

ZAŁĄCZNIK 2
AUTOREFERAT PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS OSIĄGNIĘĆ
W JĘZYKU POLSKIM

AUTOREFERAT

dr n. biol. Bogumiła Szponar

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Wrocław 2013

1. Bogumiła Szponar

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- 1997 doktor nauk biologicznych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu
rozprawa doktorska pt. „Struktura i właściwości biologiczne glikolipidów bakterii oportunistycznych *Rhodococcus equi*”, promotor: prof. dr hab. Halina Mordarska
- 1992 magister analityki medycznej, Akademia Medyczna we Wrocławiu, Wydział Farmacji, Oddział Analityki Medycznej
praca magisterska pt. „Badania epitopu rozpoznawanego przez przeciwciała anty-lipopolisacharyd *Citrobacter freundii* O37”, promotor: prof. dr hab. Andrzej Gamian

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2010- Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, asystent
- 2008- kierownik Pracowni Chemii Ogólnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu
- 2002-2010 Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, adiunkt
- 1997-1998 staż podoktorski w Lund University, Dept. of Laboratory Medicine, Section of Medical Microbiology, Szwecja
- 1992-2002 Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, asystent

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

a) Osiągnięciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik nr 5, objęty tytułem:

„Oznaczanie chemicznych markerów endotoksyny we krwi i tkankach na modelu zwierzęcym oraz zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu terapii chorób nieinfekcyjnych”

1. **Szponar B.**, Kraśnik L., Hryniewiecki T., Gamian A., Larsson L. (2003) Distribution of 3-hydroxy fatty acids in tissues after intraperitoneal injection of endotoxin.
Clinical Chemistry 49: 1149-1153
2. **Szponar B.**, Norin E., Midtvedt T., Larsson L. (2002) Limitation in the use of 3-hydroxy fatty acid analysis to determine endotoxin in mammalian samples.
Journal of Microbiological Methods 50: 283-289
3. Kraśnik L., **Szponar B.**, Walczak M., Larsson L., Gamian A. (2006) Routine clinical laboratory tests correspond to increased serum levels of 3-hydroxy fatty acids, markers of endotoxins, in cardiosurgery patients.
Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 54: 55-60
4. Ferrando R., **Szponar B.**, Sanchez A., Larsson L., Valero-Guillén P.L. (2005) 3-Hydroxy fatty acids in saliva as diagnostic markers in chronic periodontitis.
Journal of Microbiological Methods 62: 285-291
5. **Szponar B.**, Larsson L., Domagała-Kulawik J. (2012) Endotoxin markers in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases.
Multidisciplinary Respiratory Medicine 7:54
6. **Szponar B.** (2010) Endotoxins in environmental and clinical samples assessed by GC-tandem MS.
W: *Detection of Biological Agents for the Prevention of Bioterrorism*, J. Banoub (Ed.); Series: NATO Science for Peace and Security, Series A: Chemistry and Biology. Springer, 245-265

Cykl publikacji dotyczy zastosowania 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs), składników lipidu A - konserwatywnego fragmentu lipopolisacharydu bakterii Gram-ujemnych, oznaczanych metodą analityczną za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (GCMS), w diagnostyce chorób niezakaźnych jako markerów endotoksyn i bakterii Gram-ujemnych.

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

Organizm człowieka był ekspozycja na działanie mikroorganizmów od początku rozwoju ewolucyjnego i osobniczego, gdy obecność drobnoustrojów moderowała czynności narządów i układów poprzez infekcje i symbiotyczne zasiedlanie tkanek nabłonkowych. Żywe mikroorganizmy i ich metabolity, ale także składniki ścian martwych komórek oddziałują z układem odpornościowym gospodarza, a ekspozycja taka dynamicznie wpływa na stan zdrowia człowieka w ciągu całego życia. Jakościowa i ilościowa charakterystyka konsorcjów drobnoustrojów wymaga więc sprawnych i wiarygodnych narzędzi badawczych.

Prezentowany cykl publikacji jest dokumentacją opracowania metody analitycznej, którą podjęłam w celu oznaczania lipopolisacharydów (LPS, endotoksyny) w materiale biologicznym za pomocą ich specyficznych markerów chemicznych – 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych. Wcześniej udane zastosowania chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas w analizie chemicznych markerów mikroorganizmów w złożonych matrycach biologicznych, np. w kurzu organicznym¹ wskazywały na możliwość specyficznego i selektywnego wykrywania markerów endotoksyny i bakterii Gram-ujemnych także w materiale diagnostycznym. W pierwszym etapie badania prowadziłam na zwierzęcym modelu endotoksemii oraz z wykorzystaniem zwierząt gnotobiotycznych (*artykuły cyklu publikacji: 1 i 2*), a następnie na materiale od pacjentów: surowicy, krwi, ślinie, próbkach stolca i popłuczynach oskrzelowych (*artykuły 3, 4, 5, 6*).

Celem pracy była ocena profilu chemicznych markerów endotoksyny i bakterii Gram-ujemnych na przykładzie chorób przewlekłych, w których etiologii obserwuje się zaburzenia homeostazy flory bakteryjnej (choroba Leśniowskiego-Crohna, przewlekłe zapalenie przyzębia, *artykuły 4 i 6*), ale nie występuje ostra infekcja bakteryjna ani sepsa. W innych opisanych sytuacjach klinicznych wysoki poziom endotoksyny ma znaczenie w etiologii i postępie choroby (endotoksemia śród- i pooperacyjna w kardiochirurgii, choroby śródmiąższowe płuc, *artykuły 3 i 5*).

Lipopolisacharydy bakterii Gram-ujemnych

Lipopolisacharyd (LPS) wchodzi w skład osłon komórkowych bakterii Gram-ujemnych i jest makrocząsteczką o znacznym potencjale biologicznym. Wpływa na procesy patofizjologiczne i odpowiada za szereg interakcji w relacji drobnoustrój-organizm wyższy. Pod wpływem stałej obecności bakterii Gram-ujemnych, a tym samym LPSu w środowisku życia kręgowców, szereg reakcji fizjologicznych i patogenetycznych rozwinęło się w konsekwencji agresywnego ataku patogenów i obrony organizmu przed infekcją, ale też symbiozy z florą bakteryjną przewodu pokarmowego.

Każda Gram-ujemna komórka bakteryjna ekspozuje na swojej powierzchni 3 do 5 milionów cząsteczek LPSu, co stanowi około 3% całkowitej suchej biomasy bakteryjnej. Obecność LPSu jest powszechna – bakteria może go uwalniać do otoczenia, ale LPS pozostaje w środowisku także po obumarciu komórki, nadal dysponując potencjałem biologicznym.

Lipopolisacharyd ma właściwości patogenne, przede wszystkim przez działanie prozapalne i inicjację produkcji cytokin-mediatorów zapalenia w organizmie gospodarza. Serię reakcji zapoczątkowuje wiązanie LPSu do receptorów znajdujących się na powierzchni komórek arsenału obronnego organizmu wyższego. Wobec układu odpornościowego LPS pełni funkcję cząsteczki reprezentującej

¹ Szponar B., Larsson L. (2001) Use of mass spectrometry for characterizing microbial communities in bioaerosols. *Ann. Agric. Environ. Med.* 8, 111-117

wzorzec patogenności PAMP (pathogen-associated molecular pattern) i jest rozpoznawany przez receptory Toll-podobne TLR (Toll-like receptors), w kompleksie TLR4-MD2. LPS stanowi epitop dla specyficznych przeciwciał, jest także odpowiedzialny za uruchomienie kaskady procesu wiązania dopełniacza.

Kwasy 3-hydroksylowe (3-OHFAs), chemiczne markery lipopolisacharydów i bakterii Gram-ujemnych

Oznaczanie endotoksyny i bakterii Gram-ujemnych w niektórych próbach środowiskowych i materiale klinicznym jest zagadnieniem trudnym. Metody hodowlane wykrywają zaledwie część żywych mikroorganizmów, podczas gdy drobnoustroje nie rosnące w warunkach laboratoryjnych, martwe czy też ich toksyczne fragmenty zachowujące potencjał biologiczny pozostają niewykryte.

Analityczne oznaczanie chemicznych markerów endotoksyny jest alternatywą dla powszechnie stosowanej od lat 50. ubiegłego wieku bardzo czułej biologicznej metody LAL (*Limulus* Amebocyte Lysate), który oznacza aktywność LPS względem wzorca izolowanego ze szczepu *Escherichia coli* O111:B4. Test jest wysoko ceniony ze względu na czułość i specyficzność oznaczeń, sprawia jednak problemy w analizach złożonych materiałów biologicznych, ze względu na niespecyficzne reakcje, które mogą zafałszować wyniki; ma również pewne ograniczenia związane z niską międzylaboratoryjną powtarzalnością pomiarów.

Koncepcja chemicznych markerów mikroorganizmów wykorzystuje analityczne oznaczanie unikalnych substancji nie występujących w innych strukturach w przyrodzie i jest szeroko wykorzystywana w badaniach środowiskowych¹. Obejmuje mikroorganizmy żywe i martwe, a także fragmenty ścian komórkowych i makrocząsteczki pochodzenia bakteryjnego: lipopolisacharyd, peptydoglikan i ergosterol ściany komórkowej grzybów. Z pomocą markerów mikroorganizmów oznacza się całkowitą biomasę bakterii, grzybów pleśniowych i ich zarodników. W mikrobiologii klinicznej rutynowo stosuje się analizę estrów metylowych kwasów tłuszczowych, markerów gatunkowych patogenów z rodzaju *Mycobacterium* oraz oznacza się w moczu proporcję izomerów optycznych D- i L-arabinitolu, metabolitu *Candida* spp. jako markera uogólnionej kandydozy².

Chemicznymi markerami endotoksyny i bakterii Gram-ujemnych są 3-hydroksylowe kwasy tłuszczowe o długości łańcucha acylowego od 10 do 18 atomów węgla (sporadycznie występują dłuższe struktury). Budują one lipid A, najbardziej konserwatywny fragment LPS. Schemat budowy lipidu A obejmuje rdzeń składający się z disacharydu glukozaminowego, który podstawiony jest estrowo w pozycjach 3,3' resztami kwasu 3-hydroksylowego, a kolejne reszty kwasów są związane amidowo w pozycjach 2,2'. Mogą też występować dalsze podstawienia, np. estryfikacja grupy hydroksylowej acylu kolejnymi resztami kwasów tłuszczowych oraz fosforylacja, w znacznym stopniu odpowiadająca za heterogenność całej cząsteczki.

Ze względu na stosunkowo nieskomplikowaną procedurę chemiczną i stosowanie analitycznych metod instrumentalnych, markery chemiczne znajdują zastosowanie od ponad dekady w detekcji lipopolisacharydów w licznych projektach, w których ekspozycja na endotoksynę w środowisku jest ważnym elementem wieloparametrycznych badaniach epidemiologicznych. Znana jest pozytywna korelacja wysokiej ekspozycji na endotoksynę (w rolnictwie, przemyśle spożywczym, przemyśle drzewnym) z problemami zdrowotnymi osób narażonych, co objawiają się zwłaszcza przewlekłymi stanami zapalnymi górnych dróg oddechowych i zaostrzeniem astmy.

² Sigmundsdóttir G, Christensson B, Björklund LJ, Håkansson K, Pehrson C, Larsson L. (2000) Urine D-arabinitol/L-arabinitol ratio in diagnosis of invasive candidiasis in newborn infants. J Clin Microbiol. 38:3039-3042

Analityczne oznaczanie 3-OHFAs – chromatografia gazowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (GCMS)

Zintegrowana metoda oznaczania markerów endotoksyny rozwinęła się dzięki wprowadzeniu do laboratoriów badawczych i klinicznych przystępnych cenowo i niewymagających specjalistycznej obsługi chromatografów gazowych zaopatrzonych w detektor - spektrometr mas oraz autosampler.

Chemiczna preparacja materiału do analizy 3-OHFAs obejmuje hydrolizę, ekstrakcję i oczyszczanie: materiał poddany zostaje metanolizie, w wyniku której uwalniane są estry metylowe kwasów tłuszczowych, ekstrahowane następnie do rozpuszczalnika organicznego. Kwasy hydroksylowe oddzielane są od pozostałych kwasów tłuszczowych na kolumnach ekstrakcji fazy stałej (SPE), po czym grupę hydroksylową przeprowadza się w pochodną trójmetylosilylową (TMS) w celu uzyskania lepszego rozdziału chromatograficznego.

Analiza wykonywana jest za pomocą GCMS. Pełne widmo masowe pochodnych kwasów 3-hydroksylowych charakteryzuje dominacja jonu masowego danego kwasu m/z (M^+-15), oraz jonu m/z 175, charakterystycznego fragmentu dla wszystkich hydroksykwasów podstawionych grupą $-OH$ w pozycji C3. Ilościowy pomiar pochodnych 3-OHFAs polega na monitorowaniu jonu pochodnego m/z 131, powstającego w wyniku specyficznej izolacji i rozbiciu macierzystego jonu m/z 175, w stosunku do standardu wewnętrznego, kwasu 3-OH C13:0 lub deuterowanego 3-OH C14:0.

W prezentowanych pracach jako detektora użyto spektrometru mas typu potrójnego kwadrupola (1200 Triple Quadrupole GCMS, Varian Inc.; TSQuantum, Thermo Scientific), z jonizacją próbki elektronami (EI). Powstający z fragmentacji pochodnych kwasów 3-hydroksylowych jon macierzysty m/z 175 jest izolowany i poddawany kolejnej fragmentacji. Uzyskany jon potomny m/z 131 jest podstawą oznaczenia ilościowego 3-OHFAs w badanej próbce.

Mechanizmy rozpoznawania lipopolisacharydów u kręgowców

Wyspecjalizowany mechanizm wykrywania i reagowania na endotoksynę rozwinął się u kręgowców jako element wrodzonej odpowiedzi odpornościowej, reprezentowanej przez receptor z rodziny Toll-podobnych. Składa się on z cząsteczki MD2 wiążącej LPS oraz TLR4, przekazującego sygnał do efektorów odpowiedzi immunologicznej. Zarówno bakterie patogenne, jak i komensalne mogą być wykrywane przez reprezentowane licznie na powierzchniach śluzówki górnych dróg oddechowych i układu pokarmowego kompleksy MD2-TLR4. Podczas infekcji bakterie Gram-ujemne są zwykle czynnikiem etiologicznym lokalnych ognisk zapalnych, a jedynie sporadycznie przenikają one do krwi; z drugiej strony za uogólnione infekcje odpowiedzialne są te bakterie Gram-ujemne, których LPS ze jest słabo wykrywany przez kompleks MD2-TLR4. Zjawisko to ma związek z budową chemiczną i ilością podstawników acylowych, a co za tym idzie strukturą przestrzenną lipidu A: heksaacylowany lipid A wykazuje kilkadziesiąt razy wyższą aktywność biologiczną niż struktury tetra- lub pentaacylowe³.

Warto zauważyć, że receptory TLR4 nielicznie występują w powierzchniowych warstwach ścian przewodu pokarmowego; ich najczęstszą lokalizacją są makrofagi, komórki dendrytyczne i neutrofile, które gromadzą się w warstwie podśluzówkowej układu oddechowego i pokarmowego. Tam neutralizują bakterie, które przełamały barierę nabłonka i przedostały się do przestrzeni podśluzówkowej, stanowiąc poważne zagrożenie bakteriami i posocznica. Obrona organizmu przed

³ Łukasiewicz J., Ługowski C. (2003) Biologiczna aktywność lipopolisacharydu. Post Hig Med Dośw 57: 33-36

drobnoustrojem jest zatem skuteczna o ile uda się je zatrzymać ja na poziomie lokalnego zapalenia, bez migracji bakterii w całym organizmie.

Endotoksyna w analizach klinicznych

Pierwsze doniesienia o próbach zastosowania markerów endotoksyny 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych w celu ustalenia poziomu LPS w surowicy na modelu zwierzęcym publikowano w latach 70-tych XX. wieku. Za pomocą GCMS wykryto wówczas, że dodanie do surowic endotoksyny *E. coli* i lipidu A *Salmonella minnesota* zwiększa stężenie kwasu 3-hydroksytetradekanowego (3-OH C14:0), charakterystycznego dla rodziny *Enterobacteriaceae*⁴. W innej pracy wykazano obecność kwasu 3-hydroksyduodekanowego, dominującego w LPSie *Neisseria meningitidis*, w plazmie chorego na zapalenie opon mózgowych⁵. Celem przytoczonych badań było zastosowanie markerów endotoksyny w diagnostyce sepsy.

Szok endotoksynowy wywołany inwazją bakterii Gram-ujemnych lub produktów ich rozpadu do krwi przebiega gwałtownie i wywołuje krytyczne objawy wielonarządowe, wymagające pilnej interwencji lekarskiej. Oznaczanie endotoksyny we krwi i innych płynach ustrojowych w przebiegu sepsy było podejmowane przez licznych badaczy; jedną z metod jest test LAL, oparty na wykorzystaniu izolowanej hemolimfy skrzypłoczy (*Limulus polyphemus*), koagulującej w kontakcie z endotoksyną. Właściwość ta stała się przedmiotem patentu, a następnie aplikacji komercyjnej, szeroko dziś stosowanej w przemyśle farmaceutycznym, wyrobów medycznych oraz w badaniach kosmicznych.

Do oznaczania endotoksyny w materiale klinicznym stosowano także chemiczne markery LPSu wykrywanego za pomocą GCMS: kwas oktulozonowy (Kdo), składnik rdzenia wewnętrznego lipopolisacharydu⁶ oraz 3-hydroksylowe kwasy tłuszczowe, pochodzące z lipidu A.

Bezpośrednie oznaczanie LPSu we krwi pacjentów cierpiących na sepsę jest jednak skomplikowane i ma ograniczenia, w wyniku których wyniki są mało powtarzalne, pojawiają się też odczyty fałszywie dodatnie i ujemne. Ponadto endotoksemia występuje zaledwie u ok. 30% pacjentów z bakteriami, ale nie pozwala potwierdzić bakteriemii czy infekcji bakteriami Gram-ujemnymi, ani też rokowań pacjenta. Istnieje pewna korelacja między poziomem endotoksyny we krwi a ciężkością przebiegu sepsy, lecz o niewystarczającej dla wykorzystania diagnostycznego precyzji i wiarygodności⁷. Uważa się, że oznaczanie endotoksyny za pomocą testu LAL może wykluczyć infekcję Gram-ujemną, ale systematyczne badania nie zostały przeprowadzone.

⁴ Maitra SK, Schotz MC, Yoshikawa TT, Guze LB. (1978) Determination of lipid A and endotoxin in serum by mass spectroscopy. Proc Natl Acad Sci USA 75:3993-3997

⁵ Brandtzaeg P, Bryn K, Kierulf P, Ovstebø R, Namork E, Aase B, Jantzen E. (1992) Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation, and electron microscopy. J Clin Invest 89:816-823

⁶ Rybka J, Gamian A. (2006) Determination of endotoxin by the measurement of the acetylated methyl glycoside derivative of Kdo with gas-liquid chromatography-mass spectrometry. J Microbiol Methods. 64:171-184

⁷ Brandenburg K, Howe J, Gutsman T, Garidel P. (2009) The expression of endotoxic activity in the *Limulus* test as compared to cytokine production in immune cells. Curr Med Chem 16:2653-2660

Istnieje jednak szereg sytuacji patologicznych o znacznie mniej dramatycznym przebiegu niż sepsa czy ciężkie schorzenia ogólnoustrojowe, w których bakterie Gram-ujemne i endotoksyna odgrywają nie mniej znaczącą rolę. Opracowanie metody oznaczania tych substancji w materiale diagnostycznym pacjenta może przyczynić się do rozpoznania etiologii schorzenia, być zastosowane jako czynnik prognostyczny lub narzędzie monitorowania postępów leczenia.

W przedstawianym cyklu publikacji podjęto krytyczną analizę zastosowania analitycznego pomiaru 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych we krwi i innych tkankach na dwóch modelach zwierzęcych: endotoksemii, wywołanej u szczurów dootrzewnowym podaniem zawiesiny lipopolisacharydu w dawce jednorazowej i rozłożonej w czasie (*artykuł 1*) oraz u szczurów gnotobiotycznych (*germ-free*), hodowanych w warunkach jałowości i całkowitego braku flory jelitowej (*artykuł 2*). W pracach tych przeprowadzono doświadczenia mające na celu modyfikacje metody ilościowego oznaczania chemicznych markerów endotoksyny w zależności od rodzaju analizowanej tkanki.

W drugiej części cyklu przedstawiam możliwości zastosowania tych markerów w materiale diagnostycznym w jednostkach chorobowych przebiegających z udziałem bakterii Gram-ujemnych i endotoksyny (*artykuły 3,4,5,6*). W ostatniej pracy (*artykuł 6*) odnoszę się także do kwestii endogennych kwasów 3-hydroksylowych (*artykuły 2,3*). W pracy tej rozróżniano endogenne od bakteryjnych 3-hydroksylowe kwasy tłuszczowe za pomocą analizy pochodnych chiralnych: oznaczane w GCMS formy *R* pochodnych kwasów 3-OHFAs są unikalnymi markerami lipidu A lipopolisacharydu, podczas gdy formy o konfiguracji *S* są pochodnymi produktów przejściowych degradacji lipidów u organizmach wyższych – *S*-3-hydroksy-palmitylo-koenzymu A, pojawiającego się podczas cyklu β -oksydacji.

PRZEDSTAWIONY CYKL PRAC OBEJMUJE TRZY ZAGADNIENIA BADAWCZE, STANOWIĄCE PRZEDMIOT MOICH ZAINTERESOWAŃ NAUKOWYCH:

1. Opracowanie metody oznaczania markerów endotoksyn w materiale biologicznym na modelu zwierzęcym;
2. Opracowanie metody oznaczania markerów endotoksyn w materiale diagnostycznym pacjentów;
3. Zastosowanie markerów endotoksyny w sytuacjach klinicznych, w których bakterie Gram-ujemne (lub lipopolisacharydy) mają znaczenie:
 - a. w endotoksemii w przebiegu operacji kardiochirurgicznych;
 - b. jako markerów przewlekłych stanów zapalnych przyzębia (*perodontitis*);
 - c. w monitorowaniu i diagnostyce różnicowej przewlekłych schorzeń jelita grubego: choroby Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego;
 - d. w ocenie etiogenezy śródmiąższowych chorób płuc.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW OPISANYCH W WYBRANYCH DO OCENY PUBLIKACJACH

Szponar B., Kraśnik L., Hryniewiecki T., Gamian A., Larsson L. (2003) Distribution of 3-hydroxy fatty acids in tissues after intraperitoneal injection of endotoxin. *Clinical Chemistry* 49: 1149-1153

Celem pracy było opracowanie metody analitycznego oznaczania markerów bakterii Gram-ujemnych i endotoksyny poprzez analizę dystrybucji endotoksyny podanej dootrzewnowo szczurom do tkanek i narządów. 3-OHFAs oznaczano w surowicy, wątrobie, mięśniu sercowym i mięśniach szkieletowych.

Wykorzystano dwa modele endotoksemii wywołanej u szczurów dootrzewnowym podaniem lipopolisacharydu uzyskanego ze szczepu *E. coli* O127:B8. Pierwszej grupie zwierząt LPS podano w jednorazowej dawce (20 mg/kg masy ciała) („shock model”), w drugiej grupie tą samą ilość LPSu podawane przez 10 dni podzieloną na równe dawki („chronic model”); grupa kontrolna otrzymywała dootrzewnowo sól fizjologiczną.

Obserwowano charakterystyczne profile 3-OHFAs dla tkanki wątrobowej, mięśnia sercowego oraz mięśni szkieletowych, z dominującym kwasem 3-OH C14:0, występującym u przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym *E. coli*.

Dootrzewnowe podanie lipopolisacharydu *E. coli* O127:B8 spowodowało znaczny wzrost markerów endotoksyny w obu badanych grupach, ale odmienną ich dystrybucję. Większość podanego LPSu została przez żyłę wrotną przetransportowana do wątroby, natomiast pozostała część, przejęta przez układ limfatyczny, została rozprowadzona do różnych narządów. W grupie pierwszej („shock model”) jedną dobę po podaniu nastąpił 50-krotny wzrost poziomu kwasu 3-hydroksypalmitynowego (charakterystycznego dla podanego LPS *E. coli*) w surowicy, natomiast w grupie drugiej, gdy dawka była rozłożona w czasie, LPS nie kumulował się w krwioobieg i po 10 dniach poziom kwasu 3-hydroksypalmitynowego był podwyższony w stosunkowo niewielkim stopniu.

Można także zaobserwować wiązanie LPSu przez wątrobę – podobna ilość markerów znajdowała się u szczurów w obu badanych grupach. Podanie endotoksyny nie miało wpływu na poziom markerów w tkance mięśnia serca, natomiast mięśnie szkieletowe zawierały - w zależności od sposobu podania LPSu – dominujące ilości kwasu 3-OHC14:0 lub 3-OHC16:0. Ta ostatnia obserwacja może być świadectwem endogennego pochodzenia części oznaczanych w doświadczeniu związków, pochodzących z metabolizmu lipidów podczas cyklu β -oksydacji (artykuł 6).

W pracy przedstawiono po raz pierwszy obecność 3-OHFAs w tkankach zdrowych zwierząt grupy kontrolnej (nie cierpiących na bakteriemię i endotoksemię). Pochodzenie tych związków było weryfikowane w dalszych publikacjach.

Szponar B., Norin E., Midtvedt T., Larsson L. (2002) Limitation in the use of 3-hydroxy fatty acid analysis to determine endotoxin in mammalian samples. *Journal of Microbiological Methods* 50: 283-289

Celem badań był dalszy rozwój metody i ocena możliwości zastosowania 3-OHFAs oznaczanych za pomocą GCMS jako sposobu pomiaru poziomu endotoksyny w płynach fizjologicznych i tkankach zwierzęcych. Opublikowane wyniki (artykuł 1) wykazały w surowicy zwierząt obecność 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych, unikalnie występujących w lipopolisacharydach, co potwierdziły pełne widma masowe tych związków obecne w analizie GCMS krwi i tkanek zwierzęcych.

W tym artykule, dzięki uprzejmości prof. Tore Midtvedta z Karolinska Institutet w Sztokholmie, przyjąłam model zwierząt gnotobiotycznych (germ-free), który wyklucza możliwość pochodzenia 3-

OHFAs z flory jelitowej, ponieważ zwierzęta te są jej całkowicie pozbawione i przebywają w środowisku wolnym od drobnoustrojów.

Badany materiał pochodził od zwierząt germ-free utrzymywanych w warunkach sterylnych oraz od osobników przeniesionych do warunków konwencjonalnych, w normalnym kontakcie ze środowiskiem zewnętrznym. Oznaczony w surowicach poziom 3-OHFAs był o kilka rzędów niższy niż wykrywany u zwierząt hodowli standardowej (*artykuł 1*). Interesującą obserwacją był tylko minimalny wzrost poziomu markerów endotoksyny po przeniesieniu szczurów gnotobiotycznych ze środowiska sterylnego do warunków konwencjonalnych. Zachowały one podobny profil kwasów 3-hydroksylowych o łańcuchach acylowych różnej długości, co świadczy o powolnej kolonizacji organizmu przez florę bakteryjną.

Ponownie uwagę naszą zwróciła obecność pewnych ilości 3-OHFAs, także we krwi szczurów gnotobiotycznych, wolnych od drobnoustrojów. W artykule stwierdza się, że oznaczenie markerów 3-OHFAs we krwi i tkankach zwierzęcych jest cennym źródłem informacji, aczkolwiek udział form endogennych, pochodzących z cyklu β -oksydacji kwasów tłuszczowych musi być brany pod uwagę w analizie i interpretacji wyników.

Kraśnik L., Szponar B., Walczak M., Larsson L., Gamian A. (2006) Routine clinical laboratory tests correspond to increased serum levels of 3-hydroxy fatty acids, markers of endotoxins, in cardiosurgery patients. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 54: 55-60

Zjawiskiem często obserwowanym w następstwie operacji kardiochirurgicznych jest endotoksemia, czyli podwyższone stężenie endotoksyny we krwi pacjenta, trwające do 24 godzin po operacji. Uważa się, że główną przyczyną jest zwiększona przepuszczalność (permeabilizacja) jelita, na skutek której bakterie jelitowe i endotoksyny przenikają do krwioobiegu.

Szczelność bariery jelito-krew obniża się podczas operacji, gdy pacjent podłączony jest do sztucznego płuco-serca, aorta zostaje zakleszczona, i w konsekwencji ciśnienie krwi znacznie spada. Ponadto w warunkach hipotermii podczas operacji, gdy ciepłota ciała pacjenta obniżana jest do 20°C, przepływ krwi przez naczynia krwionośne krezki jelita jest znacznie spowolniony. Po odłączeniu sztucznego płuco-serca i odkleszczeniu aorty ciśnienie krwi ponownie wzrasta. Procesy te upośledzają funkcję bariery jelito-krew i powodują translokację bakteryjną, a przedłużająca się endotoksemia negatywnie wpływa na stan i rekonwalescencję pacjenta.

W celu określenia korelacji poziomu endotoksemii u pacjentów poddanych operacjom kardiochirurgicznym z ich stanem zdrowia reprezentowanym przez rutynowe testy diagnostyczne, przeprowadzono monitorowanie poziomu 3-OHFAs w surowicy pacjentów pobranej przed operacją, w trakcie i 24 godziny po jej zakończeniu.

W badaniu (koordynowanym przed dra n. med. L. Kraśnika z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu) uczestniczyło 16 osób; wykluczono chorych cierpiących na przewlekłe zapalenie jelit, posiew krwi przed operacją u wszystkich badanych był negatywny. Krew pobierano trzykrotnie: na sali operacyjnej przed znieczuleniem pacjenta i bezpośrednio po odłączeniu sztucznego płuco-serca oraz 24 godziny po operacji. Początkowy poziom markerów endotoksyny był podobny u wszystkich badanych. Ze względu na oznaczony poziom markerów endotoksyny wyróżniono dwie grupy: 11 pacjentów, u których endotoksemia pozostała na podobnym do przedoperacyjnym poziomie oraz 5 pacjentów, u których stwierdzono statystycznie znamienne wzrost poziomu markerów endotoksyny w stosunku do poziomu przed operacją. Wysokie wartości utrzymywały się w tej grupie także do 24 godzin po operacji.

U wszystkich osób w grupie z podwyższoną endotoksemią rozwinęła się leukocytoza trwająca 72 godziny po operacji (w drugiej grupie - u trzech z jedenastu osób), u trzech osób stwierdzono podwyższony poziom enzymu wątrobowego ALT (w drugiej grupie u jednej osoby); pozostałe wyniki rutynowych testów laboratoryjnych nie różniły się w obu grupach.

W dyskusji podkreśla się, że pomimo doniesień o związku endotoksemii w przebiegu operacji kardiochirurgicznych spowodowanej translokacją bakterii i endotoksyn i możliwych konsekwencji dla stanu zdrowia pacjenta, śródoperacyjne oznaczanie poziomu endotoksemii nie jest wykonywane. Z naszych badań wynika, że przedłużająca się leukocytoza, wzrost poziomu głębokiej anemii oraz dysfunkcja wątroby mogą wskazywać na trwającą endotoksemię.

Sugeruje się celowość monitorowania poziomu endotoksyny, również za pomocą markerów chemicznych, u pacjentów oddziałów kardiochirurgicznych.

Ferrando R., **Szponar B.**, Sánchez A., Larsson L., Valero-Guillén P.L. (2005) 3-Hydroxy fatty acids in saliva as diagnostic markers in chronic periodontitis. *Journal of Microbiological Methods* 62: 285-291

Przewlekłe zapalenie przyzębia (periodontitis) jest stanem prowadzącym do destrukcji tkanek miękkich, resorpcji kości i często utraty zęba. Diagnostyka zapalenia przyzębia polega głównie na ocenie objawów klinicznych, stosowane są także różne markery tej choroby, w tym specyficzne białka, enzymy i przeciwciała. Etiologia tego schorzenia nie jest całkowicie wyjaśniona, ale bezsporny jest udział patogennych bakterii, których poziom wzrasta z powodu zaburzenia równowagi flory bakteryjnej w płytce nazębnej.

Konsorcjum bakteryjne płytki nazębnej charakteryzuje się obecnością bakterii Gram-ujemnych, których lipid A budują 3-hydroksylowe kwasy tłuszczowe o prostych i rozgałęzionych resztach acylowych.

W celu ewaluacji przydatności oznaczania markerów lipopolisacharydów dla wczesnej diagnostyki zapalenia przyzębia badano dwie grupy: chorych cierpiących na przewlekłe zapalenie przyzębia oraz osób zdrowych; jako materiał pobierano ślinę. Materiał uzyskano w ramach współpracy z badaczami z Universidad de Murcia w Hiszpanii.

W próbach wykryto dziewięć prostych i pięć rozgałęzionych 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych, co świadczy o znacznej różnorodności flory bakteryjnej przyzębia. Stanowią ją takie rodzaje jak *Bacteroides*, *Porphyromonas* i *Prevotella*, zawierające kwas 3-OH *izoC17:0*, oraz stanowiących dominujące taksony u osób zdrowych rodzaje *Neisseria* i *Haemophilus*, w których lipidzie A znajdują się 3-OH *nC12:0* i 3-OH *nC14:0*. Prostołańcuchowe 3-OH *nC12:0*, 3-OH *nC13:0* i 3-OH *nC14:0* są obecne u *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Neisseria* i *Veillonella*; 3-OH *nC16:0* występuje u bakterii należących do kompleksu *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*. Kwas 3-OH *izoC17:0* dominuje u *Tannerella forsythensis*, patogenu charakterystycznego dla chronicznego zapalenia przyzębia.

Z przeprowadzonych analiz wynika, że głównym związkiem różnicującym materiał pacjentów od osób zdrowych jest kwas 3-OH *izoC17:0*, obecny u ściśle beztlenowych bakterii uznawanych za uczestniczące w patogenezie *periodontitis*: *Prevotella*, *Porphyromonas gingivalis* i *Tannerella forsythensis*. W podsumowaniu stwierdza się, że metoda może posłużyć do dalszych badań w ocenie zaawansowania zapalenia przyzębia i efektywności leczenia.

Szponar B, Larsson L, Domagala-Kulawik J. (2012) Endotoxin markers in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. *Multidisciplinary Respiratory Medicine* 7:54

Bakterie i endotoksyna bakteryjna w środowisku stanowią składnik bioaerozolu i drogą oddechową mogą przedostawać się do organizmu. Znaczenie endotoksyny w inicjacji śródmiąższowych chorób płuc jest dyskutowane ze względu na wpływ czynników środowiskowych na etiologię sarkoidozy i alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych. Postuluje się, że przewlekłe choroby płuc ujawniać się mogą u osób genetycznie predysponowanych pod wpływem ekspozycji na dym tytoniowy, zanieczyszczenie powietrza i endotoksynę obecną w środowisku⁸.

We wcześniejszych badaniach ustaliliśmy⁹, że w dymie tytoniowym, zarówno wdychanym bezpośrednio przez palacza (mainstream smoke), jak też w pomieszczeniu, w którym palono tytoń (ETS, environmental tobacco smoke, secondhand smoke) poziom endotoksyny wzrasta kilkadziesiąt razy. Narażenie na tak znaczne ilości tego bioaktywnego związku może mieć znaczenie w etiologii przewlekłych schorzeń płuc.

Założyliśmy, że inhalacja endotoksyny zawartej w bioaerozolu prowadzi do jej częściowej depozycji w płucach i stymulacji procesów patogennych. W celu weryfikacji tej tezy oznaczaliśmy markery endotoksyny za pomocą GCMS w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (bronchoalveolar lavage fluid, BALf) uzyskanych od pacjentów z diagnozą śródmiąższowych chorób płuc o podłożu środowiskowym. Jako kontrolę przyjęto grupę pacjentów z sarkoidozą, zaś wyniki porównywano z innymi parametrami diagnostycznymi płynu BAL - całkowitą i procentową zawartością komórek: makrofagów, limfocytów, neutrofilii i eozynofili. Badanie prowadziłam we współpracy z dr hab. med. J. Domagałą-Kulawik z Kliniki Pneumonologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Zaobserwowaliśmy pozytywną korelację markerów endotoksyny i eozynofilii oraz negatywną korelację markerów endotoksyny i proporcji makrofagów w BALf. Zgodnie z przewidywaniami, najniższe stężenie markerów endotoksyny odnotowano u pacjentów z sarkoidozą, zaś dwukrotnie wyższe u osób cierpiących na śródmiąższowe schorzenia płuc związane z paleniem tytoniu. Negatywna korelacja z poziomem makrofagów może świadczyć o braku aktualnie przebiegającej infekcji, potencjalnie aktywującej makrofagi posiadające na powierzchni receptor CD14, który wiąże LPS w przebiegu zapalenia, co zapoczątkowuje reakcję zapalną.

Oznaczanie markerów endotoksyny okazało się przydatne w różnicowaniu śródmiąższowych chorób płuc; może być również pomocne w ustaleniu ich etiologii w związku z wysoką, środowiskową ekspozycją pacjenta na endotoksynę obecną w bioaerozolu.

⁸ Seibold MA, Schwartz DA. (2011) The lung: the natural boundary between nature and nurture. *Annu Rev Physiol* 73:457-478

⁹ Larsson L., Szponar B., Pehrson C. (2004) Tobacco smoking increases dramatically air concentrations of endotoxin. *Indoor Air* 14, 421-424;

Szponar B., Pehrson C., Larsson L. (2012) Bacterial and fungal markers in tobacco smoke. *Sci Total Environ* 438: 447-451

Szponar B (2010) Endotoxins in environmental and clinical samples assessed by GC-tandem MS. W: *Detection of Biological Agents for the Prevention of Bioterrorism*, J. Banoub (Ed.); Series: NATO Science for Peace and Security, Series A: Chemistry and Biology. Springer, pp.245-265

Artykuł (rozdział w publikacji pokonferencyjnej) jest przeglądem dotychczasowych doświadczeń w oznaczaniu markerów endotoksyny w środowisku i w materiale diagnostycznym, uzupełnionym o badania flory jelitowej u pacjentów cierpiących na chorobę Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Przedstawiono także wyniki monitorowania noworodków i niemowląt, która dywersyfikuje się wraz ze zmianą diety i rozwojem dziecka.

Etiologia choroby Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego nie jest w całości poznana. Bakteryjna flora jelitowa, skłonność genetyczna oraz ogólny stan odporności upośledzają obronę organizmu przed patogennym wpływem bakterii Gram-ujemnych. Stwierdzono, że polimorfizm w zakresie niektórych genów, np. Asp299Gly w TLR4 – receptorze lipopolisacharydu, jest związany z nieprawidłowym przekazywaniem sygnału i zwiększoną wrażliwością na bakterie Gram-ujemne w przebiegu obu omawianych chorób.

Ocena flory bakteryjnej jelita grubego opiera się na klasycznych metodach hodowli oraz na technikach analizy podjednostki 16S rRNA. Metody te nie są doskonałe – ponad połowy bakterii zasiedlających jelito grube nie udaje się wyhodować w warunkach laboratoryjnych, a metody molekularne ogranicza limit detekcji 10^6 bakterii w gramie materiału. Zaproponowaliśmy alternatywne podejście do kompleksowej analizy jelitowego konsorcjum bakteryjnego za pomocą chemicznych markerów mikroorganizmów.

Celem badań była charakterystyka osobniczej flory Gram-ujemnej jelita grubego oznaczanej w stolcu, i korelacja ze stanem klinicznym pacjentów. Testy przeprowadzono w trzech grupach: cierpiących na chorobę Leśniowskiego-Crohna, chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych.

Główne kwasy 3-hydroksylowe wykryte w próbkach stolca to 3-OH *n*C16:0 i 3-OH *izo*C17:0. Znaczące statystycznie różnice pomiędzy grupami dotyczyły kwasu 3-OH *anteizo*C15:0, podwyższonego w obu grupach chorych oraz 3-OH *n*C17:0 i 3-OH *izo*C18:0, których poziom był znacząco niższy w grupie cierpiących na chorobę Leśniowskiego-Crohna. Interesującą zależność zaobserwowano u pacjenta z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, u którego porównywano profil markerów bakterii Gram-ujemnych w aktywnej fazie choroby i w jej remisji. Kwas 3-OH *n*C14:0, marker rodziny *Enterobacteriaceae* wzrastał, a 3-OH *izo*C17:0 malał w fazie aktywnej w stosunku do fazy remisji choroby, co pozostaje w zgodzie z doniesieniami o dominującej roli zmiany flory jelitowej w kierunku dominacji szczepów zdolnych do adhezji do ściany jelita, do których należą także liczne szczepy patogenne *E. coli*. Stany zapalne jelita grubego charakteryzują się załamaniem tolerancji organizmu wobec własnej flory jelitowej, co wiąże się z nieprawidłowym rozwojem fenotypu prozapalnego. Uważa się, że wczesna ekspozycja na endotoksynę i bakterie Gram-ujemne prawidłowo ukierunkowuje rozwój układu odpornościowego ku tolerancji własnej, komensalnej flory jelitowej.

W podsumowaniu stwierdza się, że chociaż profil 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych nie jest sposobem identyfikacji rodzajowej bakterii, może uzupełniać panel nieinwazyjnych metod diagnozowania i przebiegu przewlekłych schorzeń jelita grubego poprzez monitorowanie mikroflory w różnych fazach choroby.

W pracy także podjęto kwestię endogennych kwasów 3-hydroksylowych – przejściowych metabolitów β -oksydacji kwasów tłuszczowych u organizmów wyższych, o których jest mowa wcześniej (artykuły 2,3). Sposobem na rozróżnienie endogennych od bakteryjnych 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych jest analiza pochodnych chiralnych. W niniejszej pracy przeprowadzono oznaczanie diaizomerów 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych: oznaczane w GCMS formy *R* pochodnych kwasów 3-OHFAs są unikalnymi markerami lipidu A lipopolisacharydu, podczas gdy formy o konfiguracji *S* są pochodnymi produktów przejściowych degradacji lipidów u organizmach wyższych – *S*-3-hydroksy-palmito-koenzymu A, pojawiającego się podczas cyklu β -oksydacji.

Przeprowadzono analizę konfiguracji absolutnej standardów chemicznych i materiału biologicznego w dwóch eksperymentach: (i) porównano przeprowadzony w chiralne pochodne standard chemiczny 3-OH nC13:0 oraz lipopolisacharyd bakterii *Pectinatus cerevisiiphilus* o nietypowej strukturze lipidu A, zawierającej trzynastowęglowe reszty acylowe. Analiza GCMS wykazała w standardzie chemicznym dwa bliźniacze szczyty pozostających w równowadze izomerów *R* i *S*, natomiast w preparacie bakteryjnym obecny był tylko szczyt pochodzący od izomeru *R*; (ii) degradacji chemicznej poddano materiał diagnostyczny – ślinę osób dorosłych i próbki stolca niemowląt; w obu materiałach reprezentowane były tylko izomery *R*, charakterystyczne dla kwasów 3-hydroksylowych budujących lipid A u bakterii Gram-ujemnych.

Ustalono, że poza krwią materiał diagnostyczny jest wolny od endogennych form podobnych w analizie do bakteryjnych 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych, zatem metodę można stosować w kolejnych aplikacjach.

ZA NAJWAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘTE REZULTATY UWAŻAM:

- I. Opracowanie metody oznaczania 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych we krwi i tkankach narządowych: wątrobie, mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym w materiale zwierzęcym;
- II. Opracowanie metody oznaczania 3-OHFAs, dostosowanej do materiału klinicznego różnego typu: surowicy, śliny, kału i oskrzelowego płynu popłuczynowego;
- III. Oznaczenie markerów bakterii Gram-ujemnych we krwi i wątrobie szczurów gnotobiotycznych i z hodowli konwencjonalnej;
- IV. Oznaczenie markerów bakterii Gram-ujemnych i dystrybucji endotoksyny do różnych organów u szczurów z laboratoryjną endotoksemią ostrą i przewlekłą;
- V. Uzyskanie profilu 3-OHFAs, markerów LPSu, w ślinie osób zdrowych i u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (*periodontitis*), świadczącego o zmienionej florze bakteryjnej w przebiegu choroby;
- VI. Uzyskanie profilu 3-OHFAs, markerów LPSu, u osób zdrowych i u pacjentów cierpiących na przewlekłe choroby jelita grubego: chorobę Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego;
- VII. Wykazanie zastosowania 3-OHFAs jako markerów endotoksyny, różnicujących choroby śródmiąższowe układu oddechowego o różnej etiologii;
- VIII. Wykazanie zastosowania 3-OHFAs jako markerów endotoksyny jako narzędzia diagnostycznego w monitorowaniu endotoksემii w przebiegu operacji kardiochirurgicznych;
- IX. Wykazanie możliwości zastosowania 3-OHFAs jako markerów bakterii Gram-ujemnych i endotoksyny w różnicowaniu stanów chorobowych, w których zmienność flory bakteryjnej ma znaczenie w określeniu stopnia zaawansowania choroby, ze wskazaniem aplikacji w badaniach przesiewowych, jako parametr pomocniczy.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

PODSUMOWANIE

Mój dorobek naukowy obejmuje współautorstwo w **24** anglojęzycznych pracach oryginalnych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (w tym pierwszy autor - 8 prac) i 18 artykułów w pozostałych czasopismach, autorstwo 1 rozdziału w książce, autorstwo i współautorstwo 7 prac przeglądowych, 64 komunikatów zjazdowych, 10 referatów wygłoszonych na międzynarodowych gremiach naukowych oraz 2 patenty krajowe.

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, impact factor) prac oryginalnych wynosi **44,119** (punktacja MNiSW: **797**). Do dnia 22 lutego 2013 r., według bazy Web Of Science (WOS), prace były cytowane **308** razy (wyłączono autocyтовania).

Łączny IF artykułów objętych rozprawą habilitacyjną wynosi **11,33** (MNiSW: **135**), przy ilości cytowań **38**.

W ramach działalności naukowej uczestniczyłam w 2 międzynarodowych projektach badawczych, 4 projektach badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz 2 projektach uczelnianych.

A) PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Struktura i właściwości biologiczne lipidów polarnych w osłonach komórkowych promieniowców (aktynobakterii)

Przedmiotem mojej pracy doktorskiej oraz zainteresowań na początku pracy naukowej były wzajemne relacje właściwości chemicznych i biologicznych glikolipidów bakteryjnych, stanowiących istotny składnik osłon komórkowych przedstawicieli klasy *Actinobacteria*. Jest to ciekawa grupa mikroorganizmów podlegająca ciągłym korektom taksonomicznym, obejmująca rodzaje o różnorodnych właściwościach fizjologicznych, których większość wchodzi w skład mikroflory gleby i powietrza oraz zasiedla środowiska zawilgoconych pomieszczeń. Niektóre znane są jako bezwzględne i oportunistyczne patogeny ludzi i zwierząt.

W tym czasie brałam udział w pracach Laboratorium Aktynomikologii IITD PAN, kierowanym przez prof. dr hab. Halinę Mordarską, które doprowadziły do ustalenia struktury glikolipidu głównego, charakterystycznego markera dla przedstawicieli rodzaju *Saccharopolyspora*; glikolipid wykazywał również właściwości immunogenne (Zał. 3¹⁰: I.1.1. **Art. 1**). Ten kierunek badań kontynuowałam w badaniach struktury glikolipidów promieniowca *Rhodococcus equi*, wywołującego okresowe epizooty zapalenia płuc u źrebiąt i prowadzi do znacznych strat w hodowli koni sportowych; opisano również przypadki rodokokozy u osób pracujących w stadninach. Za pomocą technik analitycznych, w tym chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GCMS) i NMR, stwierdziłam obecność charakterystycznego glikolipidu o strukturze monomikolanu glukozy, estryfikowanym przy węglu 6 resztą kwasu mikołowego o zmiennej długości łańcucha ok. 38-42 atomów węgla; wyniki te przedstawiłam na konferencjach (Zał. 3: X.1. **konf. 2,3**). Uzyskane królicze surowice odpornościowe wykorzystałam do opracowania testu immunoenzymatycznego, który potwierdził antygenowość glikolipidu głównego *Rh. equi* (Zał. 3: X.1. **konf. 3,4**). Wykazałam również zdolność tego glikolipidu do

¹⁰ Załącznik 3 – Wykaz opublikowanych prac naukowych: artykułów (*Art.*) i doniesień konferencyjnych (*konf.*)

stymulacji produkcji cytokin prozapalnych i interferonu γ przez mysie makrofagi otrzewnowe (Zał. 3: X.1. **konf. 5,7,8**). Osiągnięcia te stały się podstawą mojej rozprawy doktorskiej pt. „Struktura i właściwości biologiczne glikolipidów bakterii oportunistycznych *Rhodococcus equi*” i zostały opublikowane w latach 1996-1997 w dwóch pracach (Zał. 3: I.1.2. **Art.3**; I.2.2. **Art. 1**).

Diagnostyka aktynobakterioz z wykorzystaniem markerów glikolipidowych

Uczestnicząc w pracach Lab. Aktynomikologii (które następnie weszło w strukturę Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Gamiana) podjęłam temat wykorzystania glikolipidów promieniowców jako markerów infekcji u pacjentów. Początkowo glikolipidy były stosowane w taksonomii jako markery promieniowców i bakterii promieniowcopodobnych, które po zmianach w systematyce w 1997 roku weszły w skład obszernej klasy aktynobakterii. Prawidłowe rozpoznanie czynnika etologicznego aktynobakterioz sprawia trudności nawet doświadczonym diagnostom klinicznym; nasze Laboratorium prowadziło rejestrację rozpoznanych przypadków oraz akcję informacyjną, m.in. poprzez publikację artykułów przeglądowych w czasopismach przeznaczonych dla klinicznych laboratoriów diagnostycznych i lekarzy (Zał. 3: I.2.2. **Art. 2,3,4,5,11**) i na konferencjach (Zał. 3: X.1. **konf. 9,10**).

W odpowiedzi na nasze publikacje do laboratorium napływały bakteryjne izolaty kliniczne, przesyłane w celu dokładnej identyfikacji potwierdzającej lub wykluczającej infekcję promieniowcami. W ramach wspólnych prac naszego laboratorium wykonywałam część analiz chemicznych, testów immunoenzymatycznych oraz stymulacji produkcji cytokin dla dwóch izolatów klinicznych; wyniki badań były publikowane i prezentowane na konferencjach (Zał. 3: I.2.1. **Art. 1**; X.1. **konf. 3,5,11**).

B) PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych otrzymałam stypendium Instytutu Szwedzkiego (Visby stipendiet) na odbycie stażu podoktorskiego na Uniwersytecie w Lund, Dept. of Laboratory Medicine, Sect. of Medical Microbiology, w laboratorium kierowanym przez prof. L. Larssona (Laboratory of Microbial Metabolomics), w którym wiodącą tematyką są chemiczne markery mikroorganizmów oznaczane w złożonych, trudnych do analizy próbkach środowiskowych, za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Po zakończeniu 14-miesięcznego stażu współpraca była kontynuowana poprzez moich kilkanaście średnio- i krótkookresowych pobyków naukowych w tamtejszym laboratorium i zaowocowała wspólnymi projektami grantowymi i licznymi publikacjami. Jednocześnie w rodzimej jednostce (Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej IITD PAN) rozwijałam dalsze badania lipidów promieniowców w ramach dwóch grantów MNiSW, a także podjęłam nowe tematy, opisane poniżej.

Właściwości biologiczne lipidów w osłonach komórkowych aktynobakterii

Po uzyskaniu doktoratu i odbyciu stażu kontynuowałam prace dotyczące charakterystyki powierzchniowych struktur chemicznych i biologicznych właściwości promieniowców chorobotwórczych jako główny wykonawca, a następnie kierownik projektów grantowych (Zał. 3: VII, **grant 2,3**). Wyniki prezentowane były na konferencjach: opisujące strukturę glikolipidów aktynobakterii oportunistycznych *Oerskovia xantineolytica* (Zał. 3: X.2. **konf. 9,27,31,36**); właściwości glikolipidów charakterystycznych dla *Nocardiosis dassonvillei* (Zał. 3: X.1. **konf. 11**; X.2. **konf. 25,30,34**) i bifidobakterii (Zał. 3: X.2. **konf. 28,29**), dotyczące chemiotaksonomicznej identyfikacji izolatów klinicznych aktynobakterii zawierających kwasy mikołowe (Zał. 3: X.2. **konf. 5,10,19,22,48**).

oraz lokalizacji lipidów polarnych w strukturach osłon komórkowych promieniowców *Gordonia bronchialis*, *Rh. equi* i *Saccharophlysoira hirsuta* (Zał. 3: X.2. **konf. 12,17,18,32**).

Zastosowanie produkcyjnego odpadu browarniczego do wytworzenia podłoża hodowlanego do namnażania promieniowców

Wysokobiałkowe odpady powstające podczas produkcji piwa są wykorzystywane w przemyśle spożywczym i rolnictwie, głównie jako wzbogacenie nawozów. We współpracy z dr E. Dey z Pure and Applied Biochemistry Dept., Lund University w Szwecji, otrzymaliśmy materiał (frakcję białkową) z młóta browarnianego. Na jej podstawie opracowaliśmy nowe podłoże mikrobiologiczne do hodowli aktynobakterii, które stwarza warunki szczególnie wydajnego wytwarzania pseudozarodników przez bakterie *Streptomyces* spp. Jest to cecha pożądana w różnych aplikacjach mikrobiologicznych, wyniki stały się zatem podstawą krajowego zgłoszenia patentowego (Zał. 3: **patent 1**), zostały także opublikowane (Zał. 3: I.2.1. **Art. 8**).

Analiza profilu estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAMES) za pomocą GCMS w materiałach biologicznych

Analiza jakościowa i ilościowa FAMES z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas jest szeroko stosowana w mikrobiologii ze względu na możliwość ustalenia charakterystycznego profilu, za pomocą którego można prowadzić różnicowanie zbliżonych do siebie taksonów, zarówno otrzymanych w warunkach hodowli czystych kultur bakteryjnych, jak też złożonych próbek środowiskowych. Właściwości te wykorzystywałam w celu identyfikacji kwasów tłuszczowych budujących lipid A bakterii Gram-ujemnych: *Helicobacter* spp, (Zał. 3: I.2.1. **Art. 14**; X.1. **konf. 12**; X.2. **konf. 20**) i *Bacteroides* spp. (Zał. 3: I.2.2. **Art. 6**; X.1. **konf. 12**; X.2. **konf. 2**), w ramach współpracy z innymi ośrodkami badawczymi.

Interesującą współpracę nawiązałam z Katedrą i Kliniką Pediatrii, Immunologii i Reumatologii Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, z którą wspólnie podjęliśmy zagadnienie wpływu diety wegetariańskiej u dzieci na poziom wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w surowicy w korelacji z parametrami klinicznymi. Wyniki zostały opublikowane (Zał. 3: I.2.1. **Art. 21**), a współpraca jest kontynuowana w ramach dwóch grantów (Zał. 3: VII, **grant 8 i 9**).

Właściwości bakteriobójcze nowosyntezyowanych związków chemicznych

w ramach współpracy z Wydz. Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, Wydz. Farmacji Uniwersytetu Medycznego i Wydz. Chemicznym Politechniki Wrocławskiej wykonuję testy aktywności bakteriobójczej i bakteriostatycznej nowosyntezyowanych (w w/w jednostkach) związków chemicznych o różnych strukturach, właściwościach fizycznych i chemicznych, w postaci stałej i rozpuszczalnych w roztworach wodnych. Stosuję szereg metod mikrobiologicznych indywidualnie dostosowywanych do nowych substancji, które po przeprowadzeniu badań przesiewowych są poddawane dalszym badaniom aplikacyjnym. Wyniki badań aktywności nowych pochodnych triazoli stały się podstawą patentu (Zał. 3: II, **patent 2**) i zostały zaprezentowane na konferencji (Zał. 3: X.2. **konf. 41**); inne, dotyczące nieorganicznych związków srebra, były opublikowane (Zał. 3: I.2.1. **Art. 20**; X.2. **konf. 54**).

Ocena infestacji mikrobiologicznej w zawilgoconych budynkach

Podczas stażu podoktorskiego w Laboratory of Microbial Metabolomics w Lund University w Szwecji rozpoczęłam projekt, w ramach którego opracowałam metodykę oznaczania chemicznych markerów mikroorganizmów w materiałach budowlanych i kurzu organicznym w pomieszczeniach zawilgoconych z powodu błędów konstrukcyjnych lub zniszczeń budynku spowodowanych przez wody powodziowe. Projekt dotyczył m.in. obiektów, które podczas katastrofalnej powodzi w 1997 r. na Dolnym Śląsku znalazły się pod wodą, a po ustąpieniu powodzi zostały ponownie zajęte przez mieszkańców. Stwierdziłam, że w różnych materiałach budowlanych stężenie markerów bakterii Gram-ujemnych (3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych), ogólnej biomasy bakteryjnej (kwasu muraminowego, składnika peptydoglikanu) i grzybów (ergosterolu, składnika ściany komórkowej grzybów) wzrasta od kilku do kilkudziesięciu razy, zwiększając narażenie zdrowotne użytkowników, m.in. na przewlekłe schorzenia górnych dróg oddechowych i alergię (Zał. 3: I.2.1. **Art. 2,3,7,10**; X.2. **konf. 7,8,16**).

Oznaczanie poziomu narażenia na składniki mikrobiologiczne powietrza pomieszczeń zamkniętych (indoor air)

W czasie wieloletniej współpracy naukowej z Laboratory of Microbial Metabolomics, Lund University, uczestniczyłam w wielośrodkowych projektach badawczych, których centrum stanowiły badania ekspozycji na drobnoustroje i ich produkty obecne w powietrzu pomieszczeń, w mieszkaniach, domach i miejscach pracy, w których współczesny człowiek spędza ponad 90% czasu. Wyniki były korelowane z występowaniem przewlekłych schorzeń układu oddechowego, w tym astmy i alergii. Moje zadania polegały na analizie za pomocą GCMS gromadzonych w różnych ośrodkach badawczych materiałów (prób kurzu organicznego) pod względem zawartości markerów mikroorganizmów. Do najważniejszych osiągnięć tego projektu należy publikacja kilku prac (z moim współautorstwem), w których oznaczany przeze mnie poziom endotoksyn włączono do panelu testów mających na celu ustalenie etiologii epidemii alergii (Zał. 3: I.2.1. **Art. 9,17**; X.2. **konf. 15**), stały się podstawą wprowadzenia norm narażenia zawodowego na endotoksynę, bakterie i ich metabolity (Zał. 3: I.2.1. **Art. 12,13,19**; X.2. **konf. 21,43,50**) oraz określały poziom endotoksyny i markera grzybów pleśniowych w przedszkolach w krajach różnych stref klimatycznych (Zał. 3: I.2.1. **Art. 11**; X.2. **konf. 23,24**).

Endotoksyna w dymie tytoniowym

Za najciekawsze i najważniejsze osiągnięcie, w którym miałam udział współpracując z Laboratory of Microbial Metabolomics, Lund University, uważam publikację dotyczące nieoczekiwanie wysokiej zawartości endotoksyny bakteryjnej w tytoniu i dymie tytoniowym. Opierając się na wcześniejszym doniesieniu o wykryciu endotoksyny w ekstrakcie dymu tytoniowego za pomocą testu LAL, oznaczyliśmy za pomocą GCMS poziom markerów endotoksyny w powietrzu pomieszczenia biurowego wypełnionego dymem. Okazało się, że wypalenie jednego papierosa 60-krotnie zwiększyło w pomieszczeniu stężenie endotoksyny (Zał. 3: I.2.1. **Art. 15**). Obserwacja ta zapoczątkowała serię publikacji i doniesień konferencyjnych, w których omawialiśmy obecność LPSu w papierosach nabytych w różnych krajach i kontynentach oraz poziom stężenia endotoksyn w dymie tytoniowym w środowisku pomieszczeń (Zał. 3: X.2. **konf. 33,37,38,40,44,46,52,53,57,63,64**). Okazało się, że w zadymionych pomieszczeniach poziom endotoksyny jest podobny do notowanych w przemyśle

spożywczym i rolnictwie, gdzie stanowi znany czynnik narażenia zawodowego (Zał. 3: I.2.1. **Art. 22**; I.2.2. **Art. 9**; X.2. **konf. 61**).

Ustaliliśmy także profil 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych, markerów endotoksyny w dymie tytoniowym: dominują 3-OH *n*C14:0 i 3-OH *n*C12:0, których źródłem są bakterie powszechnie zasiedlające liście tytoniowe na plantacjach, a także namnażające się w trakcie procesów fermentacji liści tytoniowych. Z liści tytoniu zebranych w terenie wyhodowaliśmy bakterie *Pantoea* sp., co pozostaje w zgodzie z danymi z literatury, podającymi *Pantoea agglomerans* jako jeden z gatunków dominujących na tych roślinach (Zał. 3: I.2.1. **Art. 19**).

Współpraca w tej dziedzinie była prowadzona w ramach grantu (Zał. 3: **grant 6**) i jest kontynuowana.

27.02.2013r.

Bogumiła Szponar

dr Bogumiła Szponar