wytyczne postępowania miejscowego i ogólnego w ranach objętych procesem infekcji*. Leczenie Ran 2012;9(3):59–75
19. Junka A, Bartoszewicz M, Smutnicka D, Secewicz A, Szymczyk P. *Efficacy of antiseptics containing povidone-iodine, octenidine dihydrochloride and ethacridine lactate against biofilm formed by Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus measured with the novel biofilm-oriented antiseptics test*. Int Wound J. 2014 Dec;11(6):730-4. doi: 10.1111/iwj.12057.
20. Koburger T, Hubner NO, Braun M, Siebert J, Kramer A. *Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP–iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate*. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 1712–1719
21. Müller G, Kramer A. *Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity*. J Antimicrob Chemother. 2008;61(6):1281-7.
22. Nawrotek P, Fijałkowski K, Struk M, Kordas M, Rakoczy R. *Effects of 50 Hz rotating magnetic field on the viability of Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Electromagn Biol Med. 2014 Jan;33:29-34.
23. Story G, Kordas M, Rakoczy R. *Analysis of a mixing process induced by a rotating magnetic field by means of the dimensional analysis*. Tech Transl. 2014: <https://suw.biblos.pk.edu.pl/downloadResource&mId=1467245>
24. Assis S, Keenleyside A, Santos AL, Cardoso FA. *Bone Diagenesis and its Implication for Disease Diagnosis: The Relevance of Bone Microstructure Analysis for the Study of Past Human Remains*. Microsc Microanal. 2015 Aug;21:805–25
25. Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S, Nair SP. *Invasion of bone cells by Staphylococcus epidermidis*. Microbes Infect. 2007 Apr;9(4):460–5.
26. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. *Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice*. Mayo Clin Proc. 2008;83(9):1032-1045.

6 . Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

6. 1. Analiza dorobku naukowego niewchodzącego w skład osiągnięcia

Poza pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia habilitacyjnego jestem także autorem lub współautorem:

- 48 prac oryginalnych, w tym **31** prac z ministerialnej listy „A” czasopism punktowanych. W **10** z nich jestem **pierwszym autorem**, a w **5** z nich jestem **drugim autorem**.
- Jestem także autorem **17** prac doświadczalnych opublikowanych w czasopismach z ministerialnej listy „B” czasopism punktowanych (posiadających pkt. MNiSW).
- Ponadto, jestem autorem 26 prac przeglądowych/poglądowych, w tym **25** z ministerialnej listy „B” czasopism punktowanych (w 14 z nich autorem **pierwszym/korespondencyjnym**, a także **1** pracy przeglądowej opublikowanej w czasopiśmie z listy ministerialnej A, *Frontiers in Pharmacology* (IF=3,831).
- Jestem także autorem 2 rozdziałów w monografiach oraz **57** streszczeń zjazdowych międzynarodowych (**14**) i krajowych (**37**) opublikowanych w formie abstraktów lub suplementów w czasopismach z listy ministerialnej A oraz B

Liczba punktów MNSiW i Impact Factor uzyskanych za **prace niewchodzące** w skład osiągnięcia naukowego opisanego w pkt.4 autoreferatu to:

a) przed doktoratem:

322 pkt. MNiSW; Impact Factor = **13,646**

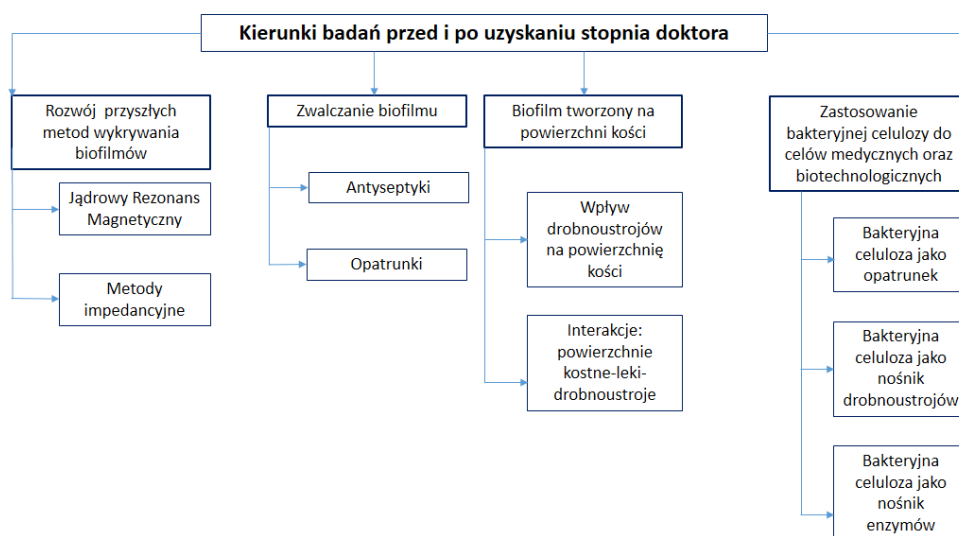
b) po doktoracie:

654 pkt. MNiSW; Impact Factor = **47, 05**



6.2. Kierunki badań naukowych w dotychczasowej działalności naukowej niewchodzące w skład osiągnięcia

Tematyka moich badań, które nie wchodzi w skład osiągnięcia habilitacyjnego, oscyluje wokół zakażeń związanych z obecnością biofilmu, sposobami ich wykrywania, zapobiegania oraz usuwania. Główne nurty badań przedstawiłem w sposób obrazowy na Rycinie 6, a opisałem szczegółowo w pkt. 6.2.1 oraz 6.2.2



Ryc.6. Główne kierunki badań niewchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego. Rycina własna.

6.2.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora:

Początek mojej drogi naukowej wiąże się z podjęciem pracy w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w roku 2008, kiedy zostałem włączony do pracy zespołu dr n. med. (obecnie dr hab.n.med.) Marzenny Bartoszewicz. Początkowo wykonywałem badania molekularne, takie jak łańcuchowa reakcja polimerazy PCR i elektroforeza w pulsującym polu elektrycznym PFGE (ang. Pulse Field Gel Electrophoresis) w ramach analiz służących wykrywaniu szpitalnych ognisk epidemiologicznych [1, 2] oraz diagnostyki istotnych klinicznie patogenów [3, 4] lub ich czynników zjadliwości [5]. Badania tego typu wykonywałem także w późniejszym czasie [6, 7, 8, 9], jednak kontakt z klinicystami pracującymi we wrocławskich szpitalach uświadomił mi znaczenie oraz rolę, jaką odgrywają w patogenezie zakażeń biofilmy tworzone przez drobnoustroje. Postanowiłem dlatego skupić się na zagadnieniach szybkiego wykrywania oraz zapobiegania infekcjom związanym z obecnością biofilmu (a wraz z upływem lat zawęziłem tematykę swoich prac badawczych do analiz związanych z obecnością biofilmu w ranach oraz kościach). Zainspirowany danymi wykazującymi, że usunięcie dojrzałego biofilmu z ciała pacjenta jest zadaniem obarczonym wysokim ryzykiem niepowodzenia terapeutycznego oraz wystąpienia niepożądanych efektów ubocznych, wziąłem udział w badaniach mających na celu określenie aktywności przeciwbiofilmowej peptydów Camel oraz Citropina względem biofilmów tworzonych przez drobnoustroje izolowane z kieszonek zębowych. Wyniki tych prac wykazały niezwykle wysoką tolerancję bakteryjnego biofilmu na zastosowane środki [10,11]. Podobne rezultaty uzyskane zostały w pracach dotyczącej wpływu makrolidów na biofilm *Klebsiella pneumoniae* [12,13]. Zespół, którego byłem członkiem, przeprowadził następnie badanie mające na celu poznanie przyczyn wysokiej oporności biofilmu *K. pneumoniae* tworzonych na różnego rodzaju cewnikach na stosowane klinicznie środki przeciwdrobnoustrojowe. Wyniki wykazały, że zdolność *K. pneumoniae* do tworzenia biofilmu na cewnikach w większym stopniu zależy od rodzaju powierzchni cewnika niż od, jak uprzednio sądzono, typu posiadanych przez nie fimbrii [14]. Kolejne zadanie badawcze, w którym brałem udział, w dużym mierze wpłynęło na ukształtowanie moich późniejszych zainteresowań naukowych. Dotyczyło ono zastosowania nowoczesnego antyseptyku, dichlorowodoru oktenidyny, w leczeniu infekcji mięśniowo-szkieletowych. Uzyskane rezultaty wskazywały na wysoką skuteczność tego miejscowo działającego środka przeciwdrobnoustrojowego na czynniki etiologiczne wyżej wzmiankowanych typów zakażeń [15]; podobne rezultaty – wysoką aktywność

przeciwbiofilmową dichlorowodorku oktenidyny w porównaniu do innych antyseptyków uzyskane zostały względem biofilmów *K. pneumoniae* [16], gronkowców koagulazo-ujemnych [17], gronkowców złocistych i *P. aeruginosa* izolowanych z ran przewlekłych [18, 19].

Dzięki mojemu udziałowi w wyżej przytoczonych pracach badawczych dotyczących aktywności przeciwbiofilmowej antyseptyków, w roku 2012 zostałem włączony do Grupy Eksperckiej Polskiego Towarzystwa Leczenia Ran. Efektem pracy grupy było opublikowanie ogólnopolskich wytycznych postępowania miejscowego oraz ogólnego w ranach objętych procesem infekcji [20]. Opracowanie danych piśmiennictwa oraz kontakt z klinicystami po raz kolejny uświadomił mi, że konieczne jest wdrożenie nowych metod diagnostyki biofilmu – zanim osiągnie on swoją dojrzałą, niezwykle ciężką do usunięcia, postać. Efektem moich badań była praca, w której wykazałem przydatność komercyjnie dostępnego aparatu xCelligence do wykrywania tworzenia biofilmu w czasie rzeczywistym. Składający się z elektrod czujnik aparatu wykrywa zakłócenia pola elektrycznego, których powodem jest obecność cząstek różnej etiologii w zawieszynie (zjawisko impedancji elektrycznej). Założyłem i wykazałem, że aparat xCelligence może być wykorzystywany do monitorowania tworzenia biofilmu gronkowca złocistego [21]. Praca, którą opublikowałem, pozwoliła na wykorzystanie aparatu xCelligence do analiz związanych z biofilmem także przez inne grupy badawcze. Była to także moja pierwsza, posiadająca współczynnik wpływu, praca, w której byłem pierwszym autorem.

W innym artykule, którego tematyka również dotyczyła przyszłych narzędzi służących szybkiemu wykrywaniu biofilmu, wykorzystałem do tego celu technikę Magnetycznego Rezonansu Jądrowego. Wykazałem wraz z zespołem Katedry Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej, że za jego pomocą możliwe jest wykrycie, w ciągu kilku godzin od momentu pobrania próbki, obecności specyficznych dla biofilmu gronkowca złocistego metabolitów - zarówno wydzielanych na zewnątrz komórek bakteryjnych (footprint metaboliczny), jak i tych znajdujących się w ich wnętrzu (fingerprint metaboliczny) [22].

W roku 2012 nawiązałem współpracę z innym zespołem z Politechniki Wrocławskiej, który pod kierunkiem dr Patrycji Szymczyk zajmował się projektowaniem i wytwarzaniem struktur materiałowych mających znaleźć zastosowanie jako nowoczesne implanty kostne. W roku 2013, jako drugi autor pracy wykazałem, że oczyszczenie uzyskanej powierzchni tytanowo-glinowo-niobowej implantu kwasem azotowym i fluorowodorem (jest to standardowa procedura postprodukcyjna mająca na celu usunięciu drobnych ziaren stopu z biomateriału) przekłada się na zmniejszenie zdolności gronkowca złocistego

(który jest głównym czynnikiem etiologicznym infekcji związanych z obecnością implantu oraz głównym czynnikiem etiologicznym infekcji kości) do tworzenia biofilmu na analizowanych powierzchniach [23]. Współpraca ze wzmiankowanym zespołem badawczym dała mi możliwość wytwarzania i wykorzystywania do analiz struktur hydroksyapatytowych (min. krążków o wysokiej gładkości, które służyły jako powierzchnia do formowania się biofilmu w szeregu moich późniejszych prac, w tym **H-4**, **H-5**, **H-6**, włączonych do osiągnięcia habilitacyjnego). W roku 2013 opublikowałem (jako drugi autor) pracę dotyczącą efektu wywieranego przez pamidronat (lek przeciwko osteoporozie) na zdolność drobnoustrojów do tworzenia biofilmu na hydroksyapatycie [24]. Wraz z dr hab., lek.med. Marcinem Kosem wykazaliśmy za pomocą analiz *in silico* (modelowanie molekularne), mikrobiologicznych (hodowla biofilmów na krążkach hydroksyapatytowych), analiz obrazujących (mikroskopia elektronowa) istotnie wyższą zdolność *S. aureus* i *P. aeruginosa* do tworzenia biofilmu na hydroksyapatycie zawierającym pamidronat w porównaniu do hydroksyapatytu nie zawierającego bisfosfonianu. Przyczyną wzmiankowanej różnicy była budowa pamidronatu, którego cząsteczka zawierająca aktywne chemicznie reszty wystaje z powierzchni tworzonej przez hydroksyapatyt dostarczając bakteriom dodatkowych miejsc umożliwiających im adhezję i silne przyleganie do powierzchni. Wyniki naszych badań rzucały nowe światło na jednostkę chorobową określaną mianem martwicy żuchwy wywołanej przez stosowanie bisfosfonianów (ang. Bisphosphate-Related Osteonecrosis of Jaw, BROJ). Do chwili obecnej nasza praca była cytowana 20 razy przez autorów publikujących wyniki swoich badań w międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku wpływu. Należy nadmienić, że w trakcie przeprowadzonych badań [24] zaobserwowałem liczne zjawiska i interakcje między drobnoustrojami a hydroksyapatytem, które analizowałem następnie w pracach **H-4**, **H-5** włączonych do cyklu habilitacyjnego. Opublikowanie wyników tych prac zwróciło uwagę zespołu z University of South California i przyczyniło się do włączenia mnie do projektu, który zaowocował najistotniejszą z punktu widzenia naukowego i aplikacyjnego z moich prac, czyli **H-6**.

Pół roku później obroniłem pracę doktorską [25].

W czasie przed obroną pracy doktorskiej, byłem autorem prac nie tylko doświadczalnych, ale także przeglądowych w języku polskim, mających na celu przybliżyć Czytelnikom zagadnienia związane min. z antyseptyką ran przewlekłych objętych procesem infekcyjnym wywołanym przez drobnoustroje w formie biofilmowej [26,27] oraz z zasadami prawidłowego cewnikowania moczowego [28], płynoterapii [29], czy z powikłaniami w antybiotykoterapii [30,31]. Zwieńczeniem moich ambicji popularyzatorskich było w tym

czasie uzyskanie drugiej nagrody z rąk Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w konkursie Forum Akademickiego „Skomplikowane i proste” za artykuł popularno-naukowy dotyczący prowadzonych przeze mnie badań [32].

6.2.3. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

W roku 2014 zostałem asystentem, a w roku 2015 adiunktem w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. W tym czasie zdałem sobie sprawę z konieczności stworzenia prostego w wykonaniu testu *in vitro* mogącego określić przydatność stosowanych szpitalnie i pozaszpitalnie antyseptyków w zwalczaniu biofilmów tworzonych przez drobnoustroje izolowane z ran przewlekłych. Stworzyłem więc test, który nazwałem B.O.A.T. (ang. Biofilm-Oriented Antiseptic Test). Jego zaletą jest wysoka powtarzalność uzyskanych wyników oraz możliwość przeprowadzenia w każdym laboratorium mikrobiologicznym, nawet takim, które nie dysponuje zaawansowanym sprzętem badawczym. Do wykonania testu B.O.A.T. potrzebne są jedynie standardowe mikrotitracyjne płytki 96-dołkowe, pipeta automatyczna, tani oraz powszechnie stosowany barwnik, jakim jest chlorek tetrazoliowy przekształcający się w obecności żywych drobnoustrojów do czerwonego formazanu oraz standardowe płynne pożywki mikrobiologiczne. Zasadę działania oraz przykład zastosowania testu B.O.A.T. opublikowałem w prestiżowym *International Wound Journal*. Do chwili obecnej praca doczekała się 12 cytowań w czasopiśmie z współczynnikiem wpływu oraz cytowań w polskich czasopiśmie z listy ministerialnej B [33].

Po obronie doktoratu nie ustawała moja współpraca z zespołem dr Patrycji Szymczyk z Politechniki Wrocławskiej wraz z którym opublikowaliśmy szereg prac dotyczących właściwości mechanicznych (wytrzymałość mechaniczna, porowatość), mikrobiologicznych (zdolność drobnoustrojów do tworzenia biofilmu na powierzchni implantów) oraz biologicznych (ocena cytotoksyczności względem osteoblastów i fibroblastów) nowo projektowanych i wytwarzanych biomateriałów, głównie stopów magnezu oraz tytanu, niobu i glinu [34, 35, 36, **odpowiednio**].

Kontynuowałem także pracę nad zastosowaniem antyseptyków i opatrunków w leczeniu zakażonych ran przewlekłych. Wszedłem między innymi w skład zespołu przeprowadzającego badanie kliniczne na pacjentach cierpiących od infekcji owrzodzeń goleni leczonych opatrunkiem zawierającym dichlorowodorek oktenidyny. Uzyskane wyniki wykazały wyższe tempo gojenia o oraz szybszą redukcję miana drobnoustrojów

zasiedlających/infekujących owrzodzeń goleni w porównaniu do analogicznych parametrów w grupie kontrolnej, którą stanowili pacjenci leczeni standardowo stosowanymi opatrunkami [37]. Brałem także udział w badaniach *in vitro* nad porównaniem skuteczności antyseptyków do zwalczania biofilmu tworzonego przez gronkowce CNS [38], *P. aeruginosa* [39], *Enterococcus faecalis* [40], *K. pneumoniae* [41]. Przydatnym z punktu widzenia klinicystów wynikiem płynącym z wyżej wzmiankowanych badań było wykazanie znikomej skuteczności antyseptyków zawierających mleczan etakrydyny względem biofilmów badanych gatunków drobnoustrojów oportunistycznych.

Po obronie doktoratu kontynuowałem także badania nad zastosowaniem spektrometrów impedancyjnych do wykrywania tworzenia się biofilmu w czasie rzeczywistym. Ograniczeniem opisywanego już [21] zastosowania aparatu impedancyjnego xCELLigence był brak dostępu do jego oprogramowania oraz wąski zakres częstotliwości przez niego wykorzystywany. W roku 2015 wraz z dr inż. Konradem Chabowskim wykazałem wysoką przydatność skonstruowanego na Politechnice Wrocławskiej aparatu impedancyjnego do monitorowania *in vitro* wzrostu biofilmu *P. aeruginosa* w całym analizowanym spektrum częstotliwości [42], a w roku 2017, że tanie czujniki wykonane w technologii PCB (ang. printed circuit board) nadają się do tego celu lepiej niż czujniki wykonane w technologii LCCC (ang. low temperature co-fired ceramics), co ma duże znaczenie dla potencjalnej aplikacji wzmiankowanej technologii w przemyśle medycznym czy biotechnologicznym [43]. Kontynuowałem także badania nad szybką diagnostyką biofilmu - wziąłem min. udział w prowadzonych przez dr inż. Adama Ząbka z Politechniki Wrocławskiej badaniach dotyczących metabolomu tworzonego przez grzyb z rodzaju *Aspergillus*, które pozwoliły na określenie profilu metabolitów wydzielanych przez ten drobnoustrój w formie biofilmowej, co stanowi podwalinę pod kolejne analizy mające na celu identyfikację potencjalnych biomarkerów zakażenia związanego z obecnością biofilmu *Aspergillus* [44].

Nie ustawały także moje badania prowadzone z dr hab. lek.med. Marcinem Kosem nad wpływem bisfosfonianów na zwiększenie zdolności drobnoustrojów do tworzenia biofilmu na hydroksyapatycie kostnym. Badanie z roku 2015 pogłębiło analizę wzmiankowanego zjawiska o kolejne drobnoustroje, w tym *S. mutans* – bakterię odpowiedzialną za próchnicę zębów. Badanie zostało wykonane w zaprojektowanym przeze mnie układzie przepływowym, którego zastosowanie miało na celu wykazanie podwyższonej siły adhezji drobnoustrojów do zmodyfikowanego bisfosfonianami (tym razem oprócz pamidronatu, użyto także klodronatu i zoledronatu) hydroksyapatytu w porównaniu do hydroksyapatytu niezmodyfikowanego. Wyniki wykazały, że adhezja drobnoustrojów zwiększona jest najsilniej w obecności

pamidronatu, co związane jest z obecnością w tym leku uprotonowanej reszty aminowej (której brak w kłodronacie i zoleodronacie), a która łącząc się dwoma dodatkowymi wiązaniami z hydroksyapatytem tworzy silny punkt przyczepu (do struktur powierzchniowych bakterii pamidronat łączy się za pomocą reaktywnej części o ładunku kationowym) [45].

Po zmianie miejsca pracy z Katedry Mikrobiologii Lekarskiej na Katedrę Mikrobiologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego brałem także udział w badaniach dotyczących aktywności mikrobiologicznej i cytotoksyczności nowych pochodnych 6-fenylo-1h-pyrrolo [34-c] pirydino-1,3-dionu oraz etylowanego kwasu askorbinowego [46, 47, odpowiednio].

Poszukując nowych środków służących zapobieganiu i zwalczaniu infekcji wywołanych przez biofilm bakteryjny, podjąłem się próby znalezienia biomateriału mogącego służyć jako zarówno opatrunek na rany przewlekłe, jak i osłona dla kości zapewniająca ochronę przed drobnoustrojami i stymulująca proces odbudowy tkanki kostnej oraz przyrannej. Przeprowadzona przeze mnie analiza piśmiennictwa wykazała, że najbardziej obiecującym polimerem mogącym służyć wyżej wymienionym zastosowaniom jest, produkowana przez niepatogenny gatunek bakterii *Komagateibacter xylinum*, nano-celuloza (należy zaznaczyć, że bakteryjna celuloza jest *de-facto* macierzą biofilmową *K.xylinum*). Ten polimer tworzący kilu-kilkunastomilimetrowej grubości maty, po usunięciu z niego komórek bakterii, cechuje się wysoką zdolnością do absorpcji wysięku, biogodnością i niską cytotoksycznością a także wysoką elastycznością mogącą służyć zarówno jako opatrunek na rany, jak i w charakterze okładziny na kości. Wykazałem, w pracy opublikowanej w czasopiśmie *Carbohydrate Polymers* [48], zależność między określonymi sposobami usuwania komórek z bakteryjnej celulozy a jej cytotoksycznością względem komórek kościotwórczych (osteoblastów) oraz komórek odpowiadających za gojenie się rany (fibroblastów), a także poziomem wzbudzenia komórek makrofagowych. Wykazałem, że określone typy oczyszczenia prowadzą do uzyskania celulozy cechującej się niezwykle niską cytotoksycznością oraz niepobudzającej makrofagów do produkcji reaktywnych form tlenu (ROS). Odkrycie to znaleźć może zastosowanie w wytwarzaniu komercyjnie dostępnych opatrunków na rany, szczególnie u pacjentów z osłabionym układem odpornościowym [48]. We współpracy z zespołem dr hab. Karola Fijałkowskiego z Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego przeprowadziłem także badania nad tworzeniem bakteryjnej celulozy w obecności wirującego pola magnetycznego WPM. Badania prowadzone w ramach projektu NCBiR Lider5, wykazały, że jego zastosowanie przekłada się na uzyskanie polimeru cechującego się znacznie korzystniejszymi (w porównaniu do celulozy hodowanej w standardowych

warunkach) właściwościami predysponującymi je do stosowania min. w leczeniu oraz profilaktyce zakażeń kości oraz ran [49, 50, 51, 52].

Wykazaliśmy także, że bakteryjna celuloza służyć może jako nośnik dla czwartorzędowych soli amoniowych i być wykorzystana jako skuteczny opatrunek służący eradykacji gronkowców – *Staphylococcus epidermidis* i *S. aureus* [53]. Dodatkowo, brałem udział w badaniach, w których wykazano, że bakteryjna celuloza może stanowić odpowiedni nośnik dla lakazy, enzymu stosowanego między innymi w przemyśle biotechnologicznym, kosmetycznym oraz farmaceutycznym [54]. Pewnym ograniczeniem w stosowaniu bio-celulozy w przemyśle są stosunkowo wysokie koszty jej utrzymania. W roku 2018 wraz z prowadzonym przez dr hab.inż. Karola Fijałkowskiego zespołem wykazaliśmy, że modyfikacja medium hodowlanego 1% dodatkiem olejów roślinnych prowadzi do uzyskania 500% wyższej masy celulozy w jednym cyklu produkcyjnym w porównaniu do celulozy uzyskanej w tradycyjnym medium. Opierając się na uzyskanych wynikach zaproponowaliśmy wyjaśnienie tego zjawiska, które według nas opiera się na złożonej interakcji między cyklem rozwojowym bakterii *K. xylinus* a oddziaływaniami fizyko-chemicznymi zachodzącymi między utworzoną celulożą a ścianami zbiornika hodowlanego [55].

Podobnie, jak przed obroną doktoratu, także i po niej, byłem autorem głównym oraz współautorem prac przeglądowych mających przybliżyć Czytelnikom zagadnienia związane z skutecznością antyseptyków stosowanych w różnych obszarach ciała pacjenta [56, 57, 58,59, 60, 61], biofilmu w ortopedii [62, 63], zastosowań bakteryjnej celulozy [64, 65, 66], oporności drobnoustrojów na antybiotyki [67, 68, 69], zastosowania metabolomiki do wykrywania biofilmów [70] czy wykorzystania substancji aktywnych syntetyzowanych przez rośliny w terapii zakażeń [71].

7. Podsumowanie zbiorcze

Za opisane powyżej osiągnięcia naukowe zostałem dwukrotnie uhonorowany nagrodami indywidualnymi pierwszego stopnia JM Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu i trzykrotnie przez Dziekan Wydziału Farmaceutycznego za wyróżniające się osiągnięcia naukowe w grupie adiunktów. Moje doświadczenia naukowe znalazły również uznanie w międzynarodowym i krajowym środowisku naukowym, o czym mogą świadczyć zaproszenia do sporządzania recenzji publikacji w takich prestiżowych czasopismach, jak *Material & Design*, *BMC Microbiology*, *Wound Repair and Regeneration*, *PLOS ONE*, *Therapeutic Delivery*, *Materials*, *Microbial Pathogenesis*, *Brazilian Journal of Microbiology*, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, *Polish Journal of Microbiology*.

Wyniki badań i doświadczenie związane z eradykacją biofilmów tworzonych przez drobnoustroje patogenne, wykorzystuję obecnie w rozpoczętym w roku 2018 projekcie OPUS finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki: *Analiza mechanizmów zwiększonej efektywności substancji przeciwdrobnoustrojowych względem biofilmu w obecności wirującego pola magnetycznego*. Żywię nadzieję, że poznanie wyżej wzmiankowanych mechanizmów pozwoli w dalszej perspektywie na poprawę stanu zdrowia pacjentów cierpiących na skutek aktywności biofilmów tworzących się w patogenezie zakażeń ran przewlekłych i kości.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
FARMACEUTYCZNEJ I PARAZYTOLOGII
Adiunkt

dr n. med. Adam Junka

8. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego habilitanta

a) mój dorobek naukowy obejmuje łącznie 80 publikacji, z czego **31** przypada na okres przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora, a **49** po jego uzyskaniu.

b) jestem współautorem 1 patentu krajowego i 1 krajowego zgłoszenia patentowego.

c) na mój dotychczasowy dorobek składa się (**szczegółowe dane przedstawione są w Załącznikach 3a, 3b, 3c**) :

- 54 oryginalnych prac twórczych, w tym 37 w czasopismach z listy JCR oraz 17 spoza listy JCR,

- 26 artykułów przeglądowych, w tym 1 w czasopiśmie z listy JCR,

- 52 doniesień i komunikatów na konferencyjnych krajowych i zagranicznych,

- 1 przyznany patent krajowy,

- 1 krajowe zgłoszenie patentowe (wysłane do Urzędu Patentowego),

d) wartość bibliometryczna dorobku - suma punktów MNiSW za publikacje według wykazu czasopism naukowych MNiSW, zgodna z rokiem ukazania się pracy – **1176**

- **przed obroną doktoratu: 322**

- **po obronie doktoratu: 854**

e) sumaryczny IF zgodny z rokiem ukazania się prac = **80,001**

- **przed obroną doktoratu: 13,646**

- **po obronie doktoratu: 66,364**

Liczba cytowań moich prac (bez autocytowań) według Web of Science wynosi: **151**

według bazy Scopus: 200

Średnia liczba cytowań prac, których jestem autorem: 4,47/praca

Indeks Hirscha moich prac według Web of Science wynosi: **7**

według bazy Scopus: 8

9. Piśmiennictwo do części 6 autoreferatu:

Prace opublikowane przed obroną doktoratu

1. Kasprzykowska U, Mączyńska B, Szufnarowski K, Smutnicka D, Czyżewska M, Przondo-Mordarska A, **Junka A**. *Kryteria analizy i zasady postępowania w przypadku ogniska epidemicznego Klebsiella na oddziałach noworodkowych*. Post.Neonatol. 2008; 2:71-75
2. Bartoszewicz M, Mączyńska B, **Junka A**, Dalkowski P, Balicka S. *The analysis of epidemic outbreak of Staphylococcal Scalded Skin Syndrome caused by MSSA on neonatologic ward*. Pediatr.Pol. 2009; 84: 557-561
3. Mączyńska B, Bartoszewicz M, Kasprzykowska U, Sozańska B, **Junka A**. *Comparison of the detectability of Mycoplasma pneumoniae infection in children using PCR and serological methods: indirect immunofluorescence and enzyme immunoassays*. Adv.Clin.Exp.Med. 2009;18(4): 337-344
4. Mączyńska B, Skrzypek A, Kasprzykowska U, Morawska-Kochman M, Zalesska-Kręcicka M, Janczura A, **Junka A**, Bartoszewicz M. *Investigation of Mycoplasma pneumoniae in the upper respiratory tracts of children operated for adenoid hypertrophy*. Adv.Clin.Exp.Med. 2009;18(5): 487-492
5. Janczura A, Mączyńska B, Kasprzykowska U, Smutnicka D, Przondo-Mordarska A, **Junka A**, Mokracka-Latajka G. *Presence of enterotoxin genes in Klebsiella strains isolated from children with diarrhea*. Adv.Clin.Exp.Med 2009;8(3): 283-290
6. Kübler-Kiełb J, Vinogradova E, Ng W-I, Mączyńska B, **Junka A**, Bartoszewicz M, Zelazny A, Bennett J, Schneerson R: *The capsular polysaccharide and lipopolysaccharide structures of two carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae outbreak isolates*. Carbohydr.Res 2013;369:6-9
7. Janczura A, Smutnicka D, **Junka A**, Gościński G: *The detection and expression of enterotoxin encoding lth gene among Klebsiella spp. isolated from diarrhea*. Cent.Eur.J.Biol. 2013; 8(2):121-129
8. Mączyńska B, Neumann K, **Junka A**, Smutnicka D, Secewicz A, Bartoszewicz B, Wójkowska-Mach J, Sękowska A, Gospodarek E, Burdynowski K: *Analiza cech warunkujących selekcję i przeżywalność w środowisku szpitalnym u szczepów Klebsiella izolowanych z ognisk epidemicznych*. Forum Zakaż. 2013;4(2): 77-97
9. Johnson JR, Clermont O, Johnston B, Clabots C, Tchesnokova V, Sokurenko E, **Junka AF**, Mączyńska B, Denamur E. *Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within Escherichia coli sequence type 131*. J.Clin.Microbiol. 2014; 52 (5): 1358-1365
10. Bartoszewicz M, Smutnicka D, Junka A, Kamysz E, Mączyńska B, Kamysz W: *Aktywność bakteriobójcza dichlorowodorku oktenidyny i syntetycznych peptydów: citropiny 1.1, Camel, Palm-KK w stosunku do tworzącej biofilm tlenowej flory izolowanej z kieszonek zębowych - doniesienie wstępne*. Sepsis 2009;2(4): 233-235
11. Kittel L, Kamysz E, Bartoszewicz M, Junka A, Smutnicka D, Mączyńska B, Kamysz W, Kittel M.: *Biofilm infekcyjny i płytki bakteryjne w zapaleniu przyzębia i tkanek okołowierzchołkowych: procedury zabiegowe i okołozabiegowe ograniczające rekolonizację - wyniki badań*. Sepsis 2009;2(4): 237-240

12. Mączyńska B, Smutnicka D, **Junka A**, Janczura A, Bartoszewicz M. *Wpływ makrolidów na tworzenie biofilmu u pałeczek z rodzaju Klebsiella*. Sepsis 2009;2(4): 231-232
13. Mączyńska B, Kania A, **Junka A**, Smutnicka D, Bartoszewicz M, Janczura A, Nowicka J, Secewicz A, Kondak K.: *Wpływ erytromycyny na tworzenie biofilmu przez kliniczne szczepy Klebsiella na cewnikach moczowych*. Sepsis 2010;3(5): 323-332
14. Mączyńska B, Smutnicka D, Przondo-Mordarska A, Bartoszewicz M, Junka A, Janczura A, Nowicka J. *Biofilm formation by clinical Klebsiella strains expressing various types of adhesins on catheters made of different materials*. Adv.Clin.Exp.Med 2010;19(4): 443-453
15. Krzemiński M, Bartoszewicz M, Czarniak E, Gregorowicz-Warpas D, Mączyńska B, Junka A. *The use of octenidine dihydrochloride in the treatment of musculoskeletal infections* Adv.Clin.Exp.Med. 2010;19(5): 631-636
16. Bartoszewicz M, Junka A, Smutnicka D.: *Wrażliwość klinicznych szczepów Klebsiella pneumoniae na antyseptyki stosowane w leczeniu ran*. Forum Zakaż 2011;2(4): 121-127
17. Bartoszewicz M, **Junka A**, Smutnicka D, Mączyńska B, Janczura A, Nowicka J, Secewicz A. *Skuteczność wybranych antyseptyków badana in vitro oraz w warunkach imitujących środowisko rany w stosunku do szczepów CNS izolowanych z zakażeń ran przewlekłych*. Leczenie Ran 2011;8(1): 21-27
18. Bartoszewicz M, **Junka A**. *Mikrobiologiczna opieka nad raną skolonizowaną i zagrożoną infekcją*. Zakażenia 2011;2:100-106
19. Bartoszewicz M, Junka A, Smutnicka D, Secewicz A, Mączyńska B, Szymczyk P, Nowicka J, Neuman K. *Porównanie skuteczności przeciwdrobnoustrojowej antyseptyków zawierających oktenidynę i etakrydynę względem biofilmu tworzonoego przez szczepy S. aureus i P. aeruginosa izolowane z zakażeń ran przewlekłych*. Leczenie Ran 2012;9(4): 47-152
20. Jawień A, Bartoszewicz M, Przondo-Mordarska A, Szewczyk MT, Kaszuba T, Urbanek T, Staszkiwicz W, Sopata M, Kucharzewski M, Korzon-Burakowska A, Krasowski G, Kózka M, Sikorski J, Junka A. *Wytyczne postępowania miejscowego i ogólnego w ranach objętych procesem infekcji*. Leczenie Ran 2012;9(3): 59-75.
21. **Junka AF**, Janczura A, Smutnicka D, Mączyńska B, Secewicz A, Nowicka J, Bartoszewicz M, Gościniak G.: *Use of the real time xCelligence system for purposes of medical microbiology*. Pol.J.Microbiol. 2012;61(3): 191-197
22. **Junka AF**, Deja S, Smutnicka D, Szymczyk P, Ziółkowski G, Bartoszewicz M, Młynarz P. *Differences in metabolic profiles of planktonic and biofilm cells in Staphylococcus aureus - 1H Nuclear Magnetic Resonance search for candidate biomarkers*. Acta Biochim.Pol. 2013;60(4): 701-706
23. Szymczyk P, Junka A, Ziółkowski G, Smutnicka D, Bartoszewicz M, Chlebus M. *The ability of S.aureus to form biofilm on the Ti-6Al-7Nb scaffolds produced by selective laser melting and subjected to the different types of surface modifications*. Acta Bioeng.Biomech. 2013;15 (1): 69-76
24. Kos M, **Junka A**, Smutnicka D, Bartoszewicz M, Kurzynowski T, Gluza K. *Pamidronate enhances bacterial adhesion to bone hydroxyapatite. Another puzzle in the pathology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw?* J.Oral.Maxillofac.Surg. 2013;71(6):1010-1016
25. **Junka A**; promotor prof. dr hab. Grażyna Gościniak ; Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Katedra i Zakład Mikrobiologii: Wpływ erytromycyny na biofilm Klebsiella pneumoniae [praca doktorska] Wrocław, 2013; 234 k.

- 26. Junka A.** *Nowoczesne antyseptyki - definicje, obszar zastosowania, mechanizmy działania i oporności.* Forum Zakaż. 2010;1(3-4): 43-51
- 27. Bartoszewicz M, Junka A, Smutnicka D, Przondo-Mordarska A:** *Mikrobiologiczny aspekt skali oceny rany zagrożonej ryzykiem infekcji W.A.R.* Forum Zakaż. 2011;(2): 385-88
- 28. Bartoszewicz M, Przondo-Mordarska A, Junka A.** *Zasady prawidłowego cewnikowania moczowego.* Forum Zakaż. 2010;1 (1-2): 15-22
- 29. Bartoszewicz M., Junka A, Mączyńska B, Nowicka J.** *Bezpieczeństwo stosowania płynoterapii warunkiem ograniczenia zakażeń.* Sepsis 2012;5(1): 21-24
- 30. Bartoszewicz M, Nawrot U, Mączyńska B, Junka A.** *Monitorowanie powikłań w antybiotykoterapii - grzybice - aspekt kliniczny i mikrobiologiczny.* Sepsis 2010;3(2); s.137-138
- 31. Bartoszewicz M, Junka A.** *Diagnostic procedures preventing hospital-acquired infections*
Polit.Zdr. 2013;12;87-91
- 32. Junka AF:** *Jak potknąć się o słońca, czyli rozważania o biofilmie bakteryjnym i antybiotykach.* Forum Akad. 2013 nr 1(230); s.55-57
- 33. Junka AF, Marzenna Bartoszewicz, Danuta Smutnicka, Anna Secewicz, Patrycja Szymczyk.** *Efficacy of antiseptics containing povidone-iodine, octenidine dihydrochloride and ethacridine lactate against biofilm formed by Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus measured with the novel biofilm-oriented antiseptics test.* Int.Wound J. 2014;11(6): 730-734
- Prace opublikowane po obronie doktoratu**
- 34. Pawlak P, Szymczyk P, Chlebus E, Junka AF, Secewicz A.** *Ocena zdolności tworzenia biofilmu P. aeruginosa na próbkach stopu AZ31 uzyskanego w technologii SLM*
Aktual.Probl.Biomech 2015;9: 89-92
- 35. Junka AF, Szymczyk P, Secewicz A, Pawlak A, Smutnicka D, Ziółkowski G, Bartoszewicz M, Chlebus E.** *The chemical digestion of Ti6Al7Nb scaffolds produced by Selective Laser Melting reduces significantly ability of Pseudomonas aeruginosa to form biofilm.* Acta Bioeng.Biomech 2016;18(1): 115-120
- 36. Szymczyk P, Ziółkowski G, Junka A, Chlebus E.** *Application of Ti6Al7Nb alloy for the manufacture of biomechanical functional structures (BFS) for custom-made bone implants*
Materials 2018;11(6)-16
- 37. Krasowski G, Jawień A, Tukiendorf A, Rybak Z, Junka A, Olejniczak-Nowakowska M, Bartoszewicz M, Smutnicka D.** *A comparison of an antibacterial sandwich dressing vs dressing containing silver* Wound Repair Regen. 2015;23(4): 525-530
- 38. Dalkowski P, Junka A, Reetz A, Bartoszewicz M, Szymczyk P, Zuchowski A.** *Wrażliwość na antyseptyki klinicznych szczepów koagulazo-ujemnych Staphylococcus wywołujących zakażenia miejscowe w formie biofilmowej i planktonicznej.*
Chir.Plast.Oparzenia 2016;4(3): 91-98
- 39. Bartoszewicz M, Junka AF, Dalkowski P, Słojewska-Poznańska E, Szymczyk P, Zuchowski A.** *Wrażliwość na wybrane antyseptyki klinicznych szczepów Pseudomonas aeruginosa w formie biofilmowej i planktonicznej.* Chir.Plast.Oparzenia 2016 T.4 nr 4; s.131-138
- 40. Bartoszewicz M, Junka A, Dalkowski P, Sopata M:** *Wrażliwość klinicznych szczepów Enterococcus faecalis wywołujących zakażenia miejscowe w formie biofilmowej i planktonicznej na antyseptyki.* Forum Zakaż. 2017;8(5): 337-343

41. Dalkowski P, Bartoszewicz M, **Junka A**, Sopata M. *Wrażliwość klinicznych szczepów Klebsiella pneumoniae wywołujących zakażenia miejscowe w formie biofilmowej i planktonicznej na antyseptyki*. Forum Zakaż. 2017 T.8 nr 4; s.239-244
42. Chabowski K, **Junka AF**, Szymczyk P, Piasecki T, Sierakowski A, Mączyńska B, Nitsch K: *The application of impedance microsensors for real-time analysis of Pseudomonas aeruginosa biofilm formation*. Pol.J.Microbiol. 2015;64(2): 115-120
43. Chabowski K, **Junka AF**, Piasecki T, Nowak D, Nitsch K, Smutnicka D, Bartoszewicz M, Moczala M, Szymczyk P. *Impedance sensors made in PCB and LTCC technologies for monitoring growth and degradation of pseudomonal biofilm*. Metrol.Meas.Syst. 2017;24(2); 369-380
44. Ząbek A, **Junka A**, Szymczyk P, Wojtowicz W, Klimek-Ochab M, Młynarz P. *Metabolomics analysis of fungal biofilm development and of arachidonic acid-based quorum sensing mechanism*. J.Basic Microbiol. 2017 Vol.57 no.5; s.428-439
45. Kos M, **Junka A**, Smutnicka D, Szymczyk P, Gluza K, Bartoszewicz M. *Bisphosphonates enhance bacterial adhesion and biofilm formation on bone hydroxyapatite* J.Cranio-Maxillofac.Surg. 2015;43(6): 863-869
46. Wójcicka A, Becan L, **Junka A**, Bartoszewicz M, Secewicz A, Trynda J, Wietrzyk J: *Synthesis and biological activity of novel 6-phenyl-1h-pyrrolo[3,4-c]pyridine-1,3-dione derivatives*. Acta Pol.Pharm. 2017;74(2): 435-443
47. Golonka I, Oleksy M, **Junka A**, Matera-Witkiewicz A, Bartoszewicz M, Musiał M: *Selected physicochemical and biological properties of ethyl ascorbic acid compared to ascorbic acid*. Biol.Pharm.Bull 2017;40(8):1199-1206
48. **Junka A**, Fijałkowski K, Ząbek A, Mikołajewicz K, Chodaczek G, Szymczyk P, Smutnicka D, Żywicka A, Sedghizadeh PP, Dziadas M, Młynarz P, Bartoszewicz M. *Correlation between type of alkali rinsing, cytotoxicity of bio-nanocellulose and presence of metabolites within cellulose membranes*. Carbohydr.Polym. 2017;157:371-379
49. Fijałkowski K, Żywicka A, Drozd R, Niemczyk A, **Junka A**, Peitler D, Kordas M, Konopacki M, Szymczyk P, El Fray M, Rakoczy R. *Modification of bacterial cellulose through exposure to the rotating magnetic field*. Carbohydr.Polym. 2015;133:52-60
50. Fijałkowski F, Żywicka A, Drozd R, **Junka AF**, Peitler D, Kordas M, Konopacki M, Szymczyk P, El Fray M, Rakoczy R. *Increased yield and selected properties of bacterial cellulose exposed to different modes of a rotating magnetic field*. Eng.Life Sci. 2016;16(5): 483-493
51. Fijałkowski K, Żywicka A, Drozd R, **Junka AF**, Peitler D, Kordas M, Konopacki M, Szymczyk P, Rakoczy R. *Increased water content in bacterial cellulose synthesized under rotating magnetic fields*. Electromagn.Biol.Med. 2017;36(2): 192-201
52. Fijałkowski K, Drozd R, Żywicka A, **Junka AF**, Kordas M, Rakoczy R. *Biochemical and cellular properties of Gluconacetobacter xylinus cultures exposed to different modes of rotating magnetic field*. Pol.J.Chem.Technol. 2017;19(2):107-114
53. Żywicka A, Fijałkowski K, **Junka AF**, Grzesiak J, El Fray M. *Modification of bacterial cellulose with quaternary ammonium compounds based on fatty acids and amino acids and the effect on antimicrobial activity*. Biomacromolecules 2018;19(5): 1528-1538
54. Drozd R, Rakoczy R, Wasak A, **Junka A**, Fijałkowski K. *The application of magnetically modified bacterial cellulose for immobilization of laccase*. Int.J.Biol.Macromol. 2018;108: 462-470
55. Żywicka A, **Junka A**, Szymczyk P, Chodaczek G, Grzesiak J, Sedghizadeh PP,

- Fijałkowski K. *Bacterial cellulose yield increased over 500% by supplementation of medium with vegetable oil*. Carbohydr.Polym. 2018;199:294-303
- 56.** Bartoszewicz M, Junka A. *Ocena skuteczności płynów do jamy ustnej stosowanych w profilaktyce i leczeniu chorób przyzębia*. Asyst.Higienist.Stomatol. 2016;11(3): 136-139
- 50.** Bartoszewicz M, Junka A. *Zalety i wady antyseptyków stosowanych w profilaktyce i leczeniu infekcji ran oparzeniowych - okiem mikrobiologa*. Chir.Plast.Oparzenia 2016;4(2): 71-75
- 57.** Mączyńska B, Junka A. *Etiologia i patogenezę zakażeń pochwy u kobiet - srebro w cząsteczce TIAB jako alternatywna metoda leczenia infekcji*. Okiem mikrobiologa. Forum Zakaż. 2016;7(3): 167-174
- 58.** Dudek-Wicher R, Junka A, Bartoszewicz M.: *Fitoterapeutyki w leczeniu zakażeń ran pooparzeniowych*. Chir.Plast.Oparzenia 2017(2); 65-68
- 59.** Oleksy M, Junka A, Bartoszewicz M. *Zastosowanie antyseptyków w leczeniu zakażeń ran oparzeniowych*. Chir.Plast.Oparzenia 2017;2: 53-58
- 60.** Bartoszewicz M, Junka A. *Zastosowanie opatrunków w leczeniu ran przewlekłych powikłanych infekcją wywołaną przez drobnoustroje w formie biofilmowej*. Leczenie Ran 2017;14(4): 141-145
- 61.** Dudek-Wicher R, Junka A, Bartoszewicz M. *Fitoterapia zakażeń*. Zakażenia 2017;17(1): 58-65
- 62.** Reetz R, Junka A, Bartoszewicz M. *Biofilm w ortopedii oraz w chirurgii szczękowo-twarzowej - znaczenie zjawiska i modyfikacje biomateriałów ograniczające częstość zakażeń* Chir.Plast.Oparzenia 2016;4(2): 61-66
- 63.** Dudek-Wicher D, Junka A, Bartoszewicz M. *Leczenie infekcji kości wywołanych przez drobnoustroje w formie biofilmowej za pomocą antybiotyków i eksperymentalnych środków przeciwdrobnoustrojowych*. Forum Zakaż. 2017;8(3): 181-188
- 64.** Fijałkowski K, Drozd R, Rakoczy R, Junka A. *Biomedyczne zastosowanie bakteryjnej celulozy*. Forum Zakaż. 2016;5: 377-379
- 65.** Drozd R, Rakoczy R, Fijałkowski K, Junka A. *Zastosowanie biocelulozy jako nośnika substancji aktywnych*. Forum Zakaż. 2016;7(5): 381-383
- 66.** Dydak K, Junka AF, Bartoszewicz M. *Zastosowanie bionanocelulozy do celów medycznych*. Leczenie Ran 2017;14(1): 13-16
- 67.** Oleksy M, Junka A, Bartoszewicz M. *Narastająca lekooporność Acinetobacter baumannii - rosnące zagrożenie dla oddziałów oparzeniowych*. Chir.Plast.Oparzenia 2017;5(1): 15-21
- 68.** Ozimek MP, Junka AF, Bartoszewicz M. *Metabolity antybiotyków i ich rola w zakażeniach*. Forum Zakaż. 2017;8(1): 13-19
- 69.** Ruth K., Dudek-Wicher, Junka A, Bartoszewicz M. *The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota*. Przegl.Gastroenterol. 2018;13(8): 5-92
- 70.** Czajkowska J, JunkaA, Markowska-Szczupak A. *Zastosowanie metabolomiki jako przyszłego narzędzia w szybkiej diagnostyce ran przewlekłych*. Leczenie Ran 2018;15(1): 13-18
- 71.** Zielińska S, Jezierska-Domaradzka A, Wójciak-Kosior M, Sowa I, Junka A, Matkowski A. *Greater Celandine's ups and downs - 21 centuries of medicinal uses of Chelidonium majus from the viewpoint of today's pharmacology*. Front.Pharmacol. 2018;9; art.299.