

Streszczenie

Obecność lekoopornych gatunków bakterii i infekcje przez nie wywołane są ogromnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Zgodnie z danymi udostępnionymi w 2025 r. przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, z ang. *World Health Organization*) oporność jest bezpośrednio związana z ponad milionem zgonów rocznie, natomiast pośrednio z prawie 5 milionami. Stale poszukuje się nowych strategii terapeutycznych, pozwalających przezwyciężyć tę barierę.

Obiecującą alternatywą dla obecnie dostępnych metod zwalczania infekcji bakteryjnych jest przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna (aPDT, z ang. *antimicrobial PhotoDynamic Therapy*). Jej ogromną zaletą jest brak możliwości wytworzenia przez bakterie oporności procesy prowadzące do śmierci komórki lub jej fotoinaktywacji. Jednakże na efektywność aPDT znaczący wpływ ma ilość substancji, jaka zostanie zakumulowana wewnątrz komórki bakteryjnej.

Popularność zyskują również fotodynamiczne terapie kombinowane, które polegają na wykorzystaniu fotouczulacza (PS, z ang. *PhotoSensitizer*) w połączeniu z dodatkowymi związkami chemicznymi, np. inhibitorami pomp efflux (EPIs, z ang. *Efflux Pump Inhibitors*), antybiotykami lub cytostatykami. Takie podejście pozwala na uzyskanie efektu addytywnego, bądź synergistycznego, w porównaniu z efektami każdej terapii z osobna. Przyczynia się to również do zmniejszenia dawki leków i ograniczenia skutków ubocznych terapii. Połączenie PS z EPI może mieć realny wpływ na jeden z mechanizmów indukowania oporności i doprowadzić do zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia substancji leczniczych.

Ogromnym zainteresowaniem cieszą się EPIs pochodzenia naturalnego. W okresie ostatnich 30 lat blisko 75% zatwierdzonych produktów antybakteryjnych było pochodzenia naturalnego. Wiele badań wskazuje, że takie substancje mogą odgrywać rolę EPI, przyczyniając się do wzmocnienia efektu zastosowanej terapii i do ponownego uwrażliwienia bakterii na substancje, na które wykazywały oporność.

W niniejszej rozprawie podjęłam próbę opracowania alternatywnych, skojarzonych procedur terapeutycznych aPDT, opartych na związkach pochodzenia naturalnego, znajdujących zastosowanie zarówno w terapii aPDT, jak i w ograniczaniu rozwoju struktur bakteryjnych. Ponadto wykazałam, że cyfrowa holotomografia (DHT, ang. *Digital HoloTomography*) może być z powodzeniem stosowana jako ilościowa technika pomiarowa do monitorowania efektów indukowanych przez te substancje oraz terapię, w których są one wykorzystywane, na poziomie pojedynczych komórek bakteryjnych. Pracę doktorską stanowi cykl trzech publikacji.

W pierwszej przedstawiłam strategię łączenia dwóch odpowiednio dobranych PSs (Chlorin e6 i Pheophorbide a) w celu zwiększenia ich wewnątrzkomórkowej akumulacji oraz uzyskania co najmniej addytywnego efektu terapeutycznego. Wykazałam, że kombinacja PSs o uzupełniających się właściwościach fizykochemicznych (anionowy Chlorin e6 i kationowy Pheophorbide a) prowadzi do zwiększonej akumulacji PSs wewnątrz komórek bakteryjnych (*Escherichia coli*) oraz wyższej efektywności terapii. Weryfikacja eksperymentalna z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz technika ilościowego obrazowania fazy DHT potwierdziła, że skuteczność terapii kombinowanej (29,45%) przewyższa skuteczność monoterapii (13,77% w przypadku Chlorin e6 i 16,15% w przypadku Pheophorbide a). Zaproponowane podejście stanowi innowacyjny kierunek rozwoju terapii fotodynamicznej i monitorowania jej skutków, wpisujący się w światowe trendy poszukiwania skutecznych strategii zwalczania zakażeń bakteryjnych.

W drugiej publikacji skoncentrowałam się na zbadaniu wpływu EPI pochodzenia naturalnego (berberyna, palmatyna, piperyna, kurkumina, kapsaicyna i kumaryna) na rozwój populacji bakteryjnych (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*) i procesu formowania się struktur komórkowych. Wykazałam, że inhibicja aktywności pomp efflux prowadzi do zaburzenia mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój hodowli bakteryjnej i tworzenie się struktur przestrzennych przez bakterie. Zastosowanie bioreaktora z odwróconym wirowaniem pozwoliło na ilościowy opis parametrów krzywej wzrostu hodowli. Szczególnie wyraźny efekt zaobserwowałam w przypadku komórek *E. faecalis* inkubowanych z berberyną, dla których średnia wartość maksymalnej szybkości wzrostu uległa redukcji o 53,8%. DHT umożliwiła ilościową, trójwymiarową analizę zmian współczynnika załamania światła (RI, z ang. *Refractive Index*), suchej masy skupisk bakteryjnych oraz objętości zajmowanej przez te struktury. Eksperymentalnie wykazałam, że zaproponowana procedura terapeutyczna prowadzi do ograniczenia dynamiki podziałów komórkowych, a w przypadku *B. cereus* do jej zahamowania, czemu towarzyszyło wydłużanie się komórek, charakterystyczne w przypadku indukowanych efektów stresujących. W przypadku bakterii *B. cereus* wykazałam, że wdrożona procedura terapeutyczna ograniczyła przyrost objętości struktur przestrzennych formowanych przez bakterie świadczący o spowolnieniu lub zahamowaniu dynamiki ich rozwoju. Oznacza to, iż zaproponowana procedura może przeciwdziałać kolonizacji powierzchni przez bakterie.

W trzeciej publikacji skupiłam się na zastosowaniu naturalnych EPI w połączeniu z PS, co stanowi skuteczną strategię zwiększania efektywności aPDT. Badania przeprowadziłam na modelowych bakteriach: Gram-dodatniej: *Bacillus cereus* i Gram-ujemnej: *Escherichia coli*, koncentrując się na analizie wewnątrzkomórkowej akumulacji PS Chlorin e6. Wykorzystanie niskich stężeń wybranych EPIs (< 0,25 MIC) prowadziło do bardziej efektywnej akumulacji PS

wewnątrz komórek bakteryjnych, co potwierdziłam eksperymentalnie za pomocą mikroskopii konfokalnej i DHT. Zwiększona akumulacja PS przekładała się bezpośrednio na wyraźny wzrost skuteczności aPDT, umożliwiając potencjalną redukcję stężeń stosowanych związków aktywnych i ograniczenie niepożądanych skutków terapii. W przypadku *Bacillus cereus* połączenie piperyny z Chlorin e6 prowadziło do wzrostu skuteczności terapii o 273,90%, a w przypadku *Escherichia coli* zastosowanie berberyny w kombinacji z Chlorin e6 skutkowało zwiększeniem efektu terapeutycznego o 227,72% w porównaniu z terapią opartą wyłącznie na PS. Przeprowadzone badania jednoznacznie wskazują, że włączenie EPI do schematów leczenia przeciwbakteryjnego umożliwia osiągnięcie lepszych efektów terapeutycznych.

Opublikowane wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają, że nadrzędny cel rozprawy doktorskiej został zrealizowany. Wskazano alternatywne, kombinowane terapie antybakteryjne oparte na EPI pochodzenia naturalnego, znajdujące zastosowanie zarówno w terapii aPDT, jak i w ograniczaniu rozwoju struktur bakteryjnych. Ponadto w trakcie prowadzonych prac badawczych zaproponowano całkiem nowe, bezznacznikowe i nieniszczące procedury pomiarowe, oparte na ilościowym obrazowaniu fazy – DHT, które mogą stanowić alternatywę dla obecnie stosowanych klasycznych technik mikrobiologicznych. Warto również podkreślić, że powszechne wdrożenie zaproponowanych procedur terapeutycznych może przyczynić się do ograniczenia kolonizacji powierzchni przez bakterie, zahamowania ich rozwoju, fotoinaktywacji lub też ograniczenia lekooporności nie tylko w praktyce klinicznej, ale również w przemyśle spożywczym i kosmetycznym.

24.02.2026

Aleksandra Talarczyk