

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Im. Ludwika Hirszfelda we
Wrocławiu

Polska Akademia Nauk



ROZPRAWA DOKTORSKA

Mgr Justyna Rewak-Soroczyńska

Badania aktywności biologicznej jonów lantanowców i jonów metali przejściowych oraz nanomateriałów na bazie hydroksyapatytu współdomieszkowanych tymi jonami wobec *Pseudomonas aeruginosa*

Promotor: Prof. dr hab. Rafał J. Wigłusz

Promotor pomocniczy: Dr Agata Dorotkiewicz-Jach

Rozprawa doktorska została zrealizowana w Oddziale Fizykochemii Biomedycznej Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polskiej Akademii Nauk we współpracy z Zakładem Biologii Patogenów i Immunologii na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

Wrocław, 2023

Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy

Polish Academy of Sciences



DOCTORAL DISSERTATION

Justyna Rewak-Soroczyńska (MSc)

Study of the biological activity of lanthanide and transition metal ions
as well as nanosized hydroxyapatite co-doped with those ions against
Pseudomonas aeruginosa

Supervisor: Prof. dr hab. Rafał J. Wiglusz

Auxiliary supervisor: Dr Agata Dorotkiewicz-Jach

The doctoral dissertation was carried out Division of Biomedical Physico-Chemistry,
Institute of Low Temperature and Structural Research, Polish Academy of Sciences in
cooperation with the Department of Pathogen Biology and Immunology, Faculty of
Biological Sciences, University of Wrocław.

Wrocław, 2023

Chciałabym serdecznie podziękować:

Panu Promotorowi, **prof. dr hab. Rafałowi Wigłuszowi**, za umożliwienie realizowania tematu rozprawy doktorskiej pod jego kierownictwem, za okazane wsparcie, cierpliwość i zaufanie. Przed wszystkim dziękuję za daną mi szansę, otwartość na moje pomysły oraz stworzenie wspaniałego Zespołu w Oddziale Fizykochemii Biomedycznej w Instytucie Niskich Temperatur i Badań strukturalnych PAN.

Pani Promotor Pomocniczej, **dr Agacie Dorotkiewicz-Jach** z Zakładu Biologii Patogenów i Immunologii na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, za ogromną pomoc merytoryczną i wsparcie podczas realizacji badań oraz pisanie i edycji rozprawy. Dziękuję również za cierpliwość, wyrozumiałość, cenne rady i przekazaną wiedzę.

Pani **prof. dr hab. Zuzannie Drulis-Kawie**, kierownikowi Zakładu Biologii Patogenów i Immunologii na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, za umożliwienie realizacji badań oraz wszelką pomoc merytoryczną.

Panu **dr hab. inż. Rafałowi Ogórkowi**, kierownikowi Zakładu Mykologii i Genetyki na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, za umożliwienie realizacji części badań oraz współpracę naukową.

Pani **dr Agacie Piecuch** z Zakładu Mykologii i Genetyki na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, za wszelką pomoc, cenne rady, współpracę naukową i okazane wsparcie podczas całego okresu kształcenia.

Całemu Zespołowi z Oddziału Fizykochemii Biomedycznej INTiBS PAN, a szczególnie koleżankom z „Miami” za ogromną pomoc i wsparcie. Szczególnie dziękuję **dr Katarzynie Szyszce**, **dr Paulinie Sobierajskiej**, **dr inż. Sarze Targońskiej**, **mgr Nicole Nowak** i **mgr inż. Marcie Kardach** za wspólnie realizowane badania naukowe, wsparcie psychiczne i koleżeńską atmosferę.

Całemu Zespołowi z Zakładu Biologii Patogenów i Immunologii WNB UWr, za pomoc i koleżeńską atmosferę.

Mężowi oraz całej Rodzinie, za wsparcie i cierpliwość.

Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały częściowo opublikowane w poniższych publikacjach:

1. **Rewak-Soroczynska, J.**, Dorotkiewicz-Jach, A., Drulis-Kawa, Z., Wiglusz, R.J., Culture Media Composition Influences the Antibacterial Effect of Silver, Cupric, and Zinc Ions against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomolecules* 2022, 12, 963. doi.org/10.3390/biom12070963
2. **Rewak-Soroczynska, J.**, Nowak, N., Targonska, S., Piecuch, A., Wiglusz, R.J. The Study of Nanosized Silicate-Substituted Hydroxyapatites Co-Doped with Sr²⁺ and Zn²⁺ Ions Related to Their Influence on Biological Activities. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022, 44, 6229-6246. doi:10.3390/cimb44120425
3. Sobierajska, P., Nowak, N., **Rewak-Soroczynska, J.**, Targonska, S., Lewińska A., Grosman L., Wiglusz, R.J. Investigation of topography effect on antibacterial properties and biocompatibility of nanohydroxyapatites activated with zinc and copper ions: In vitro study of colloids, hydrogel scaffolds and pellets. *Biomaterials Advances.* 2022, 134, 112547. doi:10.1016/j.msec.2021.112547.
4. Targonska, S., **Rewak-Soroczynska, J.**, Piecuch, A., Paluch, E., Szymanski, D., & Wiglusz, R. J. (2020). Preparation of a New Biocomposite Designed for Cartilage Grafting with Antibiofilm Activity. *ACS Omega*, 5(38), 24546–24557. doi:10.1021/acsomega.0c03044.

Oraz zostały zaprezentowane na następujących konferencjach krajowych i międzynarodowych:

1. PREZENTACJA: **Justyna Rewak-Soroczyńska**, Agata Dorotkiewicz-Jach, Rafał J. Wiglusz. Wpływ różnych stężeń jonów europu (Eu³⁺) i miedzi (Cu²⁺) na wzrost bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. VII Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne metody analityczne w farmacji i medycynie", Wrocław 2022. – **Nagroda za zajęcie II miejsca.**
2. PREZENTACJA: **Justyna Rewak-Soroczynska**, Paulina Sobierajska and Rafal J. Wiglusz. Antimicrobial activity of nanocrystalline hydroxyapatites doped and co-doped with Zn²⁺ and Cu²⁺ ions against Gram-negative bacteria. Open Readings, Wilno, 2022.

3. PREZENTACJA: **Justyna Rewak-Soroczyńska**, Agata Dorotkiewicz-Jach and Rafał J. Wigłusz. Wpływ jonów lantanowców na wzrost i wirulencję *Pseudomonas aeruginosa*. Tygiel, Lublin, 2022.
4. POSTER: **J. Rewak-Soroczynska**, K. Syszka, A. Dorotkiewicz-Jach, Z. Drulis-Kawa, R. J. Wigłusz. Antipseudomonal activity of nanohydroxyapatites doped and co-doped with Cu^{2+} and Eu^{3+} obtained via co-precipitation and hydrothermal methods. AMBRA, Wrocław, 2022.
5. POSTER: **Justyna Rewak-Soroczynska**, Nicole Nowak, Sara Targonska, Agata Piecuch and Rafał J. Wigłusz. New approach to antibacterial activity and safety evaluation of nanosized silicon-substituted hydroxyapatite co-doped with Zn^{2+} and Sr^{2+} ions. Open Readings, Wilno, 2019.

Część teoretyczna rozprawy doktorskiej dotycząca aktywności biologicznej jonów lantanowców została opublikowana jako rozdział monografii:

1. **Justyna Rewak-Soroczyńska**, Agata Dorotkiewicz-Jach¹, Rafał J. Wigłusz. Przegląd badań aktywności biologicznych jonów lantanowców [Rozdział monografii: Postępy w naukach przyrodniczych: stan obecny i perspektywy] Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o. 2022, s. 162-167.

Spis treści

STRESZCZENIE	11
SUMMARY	13
WYKAZ SKRÓTÓW	15
WYKAZY RYCIN I TABEL	18
I. WSTĘP	24
I.1 Charakterystyka patogenności <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
I.2 Nowoczesne alternatywne strategie w walce z zakażeniami wywołanymi przez wielolekooporne szczepy <i>P. aeruginosa</i>	36
I.2.1 Nanotechnologia jako alternatywna terapia przeciwbakteryjna	39
I.2.2 Hydroksyapatyt wapnia	43
I.2.3 Właściwości fizykochemiczne i biologiczne oraz zastosowanie jonów lantanowców	48
I.2.4 Aktywność antybakteryjna i cytotoksyczność różnych form metali przejściowych: srebra, miedzi i cynku	55
II. CEL ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	62
III. MATERIAŁY I METODY	63
III.1 Biologiczne modele badawcze	63
III.2 Jony lantanowców oraz jony metali przejściowych	67
III.2.1 Aktywność biologiczna roztworów jonów lantanowców i jonów metali przejściowych bloku d	68
III.2.1.1 Badanie aktywności antybakteryjnej (wyznaczenie MIC i sub-MIC)	68
III.2.1.2 Pomiar ilości wytworzonego biofilmu	71
III.2.1.3 Pomiar ilości uwolnionego eDNA	72
III.2.1.4 Pomiar poziomu produkcji pirocjaniny, piowerdyny i elastazy w hodowlach w obecności badanych jonów	73
III.2.1.5 Badanie wpływu jonów lantanowców na ruch typu <i>swimming</i> , <i>swarming</i> i <i>twitching</i>	75
III.2.2 Wpływ badanych jonów na właściwości powierzchniowe komórki	76
III.2.2.1 Pomiar hydrofobowości powierzchni komórek bakteryjnych inkubowanych w obecności jonów lantanowców	76
III.2.2.2 Pomiar kąta zwilżania i wyznaczenie wartości energii swobodnej powierzchni komórek bakteryjnych	77

III.2.2.3 Badanie wpływu jonów lantanowców na przepuszczalność osłon komórkowych <i>P. aeruginosa</i>	77
III.2.2.4 Wyznaczenie wartości ładunku powierzchniowego komórki (potencjał zeta) i wielkości promienia hydrodynamicznego	78
III.2.3 Badanie wpływu jonów lantanowców na hemolizę i morfologię erytrocytów baranich.....	79
III.2.4 Wpływ jonów lantanowców na wrażliwość <i>P. aeruginosa</i> na substancje antybakteryjne.....	79
III.2.4.1 Wyznaczenie minimalnych stężeń hamujących (MIC) i frakcyjnych stężeń hamujących (FIC) gentamycyny i ciprofloksacyny w obecności jonów lantanowców..	79
III.2.4.2 Wyznaczenie wartości MIC i FIC dla jonów europu i miedzi oraz ich połączeń oraz badanie zmian dynamiki wzrostu hodowli bakteryjnych.....	82
III.3 Badanie aktywności biologicznej różnych związków na bazie hydroksyapatytu domieszkowanych jonami metali przejściowych bloku d oraz jonami Eu^{3+}	83
III.3.1 Analiza zawartości jonów w hydroksyapatytach domieszkowanych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} oraz analiza uwalniania jonów w różnych mediach.....	86
III.3.2 Badanie aktywności antybakteryjnej hydroksyapatytów.....	87
III.3.2.1 Liczebność bakterii w obecności hydroksyapatytów.....	87
III.3.2.2 Wzrost bakterii w obecności różnych form hydroksyapatytów.....	89
III.3.2.3 Badanie wpływu różnych form hydroksyapatytów na formowanie biofilmu ..	90
III.3.2.4 Określenie poziomu cytotoksyczności nanomateriałów.....	91
III.3.2.5 Ocena wpływu związków hydroksyapatytu wapnia na hemolizę i morfologię erytrocytów	91
III.4 Analiza statystyczna otrzymanych wyników.....	92
IV. WYNIKI	93
IV.1 Badanie aktywności biologicznej wolnych jonów lantanowców i jonów metali przejściowych	93
IV.1.1 Wpływ obecności wolnych jonów lantanowców w stężeniach subinhibicyjnych na wzrost i wirulencję <i>P. aeruginosa</i>	93
IV.1.2 Obecność w hodowli jonów lantanowców wpływa na aktywność antybakteryjną ciprofloksacyny i gentamycyny wobec szczepów <i>P. aeruginosa</i>	112
IV.1.3 Wpływ subinhibicyjnych stężeń jonów lantanowców na toksyczność wobec erytrocytów	115

IV.1.4 Aktywność antybakteryjna jonów metali przejściowych wobec <i>P. aeruginosa</i>	117
IV.1.5 Aktywność biologiczna jonów Cu ²⁺ oraz Eu ³⁺ stosowanych w połączeniu wobec <i>P. aeruginosa</i> oraz komórek eukariotycznych.....	120
IV.2 Charakterystyka aktywności biologicznych różnych form hydroksyapatytów domieszkowanych lantanowcami i metalami przejściowymi	127
IV.2.1 Charakterystyka nanohydroksyapatytów domieszkowanych wybranymi jonami metali przejściowych bloku d.....	127
IV.2.2 Badania aktywności biologicznej hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Eu ³⁺ i Cu ²⁺	136
IV.2.3 Cytotoksyczność nanomateriałów na bazie hydroksyapatytu domieszkowanego jonami Eu ³⁺ i Cu ²⁺ wobec erytrocytów i osteoblastów	148
V. DYSKUSJA.....	153
VI. WNIOSKI	173
VII. LITERATURA	175
VIII. MATERIAŁY DODATKOWE	194
DOROBEK NAUKOWY	207

Streszczenie

Pseudomonas aeruginosa to groźny patogen oportunistyczny człowieka, którego charakteryzuje obecność wielu czynników wirulencji, wysoka antybiotykooporność oraz zdolność do wywoływania infekcji w miejscach wszczepów. Z tego względu istnieje konieczność poszukiwania materiałów implantacyjnych wykazujących dodatkowo działanie antybakteryjne. Dobrym kandydatem jest hydroksyapatyt wapnia ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) – nietoksyczny, wysoce biokompatybilny materiał o potencjale osteoregeneracyjnym, który naturalnie występuje w organizmie człowieka jako składnik kości i zębów. Struktura tego związku umożliwia jego modyfikację poprzez zastąpienie jonów wapnia (Ca^{2+}) innymi jonami, co pozwala na otrzymanie związków o określonych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych. Wprowadzenie do struktury jonów metali przejściowych (jonów srebra (Ag^+), cynku (Zn^{2+}) czy miedzi (Cu^{2+})) daje możliwość otrzymania materiałów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Materiały mogą być również modyfikowane strukturalnie jonami lantanowców (Ln^{3+}) ze względu na ich zdolność do luminescencji wykorzystywaną w bioobrazowaniu. O ile wpływ jonów metali przejściowych na komórki bakteryjne jest dosyć dobrze opisany w literaturze, tak niewiele wiadomo jak wpływają na nie jony lantanowców.

Jednym z głównych celów badań była ocena, czy subinhibycyjne stężenia jonów lantanowców (Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , Lu^{3+}) wpływają na wirulencję *P. aeruginosa* (biofilm, wytwarzanie plicjaniny, piowerdyny, elastazy, ruch typu *swimming*, *swarming* i *twitching*). Zbadano również wpływ wybranych jonów na właściwości powierzchniowe komórki (ładunek powierzchniowy, hydrofobowość, przepuszczalność osłon) oraz określono ich cytotoksyczność na modelu erytrocytów. Dodatkowo sprawdzono wpływ obecności tych jonów na efekt antybakteryjny ciprofloksacyny i gentamycyny oraz jonów miedzi (Cu^{2+}). W badaniach wykazano, że obecność jonów lantanowców w stężeniach subinhibycyjnych istotnie zwiększała produkcję biofilmu bakteryjnego, nieznacznie zmieniała właściwości powierzchniowe komórek oraz powodowała zmianę przepuszczalności osłon komórkowych. Ponadto wykazano, że stosowane stężenia (0,5MIC) były cytotoksyczne i powodowały widoczne zmiany w morfologii erytrocytów oraz ich aglomerację, bez wycieku hemoglobiny.

W drugiej części rozprawy doktorskiej zbadano aktywność antybakteryjną hydroksyapatytu wapnia domieszkowanego i współdomieszkowanego jonami metali

przejęciowych i jonami Eu^{3+} . Sprawdzono wpływ obecności poszczególnych form (materiał sproszkowany, koloid, materiał prasowany (tabletki), materiały wprowadzone do matrycy hydrożelowej oraz ich eluaty) na przeżywalność, wzrost i formowanie biofilmów przez *P. aeruginosa*. Określono również jak wstępne uwalnianie jonów z wybranych materiałów do podłoża wpływa na ich aktywność antybakteryjną. Dla wybranych związków określono również cytotoksyczność na modelu erytrocytów oraz linii komórkowej osteoblastów mysich. W badaniach wykazano wysoką aktywność antybakteryjną nanomateriałów domieszkowanych jonami Ag^+ , szczególnie w formie tabletek. W przypadku jonów Zn^{2+} jako domieszek wykazano obniżenie liczebności bakterii po inkubacji w obecności koloidów wykonanych z materiałów modyfikowanych przez substytucję grup fosforanowych grupami krzemianowymi. Aktywność antybakteryjną wykazano również dla materiałów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Cu^{2+} . W przypadku nanomateriałów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Cu^{2+} i Eu^{3+} wykazano różnice w rzeczywistej ilości wbudowanych jonów, w porównaniu z ilością teoretyczną oraz różnice w uwalnianiu jonów do podłoża, z czego wynikają prawdopodobnie różnice w ich aktywności antybakteryjnej oraz cytotoksyczności. Wykazano, że wstępne uwolnienie jonów do podłoża hodowlanego poprawia ich aktywność, co może wyjaśniać zwiększone działanie eluatów w porównaniu z materiałami sproszkowanymi. Badane nanomateriały, szczególnie te domieszkowane jonami Cu^{2+} , wykazywały toksyczność wobec erytrocytów oraz osteoblastów. Nie wykazano natomiast istotnego wpływu jonów Eu^{3+} na aktywność antybakteryjną jonów Cu^{2+} .

Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, że pomimo, że obecność jonów lantanowców istotnie wpływa na wirulencję i właściwości powierzchniowe komórek *P. aeruginosa* to mogą być one wykorzystywane jako domieszki w nanomateriałach o potencjalnym zastosowaniu w implantologii. Przemawia za tym zwłaszcza fakt, że ich stężenia w hydroksyapatycie wapnia są dużo niższe niż stężenia 0,5MIC, dla których obserwowano efekty przedstawione w niniejszej rozprawie.

Summary

Pseudomonas aeruginosa is a human opportunistic pathogen characterized by the presence of many virulence factors, high antibiotic resistance and the ability to cause infections at implant sites. For this reason, there is a need to search for implantation materials with an additional antibacterial effect. A good candidate is hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), a non-toxic, highly biocompatible material with osteoregenerative potential, which naturally occurs in the human body as a component of bones and teeth. It is possible to modify it by partial substitution of calcium ions (Ca^{2+}), which allows obtaining compounds with specific physicochemical and biological properties. Calcium substitution with transition metal ions (silver Ag^+ , zinc Zn^{2+} or copper Cu^{2+}) allows to obtain materials with antimicrobial activity. They can also be modified by the addition of lanthanide ions (Ln^{3+}) due to their luminescence ability which can be used in bioimaging. While the effect of transition metal ions on bacterial cells is well described in the literature, little is known about the effect of lanthanide ions.

One of the main objectives of the study was to assess whether subinhibitory concentrations of lanthanide ions (Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , Lu^{3+}) affect the virulence of *P. aeruginosa* (biofilm, production of pyocyanin, pyoverdine, elastase, swimming, swarming and twitching motility). The influence of selected ions on the surface properties of the cell (surface charge, hydrophobicity, membrane permeability) was also examined and their cytotoxicity was determined on the model of erythrocytes. Additionally, the influence of the presence of these ions on the antibacterial effect of ciprofloxacin and gentamicin as well as copper ions (Cu^{2+}) was evaluated. The studies showed that the presence of lanthanide ions in subinhibitory concentrations significantly increased the production of bacterial biofilm, slightly changed the surface properties of cells and caused a change in the permeability of cell membranes. In addition, it was shown that the concentrations used (0.5MIC) were cytotoxic and caused visible changes in the morphology of erythrocytes and their agglomeration, without leakage of hemoglobin.

In the second part of the work, the antibacterial activity of hydroxyapatites doped and co-doped with transition metal ions and Eu^{3+} ions was examined. The influence of the presence of different forms (powdered material, colloid, pressed material (tablets), materials introduced into the hydrogel matrix and their eluates) on the survival, growth and formation of biofilms by *P. aeruginosa* was checked. It was also determined how the

initial release of materials into the medium affects their antibacterial activity and, for selected compounds, the cytotoxicity was determined on the model of erythrocytes and a mouse osteoblast cell line. Studies have shown high antibacterial activity of nanomaterials doped with Ag^+ ions, especially in the form of tablets. In the case of Zn^{2+} ions as dopants, a decrease in the number of bacteria after incubation in the presence of colloids made of materials modified by substitution of phosphate groups with silicate groups was demonstrated. Antibacterial activity was also demonstrated for materials doped and co-doped with Cu^{2+} ions. In the case of nanomaterials doped and co-doped with Cu^{2+} and Eu^{3+} ions, significant differences were found in the actual amount of incorporated ions, compared to the assumed amount, and differences in the release of ions to the substrate, which probably results from their altered antibacterial activity and cytotoxicity. Pre-release of ions into the culture medium has been shown to improve their activity, which may explain the better performance of eluates compared to powdered materials. The tested nanomaterials, especially those doped with Cu^{2+} ions, showed toxicity towards erythrocytes and osteoblasts. However, there was no significant effect of Eu^{3+} ions on the antibacterial activity of Cu^{2+} ions.

The obtained results allow to conclude that although the presence of lanthanide ions significantly affects the virulence and surface properties of *P. aeruginosa* cells, they can be used as dopants in nanomaterials with potential application in implantology. This is especially supported by the fact that their concentrations in hydroxyapatites are much lower than the concentrations of 0.5MIC, for which the effects presented in this thesis were observed.

Wykaz skrótów

AHL – ang. *N-acyl homoserine lactones*; laktony N-acylo homoserynowe

AMP – ang. *antimicrobial peptides*; peptydy przeciwdrobnoustrojowe

ATP – adenozyno-5'-trifosforan

BATH – ang. *bacterial adhesion to hydrocarbon*

BHI – bulion *Brain Heart Infusion*

CF – ang. *cystis fibrosis*; mukowiscydoza

CFTR – ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*; błonowy regulator przewodnictwa

CFU – ang. *colony forming unit*; jednostka tworząca kolonię

CLSM – ang. *confocal laser scanning microscopy*; mikroskopia konfokalna

CV – ang. *crystal violet*; fiolet krystaliczny

DGC – ang. *diguanylate cyclase system*

DLS – ang. *dynamic light scattering*

DMEM – ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

ECR – ang. *Elastin-Congo red*

EDAX – ang. *energy-dispersive X-ray spectrometer*

eDNA – ang. *extracellular DNA*; DNA pozakomórkowe

EDTA – ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*; kwas wersenowy

eEF2 – ang. *eukaryotic elongation factor 2*

ELISA – ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*

EnaC – ang. *epithelial sodium channel*

EPS – ang. *exopolymeric substances*; macierz zewnątrzkomórkowa

EUCAST ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FBS – ang. *fetal bovine serum*; surowica bydlęca

FIC – ang. *fractional inhibitory concentration*; frakcyjne stężenie hamujące

FT-IR – ang. *Fourier-transformed infrared-spectra*; spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera

GMP – Guanozyno-5'-monofosforan

GTP – guanozyno-5'-trifosforan

H – ang. *hydrothermal*; oznaczenie serii hydrotermalnej hydroksyapatytów

HAp – hydroksyapatyt

HGT – ang. *horizontal gene transfer*; horyzontalny transfer genów
ICP – ang. *inductively coupled plasma*; indukcyjnie wzbudzana plazma
IFN- γ – interferon γ
IL – interleukina
LB – bulion Luria Bretani
Ln³⁺ – jony lantanowców
LPS – lipopolisacharyd
MFP – ang. *periplasmic membranę Fusion protein*
MHA – podłoże stałe Mueller Hinton
MHB – bulion Mueller Hinton
MIC – ang. *minimal inhibitory concentration*; minimalne stężenie hamujące
MRI – ang. *magnetic resonance imaging*; rezonans magnetyczny
MTT – ang. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
NIR – ang. *near-infrared*; bliska podczerwień
NP – ang. *nanoparticle*; nanocząstka (w liczbie mnogiej NPs)
OD – ang. *optical density*; gęstość optyczna
OMF – ang. *outer-membrane factor*
P – ang. *precipitation*; oznaczenie serii strąceniowej hydroksypatytów
PBS – ang. *phosphate buffered saline*
PDI – ang. *polydispersity index*; wskaźnik polidispersji
PQS – 2-heptylo-3-hydroksy-4-chinolon
PTFE – ang. *poly-(tetrafluorethylene)*; poli(tetrafluoroetylen)
QAC – ang. *quaternary ammonium compound*; czwartorzędowe związki amonowe
QS – ang. *quorum sensing*
REE – ang. *rare-earth elements*; metale ziem rzadkich
RFT – reaktywne formy tlenu
RNA – kwas rybonukleinowy
RND – ang. *resistance-nodulation-division*
RVF – ang. *relative virulence factor*; względny czynnik wirulencji
SDS – ang. *sodium dodecyl sulfate*; dodecylosiarczan sodu
SEM – *scanning electron microscope*; skaningowy mikroskop elektronowy
SFE – ang. *surface free energy*; energia swobodna powierzchni

SPECT – ang. *single-photon emission computed tomography*; tomografia emisyjna pojedynczego fotonu

srRNA – ang. *small regulatory RNA*, małe regulatorowe RNA

Sub-MIC – stężenie subinhibicyjne

T1SS, T2SS, T3SS, T5SS, T6SS – systemy sekrecji typu I, II, III, V i VI

TCS – ang. *two-component system*

TNF- α – ang. *tumor necrosis factor α* ; czynnik martwicy nowotworów α

TSB – bulion tryptozowo-sojowy

UC – ang. *upconversion*; konwersja w górę

UV – ang. *ultra violet*; światło ultrafioletowe

XPRD – ang. *X-ray powder diffraction*; proszkowa dyfrakcja rentgenowska

Wykazy rycin i tabel

Wykaz rycin

Rycina 1. Najważniejsze czynniki wirulencji <i>P. aeruginosa</i>	27
Rycina 2. Specyficzność pomp efflux <i>P. aeruginosa</i> wobec wybranych grup antybiotyków	38
Rycina 3. Mechanizmy oporności <i>P. aeruginosa</i>	39
Rycina 4. Mechanizm antybakteryjnej aktywności nanocząstek metali.	43
Rycina 5. Mikro- i nanostruktura kości z uwzględnieniem miejsca występowania hydroksyapatytu	44
Rycina 6. Udział poszczególnych jonów lantanowców po jednoczesnym wyszukaniu haseł „luminescencja” i „kompleksy Ln”	51
Rycina 7. Wykorzystanie systemów opartych o nanocząstki UCNPs w terapiach antybakteryjnych.	54
Rycina 8. Mechanizm antybakteryjnej aktywności nanocząstek metali przejściowych oraz jonów metali przejściowych	56
Rycina 9. Porównanie stężeń poszczególnych składników w podłożach mikrobiologicznych.....	65
Rycina 10. Schemat przygotowania zawiesiny bakteryjnej i objętości pożywek oraz zawiesiny bakteryjnej dodawane do dołek płytek 96- i 24-dołkowych	66
Rycina 11. Schemat badań z udziałem jonów lantanowców	68
Rycina 12. Schemat podwójnych rozcieńczeń jonów lantanowców i ich uzyskane stężenia końcowe.....	69
Rycina 13. Schemat rozcieńczeń jonów metali przejściowych i ich uzyskane stężenia końcowe	71
Rycina 14. Schemat dwukrotnych rozcieńczeń testowanych antybiotyków: gentamycyny i ciprofloksacyny	80
Rycina 15. Schemat wykonania testu <i>checkerboard assay</i> dla antybiotyków (gentamycyny i ciprofloksacyny) oraz jonów lantanowców.....	81
Rycina 16. Schemat badań hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami europu (Eu^{3+}) i miedzi (Cu^{2+}).	86
Rycina 17. Wzrost <i>P. aeruginosa</i> w obecności subinhibicyjnych stężeń Ln^{3+}	94
Rycina 18. Tworzenie biofilmu barwionego fioletem krystalicznym przez <i>P. aeruginosa</i> w obecności subinhibicyjnych stężeń Ln^{3+}	95

Rycina 19. Obrazy CLSM biofilmów <i>P. aeruginosa</i> powstałych w obecności subinhibicyjnych stężeń Ln^{3+} w porównaniu z kontrolą (bez dodatku Ln^{3+}).	97
Rycina 20. Wpływ obecności jonów Ce^{3+} , Dy^{3+} , Er^{3+} i Lu^{3+} na grubość produkowanego biofilmu przez <i>P. aeruginosa</i>	99
Rycina 21. eDNA w hodowlach <i>P. aeruginosa</i> inkubowanych w obecności jonów lantanowców oraz w supernatancie pochodzonym, do którego dodano jony lantanowców	100
Rycina 22. Wpływ obecności subinhibicyjnych stężeń wybranych lantanowców na hydrofobowość powierzchni komórek <i>P. aeruginosa</i> przedstawioną jako odsetek komórek o powinowactwie do rozpuszczalników: ksylenu, octanu etylu i chloroformu	101
Rycina 23. Wartość kątów zwilżania wody i diiodometanu na powierzchni komórek bakteryjnych <i>P. aeruginosa</i> hodowanych w obecności jonów lantanowców	102
Rycina 24. Wykresy obrazujące pomiary potencjału zeta oraz obecność drugiego pików w próbach kontrolnych i tylko jednego pików w próbach inkubowanych w obecności jonów lantanowców.	103
Rycina 25. Przepuszczalność osłon komórkowych bakterii <i>P. aeruginosa</i> wyrażona jako % pochłoniętego przez komórkę fioletu krystalicznego w hodowlach 4 i 24 h w obecności wybranych jonów lantanowców	104
Rycina 26. Bezpośredni i względny pomiar poziomu produkcji piocyjaniny przez <i>P. aeruginosa</i> hodowanych w obecności jonów lantanowców.	105
Rycina 27. Poziom fluorescencji emitowanej przez piowerdynę wytwarzaną przez szczepy <i>P. aeruginosa</i>	106
Rycina 28. Bezpośredni i względny pomiar aktywności elastazy produkowanej przez <i>P. aeruginosa</i> poddanych działaniu jonów lantanowców.	108
Rycina 29. Porównanie zmian w wielkości promienia stref wzrostu <i>P. aeruginosa</i> w odniesieniu do próby kontrolnej.	109
Rycina 30. Ruch typu <i>swarming</i> w hodowlach <i>P. aeruginosa</i>	111
Rycina 31. Zmiany wartości MIC ciprofloksacyny i gentamycyny w obecności jonów lantanowców wobec <i>P. aeruginosa</i>	112
Rycina 32. Reprezentatywny obraz fuzji erytrocytów wywołanej przez obecność jonów Ln^{3+} w porównaniu z wodą destylowaną (kontrola negatywna) i roztworem SDS (kontrola pozytywna).	116
Rycina 33. Wpływ jonów lantanowców na erytrocyty	117

Rycina 34. Dynamika zmian gęstości hodowli <i>P. aeruginosa</i> w podłożu MOPS uzupełnionym jonami Eu^{3+} i Cu^{2+}	122
Rycina 35. Skumulowane wartości OD_{600} 48 h hodowli bakteryjnych inkubowanych w obecności różnych stężeń jonów miedzi (Cu^{2+}) i europu (Eu^{3+}).....	124
Rycina 36. Osad w medium po dodaniu jonów Eu^{3+} i po inkubacji z <i>P. aeruginosa</i> .	125
Rycina 37. Obrazy mikroskopowe hodowli bakteryjnych i kontroli negatywnych pożywek uzupełnionych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} barwionych różnymi technikami	126
Rycina 38. Zestawienie wyników badania aktywności antybakteryjnej różnych form apatytów domieszkowanych jonami srebra.....	130
Rycina 39. Zestawienie wyników badania aktywności antybakteryjnej różnych form apatytów z serii $\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}:\text{HAp}_{\text{Si}}$	131
Rycina 40. Zestawienie wyników badania aktywności antybakteryjnej różnych form apatytów z serii $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$	132
Rycina 41. Analiza mikroskopowa oddziaływań <i>P. aeruginosa</i> z koloidami $\text{nHAp}:\text{Cu}^{2+}-\text{Zn}^{2+}$	133
Rycina 42. Obraz mikroskopowy CLSM powierzchni implantu na bazie polilaktydu (poly(L-lactide-co-D,L-lactide) z dodatkiem hydroksyapatytu	134
Rycina 43. Biofilm <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 utworzony na ich powierzchni a) tabletek z serii $\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}:\text{HAp}_{\text{Si}}$, b) tabletek oraz c) hydrożeli z serii $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$	135
Rycina 44. Porównanie wpływu struktury powierzchni tabletek wykonanych z hydroksyapatytu z serii $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$ ($\text{nHAp}:\text{Zn}^{2+}$) na adhezję bakterii oraz komórek eukariotycznych	136
Rycina 45. Aktywność antybakteryjna nanomateriałów domieszkowanych i współdomieszkowanych Eu^{3+} i Cu^{2+} wobec <i>P. aeruginosa</i>	141
Rycina 46. Biofilmy <i>P. aeruginosa</i> utworzone w studzienkach mikro płytek po preinkubacji kultur bakteryjnych z hydroksyapatytami	143
Rycina 47. Wzrost <i>P. aeruginosa</i> w obecności eluatów powstałych po 24 h uwalnianiu nanomateriałów w pożywce.	147
Rycina 48. Absorbancja uwolnionej hemoglobiny i methemoglobiny po inkubacji erytrocytów przez 1, 4 i 7 dni w obecności hydroksyapatytów.	150
Rycina 49. Zabarwienie supernatantów po 7 dniach inkubacji erytrocytów z badanymi nanomateriałami.	150

Rycina 50. Żywotność komórek linii komórkowej osteoblastów 7F2 w obecności eluatów hydroksyapatytowych. 151

Wykaz rycin w Materiałach dodatkowych

Rycina S.1 Dyfraktogramy (XRD) uzyskane dla hydroksyapatytów otrzymywanych metodą hydrotermalną oraz współstrącaniową..... 194

Rycina S.2. Obrazy SEM wykonane dla materiałów hydroksyapatytowych współdomieszkowanych 5 mol% Eu^{3+} i 5 mol% Cu^{2+} uzyskanych metodą hydrotermalną i współstrącaniową..... 195

Rycina S.3. Wpływ Ln^{3+} na wzrost *P. aeruginosa*. 196

Rycina S.4. Udział procentowy obiektów o określonej wielkości promienia hydrodynamicznego [nm] w próbce badanej wyznaczony dla *P. aeruginosa* hodowanych w obecności jonów lantanowców. 198

Rycina S. 5. Pomiar absorbancji (maksimum absorbcji dla hemoglobiny) supernatantu po zwirowaniu frakcji erytrocytów 199

Rycina S.6.Wzrost bakterii *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 w podłożu MOPS o różnym pH (5,0-8,0) 199

Rycina S.7. Dynamika zmian gęstości hodowli *P. aeruginosa* w obecności roztworów jonów miedzi (Cu^{2+}) i europu (Eu^{3+}) o stężeniach innych niż prezentowane w głównej części rozprawy..... 200

Rycina S.8. Interakcje pomiędzy jonami miedzi Cu^{2+} a składnikami podłoży mikrobiologicznych obserwowano jako: a) zmętnienie, wytrącenie osadu, zmiana koloru przy stężeniu miedzi 1 mg/ml; b) zmiana pH podłoża MOPS i LB oraz wody przy różnych stężeniach miedzi; c) zmiana pH podłoży pełnych i minimalnych przy stężeniu miedzi 1 mg/ml. 200

Rycina S.9. Aktywność antybakteryjna pozostałych nanomateriałów domieszkowanych i współdomieszkowanych Eu^{3+} i Cu^{2+} wobec *P. aeruginosa*..... 201

Rycina S.10. Absorbancja uwolnionej hemoglobiny i methemoglobiny po inkubacji erytrocytów przez 1, 4 i 7 dni w obecności pozostałych hydroksyapatytów..... 204

Rycina S.11. Zdjęcia mikroskopowe erytrocytów wykonane po 1, 4 i 7 dniach inkubacji w obecności wybranych hydroksyapatytów. 206

Wykaz tabel

Tabela 1. Charakterystyka wybranych czynników wirulencji <i>P. aeruginosa</i>	29
Tabela 2. Mechanizmy oporności wrodzonej, nabytej i adaptacyjnej <i>P. aeruginosa</i> ...	36
Tabela 3. Wielkość promienia jonowego jonów lantanowców oraz jonu wapnia	49
Tabela 4. Składniki podłoży minimalnych wykorzystanych w badaniach	64
Tabela 5. Zestawienie nanomateriałów apatytowych domieszkowanych jonami metali przejściowych z uwzględnieniem ich formy oraz badań wykonanych.	84
Tabela 6. Wzory chemiczne oraz oznakowanie hydroksyapatytów domieszkowanych Eu^{2+} oraz Cu^{2+}	85
Tabela 7. Porównanie intensywności obrazów mikroskopowych.....	98
Tabela 8. Potencjał zeta (mV) wyznaczony dla komórek <i>P. aeruginosa</i> hodowanych w obecności jonów lantanowców.....	102
Tabela 9. Wartości potencjałów zeta (mV) z uwzględnieniem udziału procentowego obu pików wyznaczonych dla prób kontrolnych <i>P. aeruginosa</i>	103
Tabela 10. Wartości FIC obliczone dla ciprofloksacyny i jonów lantanowców	114
Tabela 11. Wartości FIC obliczone dla gentamycyny i jonów lantanowców.	114
Tabela 12. Porównanie wrażliwości szczepów wzorcowych <i>P. aeruginosa</i> na jony antybakteryjne (Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+}) w różnych podłożach	118
Tabela 13. Porównanie wrażliwości szczepów klinicznych <i>P. aeruginosa</i> na jony antybakteryjne (Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+}) w różnych podłożach	119
Tabela 14. Minimalne stężenia hamujące (MIC) Eu^{3+} i Cu^{2+} (samodzielnie i w połączeniu z drugim jonem) oraz odpowiadające im frakcyjne stężenia hamujące (FIC) wobec <i>P. aeruginosa</i>	121
Tabela 15. Porównanie intensywności obrazów mikroskopowych biofilmów na powierzchni tabletek i hydrożeli wykonanych z materiałów z serii $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$	135
Tabela 16. Stężenie jonów miedzi i europu wbudowanych oraz uwolnionych z nanohydroksyapatytów do mediów hodowlanych MOPS i DMEM.....	138
Tabela 17. Intensywność fluorescencji obrazów mikroskopowych biofilmów <i>P. aeruginosa</i> wstępnie inkubowanych w obecności wybranych hydroksyapatytów domieszkowanych Eu^{3+} i Cu^{2+}	144
Tabela 18. Wpływ hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} (bez i z wstępnym uwalnianiem jonów do pożywki) na wzrost <i>P. aeruginosa</i>	145

Wykaz tabel w Materiałach dodatkowych

Tabela S.1. Charakterystyka wrażliwości na antybiotyki szczepów <i>P. aeruginosa</i>	194
Tabela S.2. Analiza statystyczna wyników przedstawionych na Rycinie S.3	196
Tabela S.3. Stężenie eDNA ($\mu\text{g/ml}$) w hodowlach <i>P. aeruginosa</i> inkubowanych w obecności jonów lantanowców.	197
Tabela S.4. Wielkość promienia hydrodynamicznego (dominanta) oraz współczynnik polidispersyjności PDI wyznaczone dla <i>P. aeruginosa</i> hodowanych w obecności jonów lantanowców.	197
Tabela S.5. Istotności statystyczne różnic pomiędzy wartościami OD_{600} hodowli uzyskanych po 24- i 48-godzinnej inkubacji <i>P. aeruginosa</i> w obecności hydroksyapatytów.....	202
Tabela S.6. Wpływ pozostałych hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} (bez i z wstępnym uwalnianiem jonów do pożywki) na wzrost <i>P. aeruginosa</i>	203
Tabela S.7. Istotność statystyczna różnic pomiędzy wartościami absorpcji hemoglobiny i methemoglobiny zmierzonymi po 1, 4 i 7 dniach inkubacji erytrocytów w obecności hydroksyapatytów.....	205

I. WSTĘP

W drugiej połowie XX wieku rozpoczęła się tzw. złota era antybiotyków przypadająca na lata 1950-1970 (Aminov 2010). Odkryto wówczas wiele leków skutecznych wobec patogenów człowieka ograniczając występowanie infekcji bakteryjnych wśród ludzi. Niestety, w ciągu ostatnich dekad zaczęto obserwować wśród licznych patogenów narastającą lekooporność na dotychczas skuteczne antybiotyki, co nasiliło konieczność poszukiwania nowych leków oraz alternatywnych terapii antibakteryjnych (Dorotkiewicz-Jach et al. 2015).

Jednym z wielolekoopornych patogenów charakteryzujących się zdolnością do szybkiej adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych, w tym do obecności leków przeciwbakteryjnych oraz dezynfektantów, jest *Pseudomonas aeruginosa*. Został on zakwalifikowany do grupy patogenów ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, ***Pseudomonas aeruginosa*** i *Enterobacter spp.*), które powodują niezwykle trudne do wyleczenia infekcje ze względu na niewrażliwość na dostępne leki (Dorotkiewicz-Jach et al. 2015). Infekcje z udziałem *P. aeruginosa* są szczególnie niebezpieczne u osób cierpiących na mukowiscydozę, gdzie bakterie tworzą w drogach oddechowych odporne na antybiotyki biofilmy (Rossi et al. 2021). Infekcje *P. aeruginosa* u pacjentów hospitalizowanych, mogą prowadzić do zapalenia płuc w przypadku stosowania wspomaganego oddychania z użyciem respiratora, infekcji dróg moczowych u osób cewnikowanych czy ogólnoustrojowych zakażeń krwi (Moradali et al. 2017). Ponadto *P. aeruginosa* jest jednym z najczęstszych patogenów, spośród bakterii Gram-ujemnych, powodujących zakażenia pooperacyjne w tym okołowszczepowe. Taka infekcja może powodować znaczne utrudnienie i wydłużenie procesu gojenia lub nawet odrzucenie wszczepu (Arciola and Campoccia 2018; Cerioli et al. 2020).

Wszczepienie implantu tkankowego, poza oczywistymi korzyściami dla pacjenta, może niestety również prowadzić do powikłań spowodowanych rozwinieniem się infekcji w miejscu wszczepu. Skutkuje to najczęściej znacznym wydłużeniem gojenia lub nawet prowadzi do odrzucenia implantu. W celu uniknięcia zakażenia bakteryjnego w obszarze zabiegowym, podczas operacji stosuje się techniki aseptyczne, w tym zapobiegawczą antybiotykoterapię, natomiast w związku z rosnącą lekoopornością istotne jest poszukiwanie dodatkowych metod zapobiegania zakażeniom. Jednym z proponowanych rozwiązań jest możliwość modyfikacji implantów tak, aby miały właściwości

antybakteryjne (Gimeno et al. 2015). Modyfikowane materiały w implantologii są obecnie przedmiotem zainteresowania wielu naukowców, a nadzieje związane z ich wykorzystaniem w procedurach terapeutycznych w przyszłości stale rosną (Rewak-Soroczynska et al. 2022b). Przykładem nanomateriału o właściwościach regeneracyjnych, który wykorzystywany jest do wytwarzania implantów kostnych jest hydroksyapatyt wapnia (HAp). Hydroksyapaty cechują się wysoką biokompatybilnością oraz stosunkowo niską toksycznością względem komórek eukariotycznych, dlatego mogą znaleźć zastosowanie jako materiał budulcowy implantów tkankowych (Targonska et al. 2022). Ponadto, HAp występuje naturalnie w organizmie człowieka jako jeden ze składników budujących zęby i kości, dlatego materiały oparte na HAp mogą stymulować wzrost i regenerację tkanki kostnej, która uległa uszkodzeniu na skutek urazu mechanicznego lub choroby nowotworowej (Kolmas et al. 2014; Tite et al. 2018).

Materiały o strukturze hydroksyapatytu można modyfikować strukturalnie przez wprowadzenie dodatkowych jonów, takich jak jony lantanowców (Ln^{3+}) tzw. metali ziem rzadkich (ang. *rare-earth elements*, REE), które od wielu lat są w kręgu zainteresowania naukowców. Ze względu na zdolność do emitowania luminescencji wykorzystuje się je jako sondy w bioobrazowaniu medycznym (Evans 1983). Do struktury tych związków można również wprowadzać jony o udowodnionej skuteczności antybakteryjnej, na przykład kationy miedzi (Cu^{2+}), cynku (Zn^{2+}) czy srebra (Ag^+) co pozwala na połączenie działania antybakteryjnego z możliwością bioobrazowania.

Wpływ jonów lantanowców na komórki bakteryjne a także ich wpływ na aktywność antybiotyków i jonów o działaniu antybakteryjnym zarówno w formie wolnej jak i współdomieszek w nanoapatytach wciąż jest słabo poznany i stanowi przedmiot badań tej rozprawy doktorskiej.

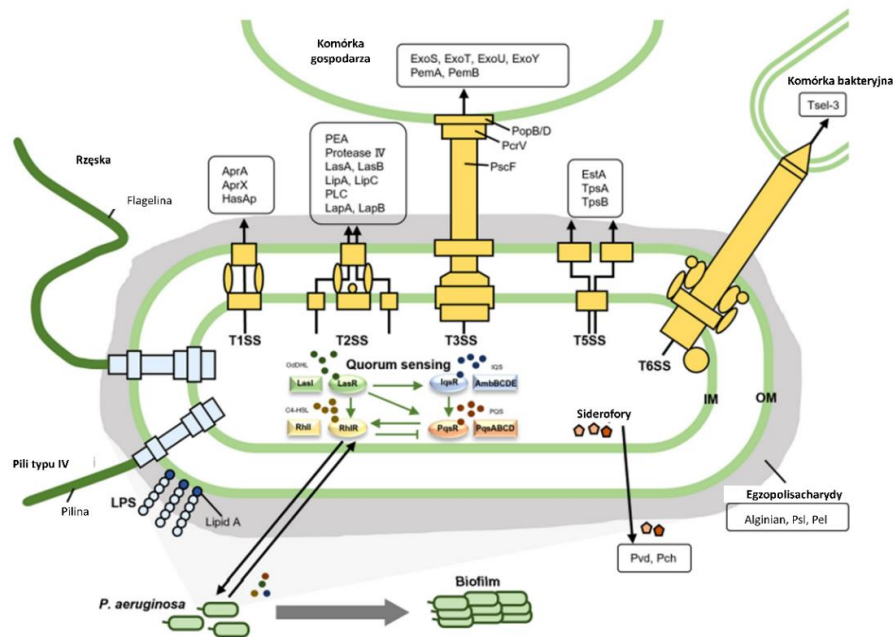
I.1 Charakterystyka patogenności *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa to Gram-ujemna pałeczka należąca do rodziny *Pseudomonaceae*, której cechą wyróżniającą ją spośród innych patogenów jest produkcja wielu barwników nadających hodowli najczęściej zielonkawy kolor oraz charakterystyczny zapach przypominającym, według różnych źródeł, jaśmin, tortillę lub winogrona (Sykes 2014; Wu et al. 2015). Wydłużona komórka wyposażona jest w pojedynczą, umiejscowioną na jednym z biegunów, rzęskę co wpływa na wysoką ruchliwość bakterii. Na powierzchni komórki znajdują się również struktury zaliczane do fimbrii oraz pili typu IV

odpowiedzialne za adhezję oraz ruch *twitching motility*. Niektóre szczepy wytwarzają dodatkowo polisacharydową otoczkę (alginian), która nadaje śluzowaty wygląd koloniom (Sykes 2014).

P. aeruginosa powszechnie bytuje w środowisku wodnym, w glebie i na roślinach oraz może przetrwać w niekorzystnych warunkach, np. w paliwie lotniczym czy środkach do dezynfekcji (Sykes 2014). Izolowany jest również ze skóry, błon śluzowych i kału człowieka oraz innych zwierząt. Ze względu na fakt, że jest to patogen oportunistyczny to zagrożenie stanowi głównie dla osób z obniżoną odpornością, w szczególności hospitalizowanych (Sykes 2014; Arciola and Campoccia 2018). Pomimo oportunistycznego charakteru *P. aeruginosa* zaliczany jest do grupy patogenów ESKAPE, czyli sześciu najbardziej wirulentnych i lekoopornych bakterii, które są odpowiedzialne za większość zakażeń szpitalnych (Mulani et al. 2019; Huszczyński et al. 2020). *P. aeruginosa* jest również jednym z głównych czynników prowadzących do powikłań (w tym zgonów) u osób chorujących na mukowiscydozę (ang. *cystic fibrosis*, CF), w wyniku rozwijającej się ciężkiej infekcji płuc (Huszczyński et al. 2020).

P. aeruginosa wzbudza coraz większy niepokój ze względu na wysoką lekooporność naturalną i nabytą oraz wysoką plastyczność genomu umożliwiającą szybkie przystosowywanie się patogenu do dynamicznie zmieniających się warunków środowiskowych (Azam and Khan 2019). Ponadto bakterie te znane są z produkcji szerokiej gamy czynników wirulencji oraz strategii przetrwania, które ułatwiają kolonizację i infekcję w organizmie gospodarza. Można je podzielić na czynniki powierzchniowe (rzęska, fimbrie, pili, LPS, alginian) oraz substancje wydzielane poza komórkę (pigmenty (piocyjanina, piowerdyna, piorubina i piomelanina), siderofory (piowerdyna, piochelina), enzymy (proteazy, fosfolipazy) i egzotoksyny) (Guła et al. 2018). Do czynników wirulencji *P. aeruginosa* najczęściej zaliczane są adhezyny, systemy sekrecji (głównie typu III) i zdolność do produkcji biofilmu (**Rycina 1.**) (Sykes 2014; Dorotkiewicz-Jach et al. 2021).



Rycina 1. Najważniejsze czynniki wirulencji *P. aeruginosa* (Liao et al. 2022)

Adhezja do tkanek gospodarza jest jednym z ważniejszych etapów w rozwoju infekcji bakteryjnej. Jest ona możliwa dzięki obecności specjalnych struktur na powierzchni komórek: fibrii typu IV – warunkujących adhezję do komórek nabłonka gospodarza; rzęsek – odpowiedzialnych za wiązanie z mucynami na powierzchni komórek nabłonkowych; oraz oligosacharydowego rdzenia LPS – warunkującego adhezję do białka CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, błonowy regulator przewodnictwa) w komórkach nabłonka (Wu et al. 2015).

W dalszych etapach rozwoju infekcji kluczową rolę odgrywają wydzielane na zewnątrz komórki patogenu czynniki wirulencji warunkujące wniknięcie, namnażanie się oraz rozprzestrzenianie w organizmie gospodarza. Z tego względu bakterie *P. aeruginosa* wykształciły zdolność do aktywnego wydzielania czynników wirulencji do środowiska lub bezpośrednio do wnętrza komórek gospodarza poprzez systemy sekrecji, głównie typu I (T1SS), II (T2SS), III (T3SS), V (T5SS) i VI (T6SS). Każdy z systemów sekrecji odgrywa istotną rolę w wydzielaniu innego zestawu determinant wirulencji zależnego od miejsca, czasu i etapu infekcji. T1SS odpowiada między innymi za wydzielanie proteazy alkalicznej AprA czy białka HasAp odpowiadającego za wiązanie hemu, T2SS za wydzielanie istotnych czynników wirulencji: LasA, LasB, PrpL, egzotoksyny A, picyjaniny oraz fosfolipazy C, natomiast T3SS pozwala na wprowadzenie toksycznych

białek bezpośrednio do komórek gospodarza i prowadzi do ich uszkodzenia. Typ V - T5SS odpowiada za wydzielenie białek EstA, LepB i LepA, a typ VI przypomina działaniem system III (Wu et al. 2015; Guła et al. 2018). Spośród wymienionych toksyn wydzielanych przez *P. aeruginosa* najważniejsze są: toksyna A, ramnolipid, elastaza, proteaza alkaliczna i fosfolipaza C (Wu et al. 2015). Ich działanie zostało opisane w tabeli poniżej (**Tabela 1**).

Wśród czynników wirulencji charakterystycznych dla *P. aeruginosa* można również wymienić barwniki. Pierwszy z nich - piocyjanina jest niebieskozielonym pigmentem fenazyńowym odpowiedzialnym za nadawanie charakterystycznego koloru *Pseudomonas* spp. W komórce bakteryjnej odgrywa on istotną rolę związaną z pozyskiwaniem jonów żelaza, *quorum sensing* (QS) i tworzeniem biofilmu (Jayaseelan et al. 2014). Inny barwnik, piowerdyna, znany jest głównie ze zdolności do wiązania i transportu jonów żelaza jako siderofor. Możliwa jest jednak również chelatacja innych kationów metali, co zwiększa ochronę komórki przed toksycznymi jonami (Visca et al. 2007). Piowerdyna jest wydzielana z komórek za pomocą pomp efflux PvdRT-OmpQ (Guła et al. 2018).

Wirulencja jest nierozzerwalnie związana z uszkodzaniem komórek gospodarza co m.in. umożliwia zdobycie składników odżywczych ale także rozprzestrzenianie się infekcji. W związku z tym ogromne znaczenie mają produkowane przez patogen enzymy proteolityczne degradujące białka. Jednym z takich enzymów jest elastaza, specyficzna dla białka elastyny (Wretling and Pavlovskis 1983). Kolejnym ważnym czynnikiem wirulencji jest również LPS, który stanowi integralną część błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych, gdzie warunkuje oddziaływanie pomiędzy komórką a środowiskiem. LPS zbudowany jest z trzech części: lipidu A, oligosacharydowego rdzenia i antygeny O. Obecność LPS na powierzchni komórki utrudnia penetrację substancji z zewnątrz. Swobodnemu wnikaniu roztworów o charakterze polarnym zapobiega lipidowy charakter błony zewnętrznej, natomiast polarne grupy LPS ograniczają przenikanie substancji lipidowych (Huszczynski et al. 2020). Ważną cechą *P. aeruginosa* jest także zdolność do „pływania”, czyli poruszania się w środowisku o niskiej lepkości. Wyróżnia się trzy podstawowe typy ruchu: *swimming motility*, w którym wykorzystywana jest siła napędowa rzęski; *swarming motility*, polegające na poruszaniu się na powierzchni oraz *twitching motility*, wykorzystujące pili typu IV (Ha et al. 2014b; Ha et al. 2014a; Turnbull and Whitchurch 2014).

Tabela 1. Charakterystyka wybranych czynników wirulencji *P. aeruginosa*

Czynnik wirulencji	Charakterystyka	Funkcje	Źródło
LPS	Część błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych; zbudowany z lipidu A, rdzenia oligosacharydowego i antygeny O	Odpowiada za oddziaływania pomiędzy komórką bakteryjną a środowiskiem; utrudnia penetrację substancji do wnętrza komórki; bierze udział w wiązaniu jonów metali; endotoksyna	(Shephard et al. 2008; Huszczyński et al. 2020)
Egzotoksyna A	Enzym z klasy mono-ADP-rybozylotransferaz	Hamuje syntezę białek w komórkach eukariotycznych (modyfikuje i inaktywuje eEF-2 – ang. <i>eukaryotic elongation factor 2</i>); aktywuje kaspazy prowadzące komórkę na drogę apoptozy; hamuje wydzielanie IL-18; zmniejsza produkcję TNF- α , IL-6, IL-8 i IL-10.	(Wu et al. 2015; Jurado-Martín et al. 2021)
Elastazy (LasA LasB)	Enzymy proteolityczne: LasB – obojętna metaloproteaza (kofaktor: Zn ²⁺ /Ca ²⁺); LasA – metaloproteaza (kofaktor: Zn ²⁺)	LasB – enzym degradujący składniki macierzy pozakomórkowej (elastynę, kolagen typu III i IV, lamininę, fibronektynę i witronektynę); wpływa na odpowiedź układu odpornościowego gospodarza. LasA – enzym degradujący elastynę	(Wu et al. 2015; Galdino et al. 2019)
Proteaza alkaliczna	Enzym (Zn ²⁺ -metaloproteinaza), zawiera N-koniec wiążący metale oraz C-koniec wiążący jony Ca ²⁺ .	Aktywuje kanał sodowy (<i>epithelial sodium channel</i> (EnaC) w przebiegu mukowiscydozy; degraduje ludzki IFN- γ ; hamuje zużycie tlenu przez neutrofile stymulowane opsynizowanym zymosane; degraduje lamininę i fibronektynę.	(Wu et al. 2015; Jurado-Martín et al. 2021)
Fosfolipaza C	Enzym; Rodzaje: hemolityczna fosfolipaza C (PlcH), niehemolityczna fosfolipaza C (PlcN) oraz fosfolipaza C (PlcB).	Katalizuje syntezę diacyloglicerolu w komórkach eukariotycznych, co wpływa między innymi na apoptozę, onkogenezę oraz procesy zapalne; degraduje fosfatydylocholinę i sfingomielinę w błonach komórkowych oraz wpływa na uszkodzenie surfaktantu płucnego.	(Wu et al. 2015)
Piocyanina	Niebieskozielony pigment fenazykowy	Bierze udział w pozyskiwaniu żelaza, <i>quorum sensing</i> (QS) i tworzeniu biofilmu; nasila stres oksydacyjny; uszkodza komponenty komórkowe (enzymy, DNA), co prowadzi do apoptozy; stymuluje uwalnianie eDNA, co nasila formowanie biofilmów	(Jayaseelan et al. 2014; Jurado-Martín et al. 2021)

Piowerdyna	Siderofor; chromopeptyd; składa się z krótkiego łańcucha peptydowego przyczepionego do diaminodihydroksychinoliny; barwnik fluorescencyjny	Chelatuje kationy metali (głównie żelaza); pośredniczy w dostarczeniu żelaza do komórki; bierze udział w ochronie komórki bakteryjnej przed toksycznymi jonami metali;	(Braud et al. 2010)
Piochelina	Siderofor; pochodna tiazolidyny	Chelatuje kationy metali (głównie żelaza); pośredniczy w dostarczeniu żelaza do komórki; bierze udział w ochronie komórki bakteryjnej przed toksycznymi jonami metali;	(Braud et al. 2010)
Ramnolipidy	Biosurfaktanty glikozydowe zbudowane z mono- lub diramnozy przyłączonej do 3-hydroksy kwasów tłuszczowych. Za ich syntezę odpowiadają produkty genów <i>rlhA</i> , <i>rlhB</i> i <i>rlhC</i> , których ekspresja jest regulowana przez system <i>quorum sensing</i> (QS).	Zaburzają aktywność makrofagów; hamują transport śluzoworzęskowy; wpływają na <i>swarming motility</i> i formowanie biofilmu <i>P. aeruginosa</i> ; biorą udział w dyspersji biofilmów; zwiększają <i>twitching motility</i> w środowisku z niedoborem żelaza; degradują surfaktant płucny; degradują połączenia pomiędzy komórkami w nabłonku oddechowym.	(Ha et al. 2014a; Wu et al. 2015; Jurado-Martín et al. 2021)
Białka efektorowe ExoS, ExoT, ExoU i ExoY	ExoS i ExoT – ADP-rybozylotransferazy (ADPRT) i białka aktywujące GTPazę (<i>GTPase-activating protein</i> , GAP); ExoU – lipaza; ExoY – cyklaza adenylanowa.	ExoS – wpływa na wewnątrzkomórkowy transport pęcherzykowy, proliferację, różnicowanie się komórek oraz apoptozę; wpływa na przetrwanie i rozpowszechnianie bakterii w płucach. ExoT – hamuje podziały komórek eukariotycznych i utrudnia gojenie. ExoU – fosfolipaza powodująca lizę komórek eukariotycznych, bierze udział w szoku septycznym. ExoY – działanie proapoptotyczne.	(Wu et al. 2015; Behzadi et al. 2021)
Alginian	Polimer kwasu D-mannuronowego i kwasu L-guluronowego, jego synteza jest zależna od działania operonu <i>algD</i>	Główny czynnik wpływający na śmiertelność u pacjentów z mukowiscydozą; odpowiada za wystąpienie śluzowatego wyglądu kolonii; nie jest niezbędny do wytworzenia biofilmu bakteryjnego, ale wpływa na jego strukturę (stabilizuje); odpowiada za zatrzymywanie wody i składników odżywczych wewnątrz biofilmów; chroni <i>P. aeruginosa</i> przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza hamując aktywność układu dopełniacza i fagocytozę przez makrofagi i neutrofile; sekwestruje wolne rodniki wydzielane	(Sykes 2014; Rasamiravaka et al. 2015; Wu et al. 2015; Jurado-Martín et al. 2021)

		przez komórki układu odpornościowego; wpływa na aktywność innych czynników wirulencji al. T3SS oraz rzęski; może wiązać antybiotyki aminoglikozydowe utrudniając ich penetrację do wnętrza biofilmu.	
Pel	Polisacharyd zawierający podjednostki glukozy	Zaangażowany w tworzenie biofilmu	(Rasamiravaka et al. 2015; Wu et al. 2015)
Psl	Polisacharyd składający się z powtarzających się podjednostek pentasacharydowych zbudowanych z D-mannozy, L-ramnozy i D-glukozy	Zaangażowany w tworzenie biofilmu	(Rasamiravaka et al. 2015; Wu et al. 2015)
eDNA	Ujemnie naładowana makromolekuła; biopolimer kwasu nukleinowego	Zaangażowany w tworzenie biofilmu; Modyfikuje strukturę biofilmu; Chelatuje kationy	(Das et al. 2014; Rasamiravaka et al. 2015; Wu et al. 2015; Wilton et al. 2016; Arciola and Campoccia 2018)
Rzęska	Polarna wypustka zbudowana z włókna, haka i ciała podstawowego; ruch może odbywać się zgodnie lub przeciwnie do ruchu wskazówek zegara;	Bierze udział w adhezji do tkanek gospodarza; umożliwia poruszanie się w środowisku o zmniejszonej lepkości (medium o obniżonej zawartości agaru, wydzieliny gospodarza); bierze udział w <i>swimming motility</i>	(Ha et al. 2014b; Sykes 2014; Rasamiravaka et al. 2015; Wu et al. 2015; Arciola and Campoccia 2018; Liu et al. 2022)
Pili typu IV (fimbrie typu IV)	Polarne wypustki o średnicy 5-6 nm i długości 1-4 μm; zbudowane z białka piliny	Biorą udział w adhezji; biorą udział w <i>twitching motility</i> ; mogą być zaangażowane w produkcję biofilmu i agregację komórek.	(Sykes 2014; Turnbull and Whitchurch 2014; Rasamiravaka et al. 2015; Wu et al. 2015; Jurado-Martín et al. 2021)

Oporność *P. aeruginosa* na środki przeciwdrobnoustrojowe, warunki środowiskowe oraz układ odpornościowy gospodarza może być również zwiększona dzięki stosowanym strategiom przetrwania, w tym zdolności do tworzenia biofilmów (Das et al. 2014; Wu et al. 2015). Biofilm bakteryjny to złożona trójwymiarowa struktura składająca się z komórek (5-35% objętości) otoczonych macierzą zewnątrzkomórkową (ang. *exopolymeric substances*, EPS) (Del Pozo and Patel 2007; Wu et al. 2015). Macierz zewnątrzkomórkowa zawiera głównie polisacharydy, białka, eDNA, RNA, wodę, metabolity wtórne (np. ramnolipidy, piocyjaninę) oraz, w przypadku niektórych bakterii, również siderofory (Arciola and Campoccia 2018; Panlilio and Rice 2021). Zdolność do tworzenia biofilmów może, ale nie musi być powiązana z produkcją alginianu. Szczepy *P. aeruginosa* wytwarzające ten polimer są szczególnie niebezpieczne dla osób chorujących na mukowiscydozę, ponieważ tworzą bardzo odporne biofilmy o złożonej budowie przestrzennej, w których głównym składnikiem macierzy jest właśnie alginian. Opisano wiele genów zaangażowanych w syntezę tej substancji. Dwanaście z nich, tworzących operon *algD* odpowiada m.in. za syntezę prekursorów alginianu, polimeryzację, modyfikację oraz eksport gotowego produktu poza komórkę. Z kolei szczepy nieprodukujące alginianu również tworzą biofilmy, ale w tym przypadku macierz zewnątrzkomórkowa jest zbudowana z polisacharydów kodowanych przez geny *psl* (polisacharyd bogaty w mannozę) oraz *pel* (polisacharyd bogaty w glukozę) (Wu et al. 2015).

Rolą macierzy zewnętrznej jest ochrona komórek bakterii przed szkodliwymi warunkami środowiska i substancjami przeciwbakteryjnymi, których penetracja jest ograniczona. Dodatkowo może dochodzić do inaktywacji enzymatycznej środków przeciwdrobnoustrojowych przez enzymy wewnątrz biofilmów (Del Pozo and Patel 2007; Das et al. 2014). Kolejnym istotnym składnikiem biofilmu jest eDNA, czyli DNA pozakomórkowe (ang. *extracellular*). Uwalnianie cząsteczek DNA z komórek może zachodzić poprzez lizę komórek indukowaną przez profagi, enzymy, białka o aktywności litycznej, a także metabolity takie jak barwniki fenotiazynowe (Das et al. 2014). eDNA może różnić się budową od DNA genomowego, ponieważ podczas uwalniania DNA poza komórkę często dochodzi do fragmentacji łańcucha i zmiany struktury cząsteczki (Panlilio and Rice 2021). Na fakt, że eDNA bierze istotną rolę w powstawaniu i funkcjonowaniu biofilmu wskazuje to, że dodanie DNazy (enzymu trawiącego DNA) prowadzi do zahamowania powstawania biofilmu oraz dyspersji już uformowanych struktur, a biofilmy ubogie w eDNA są bardziej podatne na działanie dodecylosiarczanu sodu (SDS)

(Rasamiravaka et al. 2015; Wu et al. 2015). Wiadomo również, że powstawanie biofilmów wokół pofragmentowanego eDNA jest nasilone (Panlilio and Rice 2021). Rolą eDNA jest przede wszystkim stabilizowanie i wzmacnianie macierzy zewnątrzkomórkowej, transfer genów między komórkami, dostarczanie składników odżywczych do komórek oraz modulacja odpowiedzi immunologicznej gospodarza (Arciola and Campoccia 2018; Panlilio and Rice 2021). eDNA wpływa również na wczesną adhezję bakterii do powierzchni, agregację komórek i tworzenie mikrokolonii (Das et al. 2014). eDNA zwiększa również hydrofobowość powierzchni komórki bakteryjnej, co korzystnie wpływa na zdolność do adhezji (Panlilio and Rice 2021). Chelatacja kationów metali przez eDNA powoduje także zmianę właściwości powierzchniowych komórki bakteryjnej, co może bezpośrednio wpływać na zmniejszenie jej wrażliwości na substancje przeciwdrobnoustrojowe, a także stabilizuje warstwę LPS (Das et al. 2014). eDNA ułatwia również ekspansję biofilmu opartą na mechanizmie *twitching motility* oraz zapobiega pozostawaniu ruchliwych komórek typu *swarmer* wewnątrz biofilmu (Rasamiravaka et al. 2015; Panlilio and Rice 2021).

Wytwarzanie biofilmów jest warunkowane możliwością przyczepiania się (adhezji) bakterii do powierzchni żywych (biotycznych) i nieżywych (abiotycznych). Wśród powierzchni żywych wymienić można przede wszystkim tkanki i narządy gospodarza (skóra, zęby, ucho środkowe, pęcherz moczowy i płuca), szczególnie u osób przebywających w szpitalach, z obniżoną odpornością a także po zabiegach chirurgicznych. Przykładem powierzchni abiotycznych podatnych na powstawanie biofilmu są na przykład narzędzia medyczne, opatrunki oraz inne elementy wyposażenia szpitalnego, a także implanty, cewniki, zastawki i stenty naczyniowe (Kirmusaoğlu 2019; Li et al. 2019).

Adhezja jest pierwszym etapem powstawania biofilmu i początkowo ma charakter odwracalny. Wraz z upływem czasu adhezja przestaje być odwracalna i rozpoczyna się etap rozwoju właściwego biofilmu polegający na otaczaniu komórek macierzą polisacharydową, oraz na dalszym dojrzewaniu tej struktury. Ostatnim etapem jest dyspersja, czyli rozproszenie komórek w środowisku (Liu et al. 2022). Na siłę adhezji wpływają właściwości fizykochemiczne zarówno komórki bakteryjnej, jak i powierzchni, z którą takie oddziaływanie ma miejsce. W szczególności istotne są takie parametry jak hydrofobowość, chropowatość/porowatość i ładunek powierzchniowy (Azelmad et al. 2018; Sobierajska et al. 2021a; Liu et al. 2022). Adhezja może być oparta na siłach van der Waalsa, oddziaływaniach elektrostatycznych lub oddziaływaniach typu kwas Lewisa – zasada Lewisa (Azelmad et al. 2018). Na formowanie biofilmów wpływają również warunki

środowiska, w szczególności pH, skład pożywki, ciśnienie osmotyczne, dostępność składników odżywczych oraz natlenienie środowiska (Liu et al. 2022). Ze strony komórki bakteryjnej, oprócz składu EPS i LPS, istotnym czynnikiem warunkującym adhezję jest również obecność na powierzchni komórki rzęski, fimbrii i pili, które pełnią funkcję adhezyjnych powierzchniowych (Arciola and Campoccia 2018; Liu et al. 2022).

Biofilmy odpowiadają przede wszystkim za ograniczeniem dyfuzji substancji przeciwdrobnoustrojowych, co przyczynia się do spadku wrażliwości bakterii w tej formie w porównaniu z komórkami wolno żyjącymi. Dodatkowo struktura biofilmów nie jest jednorodna i komórki różnią się od siebie aktywnością metaboliczną. Szczególnym przypadkiem są komórki typu *persistor*, występujące najczęściej w głębszych warstwach biofilmów, pozostające w uśpieniu, aż do czasu dyspersji biofilmu, polegającej na uwolnieniu komórek z macierzy polisacharydowej i rozprzestrzenieniu ich w środowisku (Kırmusaoğlu 2019). Komórki typu *persistor* charakteryzują się zmniejszoną wrażliwością na większość substancji przeciwdrobnoustrojowych i często to od nich zależy przetrwanie populacji bakterii w środowisku. Ponadto, w strukturze biofilmu może dochodzić do horyzontalnego transferu genów (HGT), co ułatwia nabycie mechanizmów oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe. Duża gęstość komórek wpływa z kolei na zmniejszenie natlenienia w głębszych warstwach biofilmu i nawet jeśli antybiotyk przeniknie przez macierz zewnątrzkomórkową, to jego aktywność jest ograniczona, co zostało zaobserwowane np. w przypadku ciprofloksacyny (Del Pozo and Patel 2007). Podczas dojrzewania biofilmów zachodzą zmiany obejmujące przede wszystkim zmniejszenie ruchliwości komórek, zmniejszenie syntezy enzymów (proteaz i fosfolipaz), zmniejszenie syntezy i wydzielania egzotoksyn i sideroforów (Guła et al. 2018).

Biorąc pod uwagę powyższą charakterystykę, nietrudno jest zauważyć, że biofilmy znacznie różnią się wrażliwością od form planktonicznych bakterii, stąd niezwykle istotna jest ocena wpływu materiałów implantacyjnych i ich pojedynczych składników (w tym jonów lantanowców) nie tylko na formy planktoniczne, ale również na biofilmy bakteryjne.

Ekspresja genów odpowiedzialnych za aktywność poszczególnych czynników wirulencji oraz produkcję biofilmów pozostaje pod kontrolą wielu systemów regulatorowych. U *P. aeruginosa* istnieją trzy główne systemy regulatorowe: system TCS (ang. *two-component system*), system DGC (ang. *diguanylate cyclase system*) i systemy oparte na QS (ang. *quorum sensing*). System TCS składa się z kinazy sensorowej

zlokalizowanej w błonie cytoplazmatycznej oraz ze zlokalizowanego w cytoplazmie regulatora. Pod kontrolą systemu TCS pozostają fimbrie typu *cup* oraz fimbrie typu IV biorące udział w adhezji bakterii, a także polisacharydy zaangażowane w tworzenie macierzy biofilmu (alginia, Pel i Psl). Do systemów TCS zalicza się również system Gac składający się z kinazy GacS i regulatora GacA. System Gac reguluje ekspresję srRNA (ang. *small regulatory RNA*), które wiąże RsmA, co powoduje aktywację genów wpływających na powstawanie biofilmów (Guła et al. 2018). Drugi system – c-di-GMP (cyclic dimeric (3'-5') GMP) - kontroluje powstawanie biofilmu oraz innych czynników wirulencji. U *P. aeruginosa* zidentyfikowano 17 różnych cyklicznych diguanylanowych (DGC) zaangażowanych w syntezę c-di-GMP. Jednym z nich jest białko SiaD, które wpływa na agregację komórek. SiaD pozostaje pod kontrolą operonu *siaABCD* (Chen and Liang 2020). c-di-GMP bierze również udział w obróbce potranskrypcyjnej i potranslacyjnej w komórce, a efekt końcowy może zależeć od interakcji z białkami efektorowymi zaangażowanymi w syntezę rzęski i Pel. Wśród białek DGC wyróżnić można WspR (ang. *wrinkly spreader phenotype*), które powoduje pojawienie się charakterystycznego fenotypu z dużą ilością egzopolisacharydu. Niektóre DGC są również składnikami systemu TCS, na przykład SadC wpływa na czynnik RsmA systemu Gac/Rsm. Zwiększona ilość c-di-GMP może również prowadzić do zahamowania syntezy rzęski poprzez zablokowanie aktywatora genu *fleQ*. Na syntezę rzęski może również wpływać HsbD należący do DGC. Aktywacja tego systemu wpływa na produkcję biofilmu, chemotaksję oraz ruch typu *swimming* i *swarming* (Guła et al. 2018).

Trzeci z systemów oparty jest na *quorum sensing* (QS), czyli mechanizmie wykrywania gęstości, który pozwala bakteriom na „komunikację” za pomocą wydzielanych cząsteczek sygnałowych. QS obejmuje cztery podsystemy: Las i Rhl wykorzystujące laktony N-acylo homoserynowe (3-oxo-C12-HSL i C4-HSL) – AHL; system PQS wykorzystujący PQS (2-heptylo-3-hydrokso-4-chinolon) jako cząsteczkę sygnałową oraz system IQS oparty na QscR. Systemy Las i Rhl działają na zasadzie wydzielania cząsteczek sygnałowych AHL do środowiska, które następnie mogą być wiązane przez receptory LasR i RhlR, należące do rodziny LuxR. Pod kontrolą systemów zależnych od Rhl pozostaje wiele czynników wirulencji, takich jak: produkcja elastazy, piocyjaniny czy ramnolipidu, natomiast system Las reguluje produkcję elastazy, endotoksyny A, proteazy alkalicznej i produkcję biofilmu. System PQS reguluje na przykład syntezę elastazy, piocyjaniny i

produkcję biofilmu, natomiast system QscR produkcję elastazy i ruchliwość komórki (Guła et al. 2018).

I.2 Nowoczesne alternatywne strategie w walce z zakażeniami wywoływanymi przez wielolekooporne szczepy *P. aeruginosa*

Na przebieg infekcji, poza czynnikami wirulencji, wpływa również trudność w dobraniu leku wynikająca ze stale rosnącej oporności na antybiotyki wśród patogenów. Oporność może być wrodzona i wynikać z cech strukturalnych lub funkcjonalnych komórki lub nabyta czyli związana z przekazywaniem genów oporności za pomocą plazmidów lub transpozonów na drodze HGT (horyzontalnego transferu genów) lub powstała w wyniku mutacji w bakteryjnym chromosomie (Li and Webster 2018). Istnieje również oporność adaptacyjna, która polega na zmianach w ekspresji genów i produkcji białek pod wpływem obecności antybiotyku w środowisku. Jest to natomiast mechanizm nietrwały i bakterie ponownie uwrażliwiają się po usunięciu leku ze środowiska (Moradali et al. 2017). Mechanizmy oporności wrodzonej, nabytej i adaptacyjnej zostały przedstawione w **Tabeli 2**.

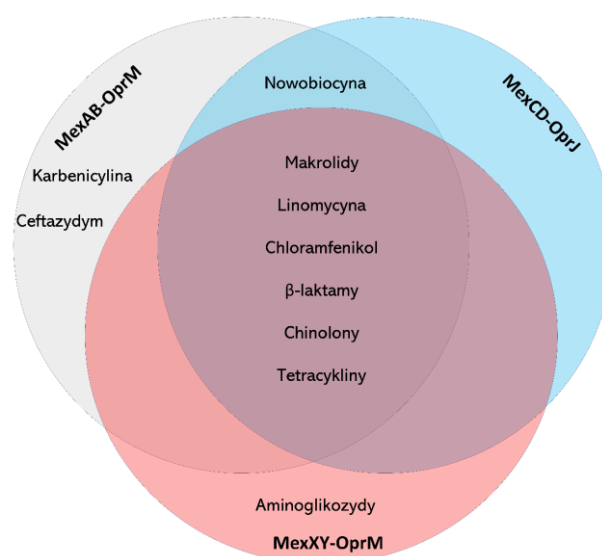
Tabela 2. Mechanizmy oporności wrodzonej, nabytej i adaptacyjnej *P. aeruginosa* (na podstawie (Moradali et al. 2017))

Mechanizm oporności	Charakterystyka	Przykład
Oporność wrodzona		
Budowa komórki	Uwarunkowane genetycznie właściwości komórki uniemożliwiają dostanie się leku do jej wnętrza.	Oporność na wiele substancji.
Brak miejsc wiązania	Brak możliwości związania leku i dostania się do wnętrza komórki.	Oporność na triclosan.
Zmniejszenie dyfuzji	Zmniejszenie ilości niespecyficznych białek porynowych powodujące zmniejszenie przepuszczalności komórki.	Oporność na karbapenemy i cefalosporyny
Pompy efflux (np. MexAB-OprM, MexXY-OprM/A)	Aktywne usuwanie substancji z komórki.	Oporność na antybiotyki z różnych klas oraz środki dezynfekcyjne.
β -laktamazy (AmpC)	Hydroliza antybiotyków	Oporność na aminopenicyliny i cefalosporyny.
Oporność nabyta		
Warunkowana przez mutacje w chromosomie		

β -laktamazy (AmpC)	Wysoka aktywność związana z inaktywacją represora <i>ampC</i> (<i>ampD</i>) na drodze mutacji oraz mutacji punktowej w <i>ampR</i> .	Oporność na antybiotyki β -laktamowe (tykarcylina, piperacylina), monobaktamy oraz cefalosporyny III i IV generacji.
Pompy efflux (MexAB-OprM, MexXY-OprM/A, MexCD-OprJ, MexEF-OprN)	Aktywne usuwanie substancji z komórki.	Oporność na karbapenemy
Zmniejszenie dyfuzji	Zmniejszenie ilości poryn OprD.	Oporność na karbapenemy.
Mutacje w miejscach docelowych działania antybiotyku	Mutacje <i>gyrA</i> i <i>gyrB</i> (gyraza DNA) oraz <i>parC</i> i <i>parE</i> (topoizomeraza IV).	Oporność na fluorochinolony
Warunkowana przez plazmidy		
ESBL (β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania) i karbapenemazy	Hydroliza antybiotyków	Oporność na antybiotyki β -laktamowe, w tym karbapenemy i cefalosporyny
Gen <i>mcr-1</i>	Obserwowana w wyniku mutacji w chromosomie lub transferu przez plazmid.	Oporność na kolistynę
Oporność adaptacyjna		
Mutacje w genach <i>nfxB</i> , <i>orfN</i> , <i>gyrA</i> i <i>gyrB</i> zaangażowanych w sygnalizację cyklicznego di-GMP	Mutacja <i>nfxB</i> powoduje zwiększenie produkcji pompy MexCD-OprJ.	Oporność na fluorochinolony
Mutacje genetyczne	Zwiększenie oporności w obecności kolistyny.	Oporność na kolistynę.
Zmiana struktury lipidu A w LPS	Mutacje w systemach PhoP-PhoQ, PmrA-PmrB, CprR-CprS i ParR-ParS.	Oporność na aminoglikozydy, polimyksyny i kationowe peptydy.

Oporność na antybiotyki wynika głównie ze zmniejszenia przepuszczalności błony zewnętrznej, produkcji enzymów rozkładających leki oraz obecności systemów efflux (Guła et al. 2018). Pompy efflux należą do rodziny pomp RND (ang. *resistance-nodulation-division*) i zbudowane są z trzech składników: białka MFP (ang. *periplasmic membrane fusion protein*), czynnika OMF (ang. *outer-membrane factor*) oraz transportera RND. Istnieje kilka dobrze scharakteryzowanych pomp efflux u *P. aeruginosa*: MexAB-OprM, MexXY/OprM(OprA), MexCD-OprJ i MexEF-OprN. Pompy MexAB-OprM i

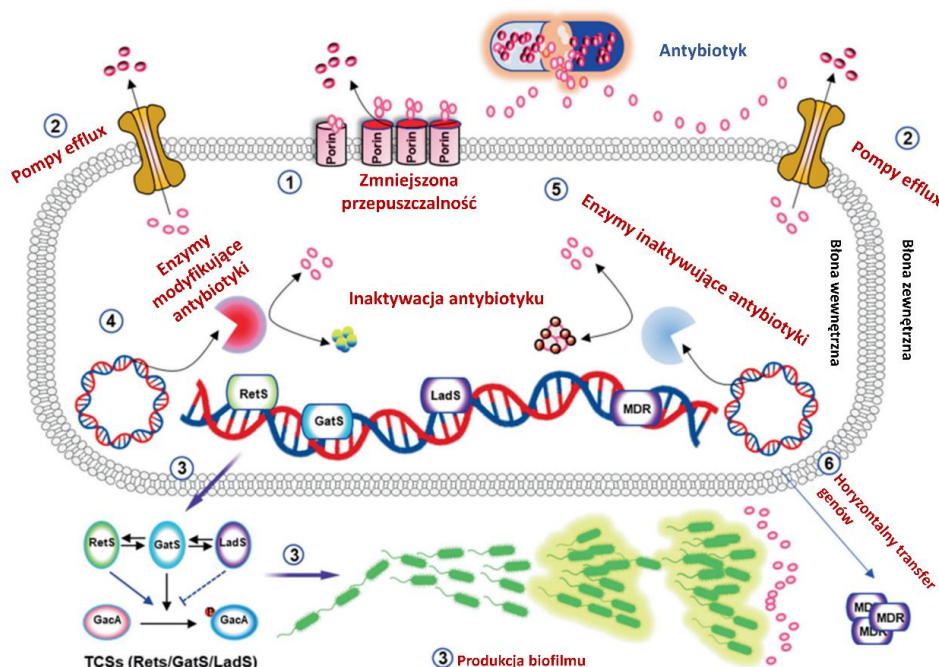
MexXY/OprM(OprA) powszechnie występują u wielu szczepów klinicznych i ich rolą jest usuwanie różnych antybiotyków. W przypadku genów *mexCD-oprJ* i *mexEF-oprN* obserwowana ekspresja jest stosunkowo niska u szczepów dzikich stąd przekonanie o ich niewielkiej roli w oporności wrodzonej. Inne rodzaje pomp, takie jak MexJK, MexMN, MexVW, MexGHI-OpmD, MexPQ-OpmE i TriABC nie są ekspresjonowane u szczepów dzikich, ale mogą odgrywać rolę w oporności adaptacyjnej na antybiotyki i inne środki bakteriobójcze (Moradali et al. 2017). Specyficzność pomp efflux *P. aeruginosa* ilustruje **Rycina 2.**



Rycina 2. Specyficzność pomp efflux *P. aeruginosa* wobec wybranych grup antybiotyków (Henderson et al. 2021)

Mechanizm polegający na zmniejszeniu przepuszczalności błony komórkowej *P. aeruginosa* pozwala z kolei na ograniczenie przedostawania się szkodliwych dla komórki substancji z otoczenia. W przypadku bakterii Gram-ujemnych istnieje dodatkowa ochrona w postaci błony zewnętrznej, która uniemożliwia napływ dużych hydrofilowych cząsteczek. Ze względu na wielkość i charakter chemiczny nie mogą one przechodzić bezpośrednio przez błonę i aby przedostać się do komórki muszą wykorzystać poriny, które są białkowymi kanałami wypełnionymi wodą. Część antybiotyków, które mają charakter hydrofilowy (β -laktamy, aminoglikozydy, tetracykliny, niektóre fluorochinolony i chinolony) mogą z łatwością wnikać do komórek przez poriny. Jednym ze sposobów na ograniczenie takiego transportu jest celowe zmniejszenie ilości tych transporterów, co prowadzi do zwiększonej oporności bakterii (Wu et al. 2015; Guła et al. 2018). Zmniejszona przepuszczalność może też wynikać ze zmian w strukturze LPS (Guła et al. 2018). Oporność na antybiotyki może być również zależna od systemów QS. Przykładowo system *las*

związany jest z ekspresją genu *mexY* kodującego białko *mexY*, które jest główną podjednostką systemu *MexXY-oprM*, który jest zaangażowany w oporność na aminoglikozydy (Moradali et al. 2017). Mechanizmy oporności *P. aeruginosa* zostały przedstawione na **Rycinie 3**.



Rycina 3. Mechanizmy oporności *P. aeruginosa* z podziałem na oporność wrodzoną, do której zalicza się: zmniejszoną przepuszczalność błony komórkowej (1), pompy efflux (2), enzymy modyfikujące enzymy (4) oraz enzymy inaktywujące antybiotyki (5); oporność nabytą, do której zalicza się: oporność nabytą dzięki horyzontalnemu transferowi genów oporności oraz mutacjom w genomie (6); oraz oporność adaptacyjną, do której zalicza się formowanie biofilmu (Qin et al. 2022)

I.2.1 Nanotechnologia jako alternatywna terapia przeciwbakteryjna

Niepokojącym jest to, że oprócz antybiotyków, na przestrzeni lat stale odnotowuje się również oporność drobnoustrojów na niektóre środki dezynfekcyjne (Hoff and Akin 1986; Kim et al. 2018; Bakht et al. 2022). Z tego względu zaczęto intensywnie poszukiwać terapii alternatywnych przeciwko patogenom wielolekoopornym (ang. *multi-drug resistant*, MDR), takim jak *P. aeruginosa*, które pozwoliłyby na ograniczenie konieczności stosowania antybiotyków. Wśród takich terapii wymienia się stosowanie antybiotyków w połączeniach z innymi lekami lub substancjami wspomagającymi ich działanie, terapię bakteriofagową, peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. *antimicrobial peptides*, AMP), terapię z wykorzystaniem przeciwciał, terapię fotodynamiczną, związki pochodzenia roślinnego oraz

nanocząstki, szczególnie te oparte na jonach metali o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (Dorotkiewicz-Jach et al. 2015; Mulani et al. 2019). Jony metali wydawały się być obiecującym rozwiązaniem w walce z lekoopornymi szczepami, jednak niektóre z nich, zwłaszcza w wyższych stężeniach wykazują cytotoksyczność wobec komórek eukariotycznych. Niestety, stosowanie niższych, często subletalnych dawek może prowadzić do rozwoju mechanizmów oporności wśród patogenów (Klasen 2000; Lara et al. 2011; Tite et al. 2018; Terzioğlu et al. 2022). Zmniejszenie stężenia jonów, a w konsekwencji ich cytotoksyczności, bez utraty działania przeciwbakteryjnego, można uzyskać poprzez łączenie różnych jonów (Garza-Cervantes et al. 2017; Poole 2017; Vaidya et al. 2017; Bankier et al. 2019; Vaidya et al. 2019; Yilmaz et al. 2019; Pormohammad and Turner 2020) oraz wprowadzenie ich w formie domieszek do nanomateriałów. Połączenie jonów metali, metali w formie niejonowej oraz leków (antybiotyków, leków przeciwzapalnych czy przeciwnowotworowych) z nanocząstkami daje możliwość otrzymania specjalistycznego systemu dostarczania substancji aktywnej do miejsca jej działania z kontrolowanym uwalnianiem. Niestety, odnotowano również rozwój antybiotykoodporności w obecności specyficznych jonów metali, dlatego takie połączenia nie mogą być postrzegane jako złoty środek (Hobman and Crossman 2015; Poole 2017; Wang and Hu 2017).

Nanorozmiarowe związki to bardzo szeroka grupa materiałów, które charakteryzują się małymi rozmiarami (przynajmniej jeden z wymiarów musi mieć poniżej 100 nm). Niezwykle mały rozmiar powoduje, że mają one inne właściwości fizykochemiczne oraz aktywność biologiczną, co wynika ze zwiększonego stosunku powierzchni do objętości (Khan et al. 2019). Generalnie im mniejszy rozmiar tym łatwiejsza penetracja cząstek danego związku do wnętrza komórki (Franco et al. 2022). Nie zawsze jednak mniejszy rozmiar cząstki oznacza wyższą toksyczność związku i poza rozmiarem do najważniejszych właściwości fizykochemicznych zalicza się: jej kształt, morfologię powierzchni, strukturę krystaliczną oraz jej ładunek powierzchniowy (Wang and Hu 2017). Nanorozmiarowe cząstki o kształcie kulistym są najczęściej spotykane, natomiast wyższą aktywnością antybakteryjną charakteryzują się zazwyczaj formy sześciennie (ang. *nanocubes*) i pałeczkowate (ang. *nanorods*). Ponadto uważa się, że właściwości antybakteryjne zwiększają się, kiedy cząstki mają nieregularne brzegi, ostre wypustki lub nierówności powierzchni. Trzecią cechą, która istotnie przyczynia się do aktywności przeciwdrobnoustrojowej jest ładunek powierzchniowy. Nanorozmiarowe cząstki dodatkowo

naładowane są bardziej aktywne ze względu na oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowanymi powierzchniami komórek bakteryjnych. Nanocząstki o ujemnym ładunku są często nieaktywne wobec większości bakterii (Franco et al. 2022).

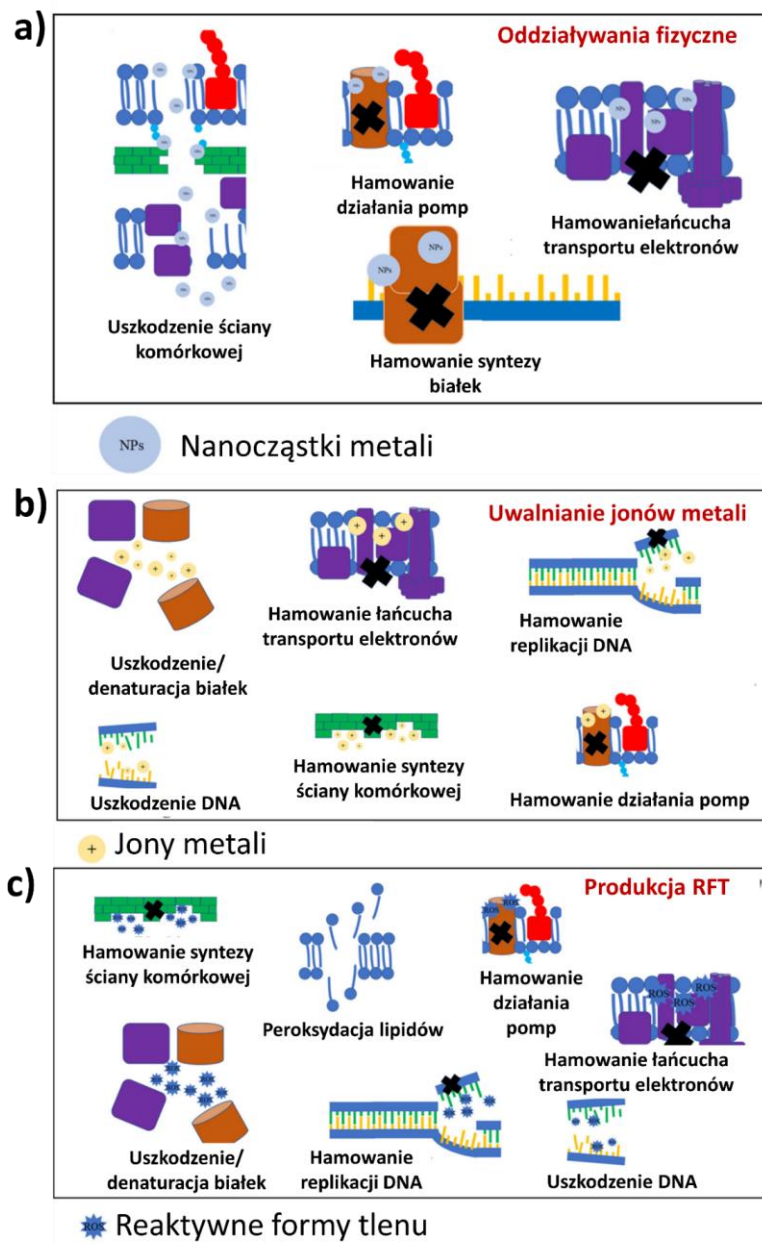
Właściwości antybakteryjne metali i ich jonów są znane od lat. Oprócz srebra (jonowego i metalicznego), które jest często opisywane jako genotoksyczne i cytotoksyczne, takie metale jak złoto, miedź, cynk, magnez, żelazo, bizmut, gal, tytan, kobalt, nikiel i molibden posiadają udowodnioną aktywność przeciwdrobnoustrojową i są wykorzystywane do syntezy nanorozmiarowych związków. Skuteczność działania takich materiałów zaobserwowano szczególnie wobec bakterii Gram-ujemnych, ogólnie uważanych za bardziej odporne na powszechnie stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe (Kolmas et al. 2014; Tite et al. 2018; Wu et al. 2018; Sobierajska et al. 2021a). Z drugiej strony udowodniono, że nanorozmiarowe cząstki są mniej aktywne wobec bakterii Gram-dodatnich, co przypisuje się grubszej ścianie komórkowej u bakterii G⁺, która działa jak bariera utrudniająca penetrację nanocząstek. Ponadto, ujemny ładunek na powierzchni bakterii Gram-ujemnych nadany przez lipopolisacharyd zwiększa powinowactwo do kationów (Slavin et al. 2017). Możliwe mechanizmy działania jonów metali są szeroko badane, a ich działanie przeciwbakteryjne przypisuje się głównie zdolności do (Lemire et al. 2013; Kolmas et al. 2014; Wang and Hu 2017):

- upośledzenia działania białek (w tym enzymów),
- produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) (prowadzącej do stresu oksydacyjnego),
- zaburzeń struktury i funkcjonowania błony komórkowej, co prowadzi do stopniowego uwalniania białek i LPS,
- uszkodzeń materiału genetycznego.

Co więcej nanorozmiarowe cząstki metali utrudniają formowanie biofilmów. Taką aktywność wykazano m.in. dla cząstek złota, srebra, magnezu czy nanometrycznych tlenków ZnO i CuO. W zapobieganiu formowania biofilmów istotną rolę, oprócz małych rozmiarów nanocząstek, odgrywa również ich kształt – wydłużone (ang. *rod like shape*) są bardziej aktywne od kulistych (ang. *spherical shape*). Częściowo aktywność nanocząstek jest również związana z uwalnianymi przez nie jonami metali, co powinno mieć stopniowy i powolny charakter, zapewniając przedłużenie aktywności antybakteryjnej. Wolne jony wchodzą w reakcje z grupami -SH, -NH i -COOH białek i kwasów nukleinowych, powodując inaktywację enzymów oraz wpływając bezpośrednio na strukturę i funkcje

komórki bakteryjnej (Wang and Hu 2017). Należy jednak pamiętać, że na aktywność antybakteryjną nanorozmiarowych związków domieszkowanych jonami metali wpływa zarówno domieszka, jak i właściwości fizykochemiczne cząstek. Efekt przeciwdrobnoustrojowy jonów metali będzie zależał przede wszystkim od ich stężenia w materiale oraz wpływu matrycy i otaczającego środowiska na uwalnianie jonów (Mocanu et al. 2021). Mechanizm aktywności antybakteryjnej nanocząstek metali jak również uwalnianych z nich jonów metali zilustrowano na **Rycinie 4**.

Dużą nadzieję pokłada się również w materiałach współdomieszkowanych, w których najczęściej wykorzystuje się efekt synergii jonów o potwierdzonej aktywności przeciwbakteryjnej (np. par jonów $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (Sobierajska et al. 2021a) czy $\text{Ag}^+/\text{Cu}^{2+}$ (Yang et al. 2009) lub jon o aktywności przeciwbakteryjnej oraz jon, który zmniejsza jego toksyczność lub zwiększają rozpuszczalność w wodzie, ale sam w sobie ma niską aktywność przeciwdrobnoustrojową (np. para jonów $\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$) (Ravi et al. 2012; Rewak-soroczynska et al. 2022). Jednym ze sposobów na jednoczesne podanie dwóch lub więcej jonów jest wprowadzenie ich do matrycy hydroksyapatytu wapnia.



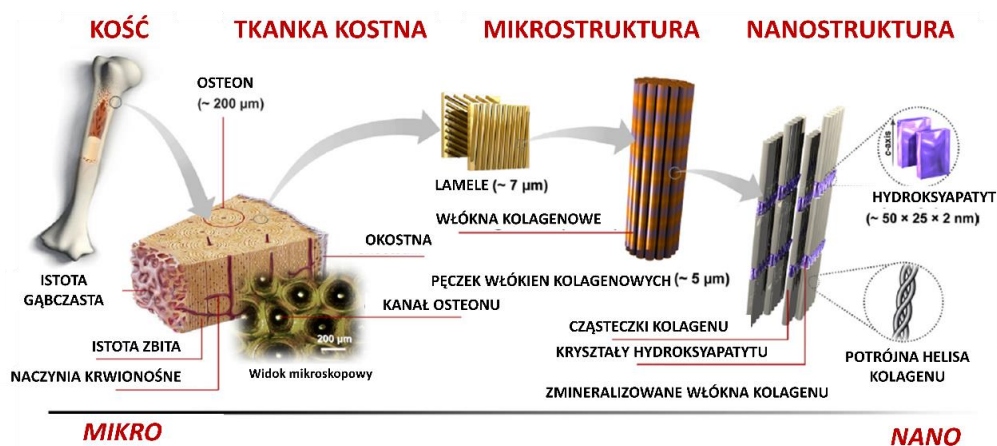
Rycina 4. Mechanizm antibakteryjnej aktywności nanocząstek metali polegający na: a) oddziaływaniach fizycznych pomiędzy nanocząstkami a komórką bakteryjną; b) uwalnianiu jonów metali; c) zwiększaniu produkcji reaktywnych form tlenu (Franco et al. 2022)

I.2.2 Hydroksyapatyt wapnia

Hydroksyapatyt wapnia (HAp) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) to związek naturalnie występujący w organizmie człowieka jako składnik kości i zębów. Można go również znaleźć w innych organizmach, np. u koralowców. Na właściwości fizykochemiczne hydroksyapatytu wapnia wpływ ma między innymi stosunek atomów wapnia do fosforu (Ca/P), który powinien

wynosić 1,67 (HAp stechiometryczny), natomiast otrzymuje się również materiały niestechiometryczne, w których ten stosunek odbiega od wyznaczonego (Damien and Revell 2004; Tite et al. 2018).

Przykładem materiałów niestechiometrycznych są naturalne związki o strukturze hydroksyapatytu, w których znajduje się zredukowana ilość wapnia w cząsteczce (ang. *calcium-deficient*) na korzyść innych jonów. HAp znajdujący się w kościach jest na przykład bogaty w fluor, który częściowo zastępuje grupy hydroksylowe, oraz w niewielkiej ilości w inne jony pierwiastków, takich jak magnez, sód (zastępujące w strukturze wapń) czy krzem (zastępujący grupy fosforanowe). W naturalnym apatycie budującym kości występuje dodatkowo grupa węglanowa, która może być zarówno podstawiona w miejscu grupy hydroksylowej (typ A) jak i fosforanowej (typ B) (Tite et al. 2018). Obecność hydroksyapatytu wapnia w tkance kostnej warunkuje jej sztywność, natomiast za jej elastyczność odpowiada kolagen, który wraz z innymi białkami tworzy frakcję organiczną. W tkance kostnej kryształy hydroksyapatytu wypełniają przestrzenie pomiędzy pęczkami włókien kolagenowych, co ilustruje **Rycina 5**. (Yilmaz et al. 2019).



Rycina 5. Mikro- i nanostruktura kości z uwzględnieniem miejsca występowania hydroksyapatytu (Sadat-Shojai et al. 2013)

Podobieństwo apatyty otrzymywanego syntetycznie do apatyty naturalnie występującego skutkuje stosunkowo niską toksycznością wobec organizmów żywych. Wysoka biokompatybilność z osteoblastami i osteoklastami (*in vitro*) z kolei związana jest z dużą porowatością i strukturalnym podobieństwem do naturalnej kości. Powoduje to korzystny wpływ na wzrost kości po wszczepieniu implantów na bazie HAp (Kolmas et al. 2014; Tite et al. 2018; Zhang et al. 2020).

Na właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczną otrzymanych materiałów nie wpływają jedynie domieszki, istotna jest również metoda ich otrzymywania. Istnieje wiele technik pozwalających na otrzymanie apatytu, które różnią się od siebie warunkami, czasem trwania i przygotowaniem substratów. Właściwy dobór techniki syntezy pozwala na otrzymanie produktu o pożądanej formie (proszki, granule czy powłoki) oraz kształcie (ziarna kuliste, wydłużone w formie pałeczek czy igiełek lub płatki) różniące się wielkością (skala nano lub mikrometryczna) (Tite et al. 2018).

Naturalny hydroksyapatyt może być pozyskany z kości zwierząt (krów, świń, wielbłądów, owiec), ich zębów (krowy, owce), skorupki jaj kurzych, muszli skorupiaków i ślimaków oraz ciał maław. Źródłem roślinnym są z kolei czerwone algi wykorzystywane w całości. Warto zauważyć, że niektóre surowce pozwalają uzyskać HAp jedynie po ich oczyszczeniu, wysuszeniu i wypaleniu (kości, zęby), inne natomiast wymagają dodatkowego oczyszczenia lub reakcji chemicznych przy udziale kwasu fosforowego lub soli fosforanowych, ponieważ surowiec naturalny może zawierać inne związki wapnia (najczęściej CaCO_3) (Tite et al. 2018).

Wśród metod syntezy chemicznej można natomiast wyróżnić techniki mokre (ang. *wet-chemistry methods*), do których zalicza się metodę strącaniową, metodę hydrotermalną, metodę zol-żelową, techniki suche oraz topnikowe (Kolmas et al. 2014; Tite et al. 2018). Jedną z najpopularniejszych metod jest metoda strącaniowa, która pozwala na uzyskanie nanorozmiarowych cząstek. Ta technika polega na zastosowaniu temperatury od pokojowej do 200°C , a właściwości otrzymanych materiałów mogą być modyfikowane przez zmianę stężenia reagentów i pH mieszaniny reakcyjnej. Zależą również od temperatury i czasu reakcji oraz temperatury i czasu wygrzewania gotowego produktu (Tite et al. 2018).

Hydroksyapatyt wykorzystywany jest też do powlekania różnych powierzchni, np. implantów kostnych. Pozwala to uzyskać lepszy efekt niż w przypadku stosowania samego HAp, który jest bardzo kruchy i ma słabe właściwości mechaniczne (mała elastyczność) (Kolmas et al. 2014; Tite et al. 2018). Z tego samego względu HAp zaczął być wykorzystywany jako dodatek do implantów na bazie polimerów i biopolimerów (Kolmas et al. 2014; Targonska et al. 2022). Dodatkowo, zastosowanie HAp na powierzchni implantów metalowych usprawnia proces osteointegracji (Kolmas et al. 2014). W celu powleczenia implantu (np. śrub tytanowych) hydroksyapatytem stosuje się metody: spray'u plazmowego, metodę zol-żelowa, elektroforezę, metodę osadzenia elektro-chemicznego,

metodę osadzania wspomaganą wiązką jonów, metodę utleniania mikrołukowego, osadzanie biomimetyczne z przesyconego roztworu SBF (ang. *simulated body fluid*) oraz inne techniki (Tite et al. 2018). Hydroksyapatyt może być również prasowany w celu uzyskania tabletek (Ofudje et al. 2019; Targonska et al. 2020; Sobierajska et al. 2021a) i hydrożeli (Francesco et al. 2019; Rewak-soroczynska et al. 2021; Sobierajska et al. 2021a). Hydrożele mogą być wytworzone na bazie matrycy polisacharydowej oraz zawierać dodatkowo leki: ciprofloksacynę (Mahdavinia et al. 2019), gentamycynę (Kondaveeti et al. 2018) czy flukonazol (Rewak-soroczynska et al. 2021). Podstawową zaletą hydrożeli jest stopniowe uwalnianie leku w miejscu podania oraz przyspieszenie gojenia rany, dzięki zapewnieniu wilgotnego środowiska i ochrony przed uszkodzeniami mechanicznymi (Francesco et al. 2019).

Jak wcześniej wspomniano hydroksyapatyt jest wykorzystywany w medycynie jako materiały implantacyjne o właściwościach regeneracyjnych w rekonstrukcjach kostnych, ale znalazł również zastosowanie w stomatologii, w implantologii stomatologicznej oraz w farmacji jako nośniki leków (Kolmas et al. 2014). Ponadto hydroksyapatyt wapniowy wykorzystywany jest jako wypełniacz tkankowy (Radiesse®) (Shah and Kennedy 2018). W praktyce stomatologicznej HAp wykorzystywany jest na przykład po ekstrakcji zębów do wypełniania zębodołów lub jako rusztowanie do odbudowy utraconej kości. Po wszczepieniu takiego materiału do tkanek następuje penetracja wolnej przestrzeni implantu przez żywe tkanki, a jest to możliwe dzięki jego porowatej powierzchni (Kolmas et al. 2014). Bioceramiki na bazie HAp mogą przyjmować pożądane kształty, dlatego znalazły zastosowanie w tworzeniu implantów ucha środkowego i gałki ocznej (Kolmas et al. 2014). Dodatkowo HAp jest składnikiem past do zębów i żeli dentystycznych (Chen et al. 2021). Niewątpliwą zaletą hydroksyapatytów otrzymywanych na drodze syntezy laboratoryjnej jest fakt, że można wprowadzać domieszki jonowe oraz modyfikować strukturę HAp przez dołączenie różnych grup funkcyjnych. Powoduje to otrzymanie związków o pożądanych właściwościach fizykochemicznych i zmienionej aktywności biologicznej.

Właściwości takie jak biokompatybilność i bezpieczeństwo substancji ze zdolnością do wspierania regeneracji tkanek są pożądane w implantologii. Ponadto zdolność do ograniczenia wzrostu bakterii i adhezji jest dodatkową zaletą takich materiałów, gdyż zabiegi chirurgiczne niosą ze sobą ryzyko zakażenia (Arciola and Campoccia 2018). Czysty hydroksyapatyt nie powinien być toksyczny wobec komórek eukariotycznych, niemniej jednak bardzo istotnym czynnikiem mogącym na to wpływać jest metoda syntezy, a

szczególnie toksyczność użytych rozpuszczalników oraz wydajność oczyszczania otrzymanego produktu (Szymonowicz et al. 2017). Wykazano jednak, że czysty hydroksyapatyt może być toksyczny względem erytrocytów i powodować hemolizę oraz agregację krwinek, szczególnie w wysokich stężeniach. Jest to zależne od właściwości fizykochemicznych materiału, a szczególnie od kształtu i rozmiaru cząstki (Elferink 1986).

W apatytach możliwe jest wprowadzenie częściowych lub pełnych substytucji kationowych oraz anionowych, o czym częściowo wspomniano już przy okazji bioapatytów. Ogólny wzór apatytów może być więc zapisywany w postaci (Kolmas et al. 2014; Tite et al. 2018; Jiang et al. 2019):



gdzie:

- M = podstawienia kationowe i może obejmować kationy jednowartościowe (Ag^+ , Au^+ , Na^+ , K^+ i inne), podstawienia dwuwartościowe (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} i inne) oraz podstawienia wielowartościowe (np. jony Ln^{3+}),
- XO_4 = podstawienia anionowe typu B, najczęściej są to aniony PO_4^{3-} , SiO_4^{4-} , CO_3^{2-} , SeO_3^{2-} i BO_3^{3-} ,
- Y = podstawienia anionowe typu A, najczęściej są to aniony OH^- , Cl^- , F^- i CO_3^{2-} .

Należy wspomnieć, że możliwe jest również podstawienie jonów o innym stopniu utlenienia niż te, które występują w matrycy HAp (dzwuwartościowy jon Ca^{2+} może na przykład zostać podstawiony przez jednowartościowy jon Na^+), a powstałe niedopasowanie ładunku kompensowane jest w strukturze związku przez różne efekty strukturalne (Kolmas et al. 2014; Tite et al. 2018). Wprowadzenie dodatkowych jonów do matrycy apatytu istotnie zmienia jej właściwości fizykochemiczne, takie jak: stabilność termiczną, krystaliczność, rozpuszczalność, morfologię kryształu, wielkość ziarna, rozkład na inne fazy i parametry komórki elementarnej (Yilmaz et al. 2019). Przykładowo, dodanie lantanu (La^{3+}) poprawia stabilność termiczną i właściwości mechaniczne HAp (Tite et al. 2018). Bardzo interesujące naukowo są również apatyty współdomieszkowane, czyli zawierające przynajmniej dwie dodatkowe domieszki. Celem współdomieszkowania jest uzyskanie efektu synergicznego pomiędzy wprowadzonymi jonami (Yilmaz et al. 2019). Obecnie, w dobie rosnącej antybiotykoodporności bakterii, wciąż poszukujemy alternatywnych terapii

antybakteryjnych, dlatego domieszkowanie hydroksyapatytów jonami metali o udowodnionej aktywności przeciwdrobnoustrojowej pozostaje w kręgu zainteresowań naukowców.

I.2.3 Właściwości fizykochemiczne i biologiczne oraz zastosowanie jonów lantanowców

Lantanowce (Ln) to rodzina pierwiastków z bloku f układu okresowego, do której zalicza się: lantan (La), cer (Ce), praeodym (Pr), neodym (Nd), promet (Pm), samar (Sm), europ (Eu), gadolin (Gd), terb (Tb), dysproz (Dy), holm (Ho), erb (Er), tul (Tm), iterb (Yb) i lutet (Lu). Lantanowce występują w środowisku naturalnym, najczęściej w postaci mieszanin ich związków. Zaliczane są do metali nieszlachetnych. W postaci metalicznej mają srebrzystobiałe zabarwienie (Brzyska 1996). Wraz ze wzrostem liczby atomowej zmniejszają się promienie jonowe i atomowe w szeregu lantanowców (**Tabela 3**). Lantanowce najczęściej występują na +3 stopniu utlenienia. Wielkość promienia jonowego Ln^{3+} jest zbliżona do jonów Ca^{2+} i Sr^{2+} . Jony lantanowców w związkach chemicznych mogą być aktywne optycznie i pod wpływem wzbudzenia ich odpowiednią długością fali elektromagnetycznej, można uzyskać ich luminescencję od ultrafioletu do podczerwieni (Brzyska 1996).

Szczegółowej analizy badań dotyczących wpływu jonów lantanowców na organizmy żywe dokonano w opublikowanej pracy Rewak-Soroczyńskiej i wsp. (2022) (Rewak-Soroczynska et al. 2022b).

Aktywność biologiczna jonów Ln^{3+} koreluje z ich cechami fizykochemicznymi i jest inna dla lekkich (La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+}) i ciężkich (Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , Lu^{3+}) jonów lantanowców. Jak już wspomniano jony lantanowców (Ln^{3+}) wykazują podobieństwo do jonów wapnia (Ca^{2+}), głównie ze względu na podobny rozmiar promienia jonowego, dlatego wykazano, że mogą naśladować ich aktywność. Ta cecha jest przyczyną stosowania jonów lantanowców jako sond dla miejsc wiążących wapń w komórkach (Switzer 1978; Evans 1983; Ogurusu et al. 1991; Bertini et al. 2003). Różnica w stopniu utlenienia (jony Ln^{3+} występują częściej na III stopniu utlenienia, a jony wapnia są dwuwartościowe) powoduje zmianę stosunku ładunku do objętości, który u Ln^{3+} jest większy. Z tego powodu jony lantanowców silniej wiążą się ze strukturami komórek niż jony Ca^{2+} (Evans 1983). Podobieństwo między jonami wapnia i jonami lantanowców

skutkuje również dużym powinowactwem do miejsc Ca^{2+} w strukturze związku chemicznego i pozwala na syntezę hydroksyapatytu domieszkowanego jonami Ln^{3+} (Tite et al. 2018).

Tabela 3. Wielkość promienia jonowego jonów lantanowców oraz jonu wapnia (Rizzo et al. 2021)

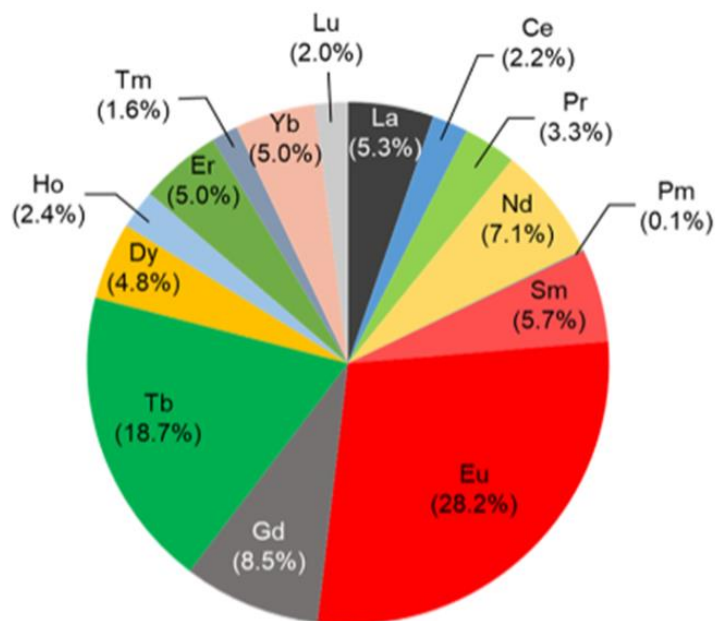
Pierwiastek	Jon	Wielkość promienia jonowego (Å)
Lantan	La^{3+}	1,061
Cer	Ce^{3+}	1,034
Prazeodym	Pr^{3+}	1,013
Neodym	Nd^{3+}	0,995
Samar	Sm^{3+}	0,964
Europ	Eu^{3+}	0,950
Gadolin	Gd^{3+}	0,938
Terb	Tb^{3+}	0,923
Dysproz	Dy^{3+}	0,908
Holm	Ho^{3+}	0,894
Erb	Er^{3+}	0,881
Tul	Tm^{3+}	0,869
Iterb	Yb^{3+}	0,858
Lutet	Lu^{3+}	0,848
Wapń	Ca^{2+}	1,00

Oprócz jonów wapnia również inne kationy metali mogą być zastępowane przez jony Ln^{3+} , zarówno w strukturze nanomateriałów, jak i w procesach komórkowych, w których biorą udział dane jony. Mogą to być na przykład dwuwartościowy jon magnezu czy manganu, ale również trójwartościowy jon żelaza (Evans 1983). Jony Ln^{3+} mogą także podstawiać jony metali w miejscach ich wiązania w makromolekułach takich jak białka (w tym enzymy), gdzie mogą stymulować lub hamować ich działanie. Przykładami enzymów, które są hamowane przez jony lantanowców są m.in. nukleaza *Staphylococcus aureus*, enzymy biorące udział w krzepnięciu krwi czy enzymy cytochromu P450. Z kolei do stymulacji aktywności dochodzi w przypadku trypsyny i acetylocholinoesterazy (Fricker 2006). Istnieją również białka nieenzymatyczne, które wiążą się z jonami Ln^{3+} i są to m.in. transferyna, IgG, kolagen, albumina, G-aktyna oraz kalmodulina (Evans 1983). Naśladowanie działania jonów dwuwartościowych zauważono również w aktywności ATPazy magnezowej i wapniowej. Enzymy te mogą być blokowane przez jony lantanu (La^{3+}) i dysprozu (Dy^{3+}), z kolei hamowanie aktywności kalcyneuryny zauważono po dodaniu jonów europu (Eu^{3+}) i terbu (Tb^{3+}) (Rim et al. 2013).

Opisano również bezpośredni wpływ jonów Ln^{3+} na organizację struktur szkieletu komórkowego (mikrotubule i mikrofilamenty). Utrata stabilności cytoszkieletu ma miejsce chociażby w komórkach nowotworowych oraz tych, które weszły na drogę programowanej śmierci (apoptozy). Odwrócenie zmian w strukturze cytoszkieletu można uznać za skuteczny mechanizm antynowotworowy opisany na przykład dla paklitakselu. Wpływ jonów Ln^{3+} na stabilność cytoszkieletu nie jest jednakowy dla wszystkich jonów i na przykład jony neodymu (Nd^{3+}) i gadolinu (Gd^{3+}) destabilizują mikrotubule (podobnie jak jony wapnia), natomiast jony Tb^{3+} działają w zupełnie odwrotny sposób, co przypomina aktywność jonów Mg^{2+} (Wang et al. 1999). Różnice te mogą zależeć od wpływu GTPazy na tubulinę po związaniu jonów Ln^{3+} (Wang et al. 1999).

Prawdopodobnie ze względu na fakt, że jony Ln^{3+} nie występują w środowisku naturalnym w tak dużych ilościach jak inne pierwiastki, komórki nie wykształciły szlaków biochemicznych z nimi związanymi (Martin and Richardson 1979). Wysuwana przez wiele lat hipoteza o naśladowaniu przez jony lantanowców jonów wapnia (i innych kationów) była uznawana za słuszną, dopóki nie odkryto antagonistycznego działania jonów Ln^{3+} względem jonu Ca^{2+} (Martin and Richardson 1979; Fricker 2006).

Efekt jaki wywierają jony lantanowców na komórki bakteryjne jest wciąż niedostatecznie poznany (Tite et al. 2018). Istnieją publikacje, w których opisano wpływ jonów lantanowców na komórki prokariotyczne, jednak te prace skupiają się głównie na opisanu wpływu na wzrost bakterii, bez wyjaśnienia mechanizmów działania (Burkes and McCleskey 1947; Sobek and Talburt 1968; Garner and Heppell 2005; Wakabayashi et al. 2016). Z drugiej strony, istnieje wiele badań dotyczących wpływu nanomateriałów domieszkowanych lub współdomieszkowanych jonami Ln^{3+} na bakterie (Predoi et al.; Ciobanu et al. 2013; Ciobanu et al. 2015; Puram et al. 2015; Wiglusz et al. 2015a; Andronescu et al. 2016; Priyadarshini et al. 2017; Tite et al. 2018; Szyszka et al. 2020; Sobierajska et al. 2021b), a udział poszczególnych jonów lantanowców w tych badaniach obrazuje **Rycina 6**.



Rycina 6. Udział poszczególnych jonów lantanowców po jednoczesnym wyszukaniu haseł „luminescencja” i „kompleksy Ln” (Hasegawa et al. 2022)

Podczas oceny wpływu antybakteryjnego nanomateriałów trudno jest jednak określić efekt działania wolnych jonów na komórkę, ponieważ same ich cząstki również są biologicznie aktywne i mogą hamować namnażanie się bakterii dzięki efektom opisanym we wcześniejszych rozdziałach (Rewak-Soroczynska et al. 2022b).

Badania naukowe wykazały, że Ln^{3+} nie mają zdolności przenikania do żywych komórek i mogą wiązać się jedynie z określonymi miejscami w ścianach komórkowych wybranych bakterii (w tym *P. aeruginosa*) (Texier et al. 2000; Fricker 2006). U *Escherichia coli* zaobserwowano, że Ln^{3+} nie zmieniając wzrostu bakterii nieznacznie modyfikowały metabolizm i ekspresję genów (Wenhua et al. 2003; Rim et al. 2013). Jony lantanu (La^{3+}) w stężeniach 0,5-30 $\mu\text{g} / \text{ml}$ zmniejszały transformację u *E. coli*, a w stężeniach wyższych (ponad 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ten proces w ogóle nie był możliwy (Wenhua et al. 2003). Wciąż jest mało informacji odnośnie wpływu jonów Ln^{3+} na wirulencję bakterii (Rewak-Soroczynska et al. 2022b).

Ze względu na fakt, że jony Ln^{3+} nie przenikają osłon komórkowych, ich toksyczność po podaniu doustnym jest niska. Zauważono z kolei ich wysoką toksyczność po podaniu dożylnym, gdy uzyskują dostęp do kanałów wapniowych komórek. Ostra toksyczność wywołana działaniem jonów Ln^{3+} na organizm ludzki może skutkować zaburzeniami

krążeniowo-oddechowymi i spadkiem ciśnienia. Po dożylnym podaniu jony La^{3+} - Gd^{3+} (lantanowce lekkie) transportowane są do wątroby, gdzie mogą prowadzić do jej stłuszczenia, a następnie przemieszczają się do tkanki kostnej, gdzie ich okres półtrwania wynosi około 10-20 dni. Z kolei ciężkie lantanowce od razu trafiają do kości, gdzie utrzymują się przez wiele lat (Fricker 2006).

Badania *in vitro* opisują zależną od stężenia jonów lantanowców hemolizę erytrocytów ludzkich (Evans 1983). Dochodziło również do wzrostu przepuszczalności błony komórkowej krwinek po dodaniu do nich jonów lantanowców. Wiązanie jonów Ln^{3+} do błon komórkowych erytrocytów zachodzi prawdopodobnie dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym, co prowadzi do zaburzenia integralności błony i powstania „porów” przy dłuższym kontakcie. W początkowej fazie proces ten można odwrócić przez dodanie do medium chelatorów wiążących kationy (np. EDTA). Umożliwia to powrót krwinek do pierwotnej postaci, a hemoglobina pozostaje we wnętrzach erytrocytów (brak hemolizy) (Wang et al. 1999). Często opisuje się również fuzję erytrocytów prowadzącą do powstania agregatów komórek o dużych rozmiarach, pod wpływem jonów lantanowców, co polega na tworzeniu połączeń między komórkami, a konkretnie między ich białkami powierzchniowymi. Przykładem białka, które bierze udział w tworzeniu takich połączeń jest enzym ATPaza wapniowa (Evans 1983). Badania Alexy’ego i wsp. (2011) wykazały, że wpływ jonów lantanowców na erytrocyty zależy od wielkości promienia ich jonów, a największą aktywność obserwuje się dla lantanowców lekkich (La^{3+} - Sm^{3+}), których promień jonowy jest większy niż 0,95 Å (**Tabela 3.**) (Alexy et al. 2011). W przypadku wpływu na erytrocyty jony Ln^{3+} mogą częściowo naśladować aktywność jonów Ca^{2+} , dla których wykazano na przykład hamowanie działania pompy sodowo-potasowej, zwiększenie aktywności ATPazy wapniowej, zmianę morfologii erytrocytów z dwuwklęsłych dysków na formę echinocyty (erytrocyt z równo rozmieszczonymi wypustkami), a nawet na formę kulistą. Spada też odkształcalność błony komórkowej (Crespo et al. 1987; Manaargadoo-Catin et al. 2016).

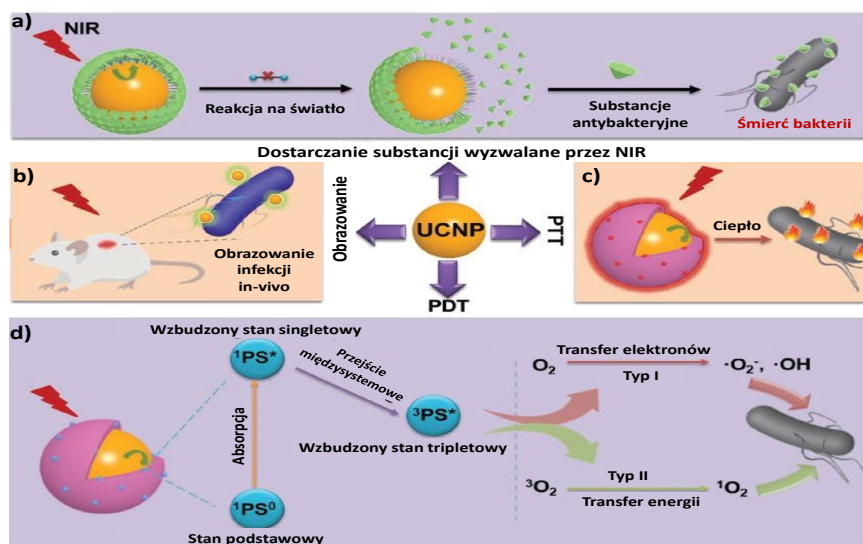
Cytotoksyczność Ln^{3+} badano również przy użyciu innych modeli *in vitro*, takich jak pęcherzyki płucne szczurów, gdzie opisano szkodliwe działanie La^{3+} , Ce^{3+} i Nd^{3+} . W komórkach wątroby zaobserwowano z kolei, że jony gadolinu (Gd^{3+}) i prazeodymu (Pr^{3+}) działały ochronnie na hepatocyty. Dodatkowo jony lantanowców chronią komórki przed niekorzystnym wpływem reaktywnych form tlenu (RFT), co zbadano w modelu siatkówki oka szczura, u którego wykazano pozytywny wpływ na wzrok (Rim et al. 2013). Wśród

mechanizmów warunkujących aktywność antyoksydacyjną jonów Ln^{3+} są: maskowanie wolnych rodników (np. rodnika hydroksylogowego $-\text{OH}$ lub anionu ponadtlenkowego $\text{O}_2^{\cdot-}$) oraz wiązanie się z nadtlenkami (np. nadtlenkiem wodoru H_2O_2). Warto dodać, że znacznie różnią się one od sposobu działania antyoksydantów organicznych (Wang et al. 1999). Niejednoznaczny jest z kolei wpływ Ln^{3+} na komórki układu odpornościowego. Nawet w przypadku samych neutrofilów można zaobserwować spadek lub wzrost agregacji, a efekt ten zależy od stężenia jonów lantanowców. Wpływ na limfocyty również nie jest jasny, gdyż odnotowano zarówno spadek, jak i wzrost ich aktywacji po kontakcie z Ln^{3+} (Evans 1983; Fricker 2006).

W literaturze opisywane jest także działanie antynowotworowe Ln^{3+} w postaci zahamowania wzrostu komórek nowotworowych oraz wzrostu ekspresji genów supresorowych p16 i p21 i p53 (Rim et al. 2013). Również kompleksy Ln^{3+} z pochodnymi kumaryny mają opisaną aktywność przeciwnowotworową *in vitro*. Przykładem może być terb (Tb³⁺), który wspomagał działanie cis-platyny poprzez zwiększenie akumulacji tej substancji w komórkach opornych na działanie leku. Skuteczność kompleksu gadolinowo-tekstafirynowego wykazano z kolei wobec komórek raka płuc (Fricker 2006).

Badania *in vivo* z udziałem myszy BALB/C wykazały z kolei ochronne działanie chlorku lantanu podczas ich ekspozycji na LPS. Niestety, podczas długotrwałej ekspozycji na jony La^{3+} , Ce^{3+} i Nd^{3+} dochodziło do zmian histopatologicznych w kluczowych organach myszy (wątrobie, nerkach i sercu), przy czym intensywność tych efektów zależała od stężenia jonów lantanowców (Rim et al. 2013). Przydatność diagnostyczna jonów lantanowców (jako znaczników) jest potwierdzona również *in vivo* w badaniach na modelu mysim (Liu et al. 2011; Liu et al. 2014). Jony lantanowców wykorzystywane są m.in. w takich technikach jak rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI), badania rentgenowskie z kontrastem oraz tomografia emisyjna pojedynczego fotonu (ang. *single-photon emission computed tomography*, SPECT). W diagnostyce zamiast roztworów wodnych jonów Ln^{3+} wykorzystuje się ich połączenia z innymi związkami chemicznymi, w formie kompleksów lub chelatów, ze względu na obserwowane wygaszanie luminescencji w roztworach (Evans 1983; Misra et al. 2004; Amoroso and Pope 2015; Tite et al. 2018). Jony terbu (Tb³⁺) charakteryzują się jedną z najbardziej intensywnych luminescencji w zakresie widzialnym widma elektromagnetycznego spośród jonów lantanowców, dlatego wykorzystywany jest jako sonda diagnostyczna. Ponadto, opisano jego właściwości fotokatalityczne oraz przydatność jako nośnik genów. W technice rezonansu magnetycznego

oraz jako środki kontrastowe do bioobrazowania wykorzystywane są głównie jony gadolinu (Gd^{3+}), dysprozu (Dy^{3+}) czy neodymu (Nd^{3+}). Jony Gd^{3+} i Nd^{3+} wykorzystuje się z kolei w teranostyce do wykrywania wczesnych stadiów nowotworów za pomocą technik fluorescencji bliskiej podczerwieni. Zdolność do emisji termo-luminescencji przez hydroksyapatyt domieszkowany jonami Gd^{3+} została wykorzystana również do pomiarów ilości promieniowania gamma (dozymetria) (Tite et al. 2018). Lantanowce wykorzystywane są również w układach konwertujących energię w górę (ang. *upconversion*, UC) – UCNPs. W takich związkach istnieje możliwość obserwacji emisji fali elektromagnetycznej o wyższej energii od tej, którą materiał został wzbudzony np. emisji w zakresie UV-VIS, przy wzbudzeniu w zakresie bliskiej podczerwieni (ang. near-infrared, NIR). Wprowadzenie jonów lantanowców i innych metali nieaktywnych optycznie (srebro, złoto) do wspólnej matrycy pozwala na połączenie właściwości antybakteryjnych i zdolności do bioobrazowania. Wykazano, że aktywność opartych na UC dodatnio naładowanych nanocząstek jest silniejsza wobec bakterii Gram-ujemnych, które mają ujemny ładunek powierzchniowy. UCNPs są rozpoznawane przez lektyny i białka powierzchniowe bakterii, co jest modyfikowane dzięki dołączeniu różnych ligandów (peptydy, glikany, przeciwciała, aptamery) do nanocząstek (Li et al. 2023). Zastosowanie UCNP obrazuje **Rycina 7**.



Rycina 7. Wykorzystanie systemów opartych o nanocząstki UCNPs w terapiach antybakteryjnych: a) dostarczenie substancji aktywnej o aktywności antybakteryjnej w miejsce działania i jej uwolnienie na skutek działania światła z zakresu bliskiej podczerwieni NIR; b) bioobrazowanie przebiegu infekcji bakteryjnej *in-vivo*; c) terapia fototermiczna; d) terapia fotodynamiczna

Istnieje wiele badań opisujących wpływ związków o strukturze apatytu domieszkowanych jonami lantanowców na komórki eukariotyczne. Efekt ten jest w dużym stopniu zależny od stężenia związku apatytu w badanym układzie, zawartości jonu metalu w matrycy apatytu, sposobu kontaktu komórek z materiałem (bezpośredni/pośredni), czasu kontaktu oraz przede wszystkim rodzaju badanej linii komórkowej (zdrowa/nowotworowa) (Tite et al. 2018).

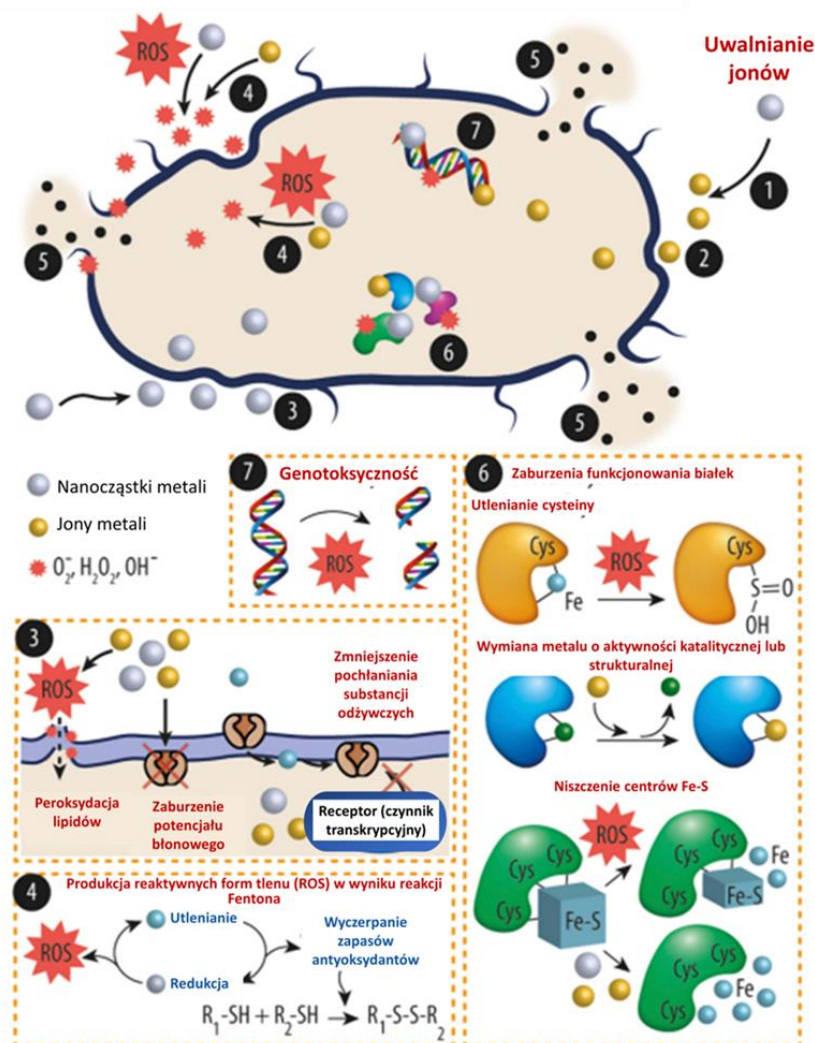
Jak już wspomniano, jony lantanowców wprowadzane są do matrycy hydroksyapatytowej ze względu na swoje właściwości luminescencyjne i związaną z tym możliwość diagnostyczną. Często łączone są również z jonami metali o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

I.2.4 Aktywność antybakteryjna i cytotoksyczność różnych form metali przejściowych: srebra, miedzi i cynku

Metale przejściowe bloku d układu okresowego i ich aktywność antybakteryjna jest tematem, który od wielu pozostaje w kręgu zainteresowań naukowców. Efekt ten jest zależny od różnych mechanizmów, które zostały przedstawione w poprzednich rozdziałach i różni się w zależności od formy związku. Inną aktywność wykazują bowiem czyste metale, ich jony, tlenki metali, ich nanorozmiarowe cząstki metaliczne czy nanometryczne tlenki metali. Dodatkowo metale przejściowe bloku d często wprowadzane do są do materiałów kompozytowych na bazie polimerów lub hydrożeli, często modyfikowanych na przykład przez dołączenie antybiotyku. Niektóre nanorozmiarowe cząstki (np. CuSNPs) po naświetleniu promieniowaniem o odpowiedniej długości fali prowadzą do produkcji dużej ilości reaktywnych form tlenu i uszkodzenia komórki na skutek stresu oksydacyjnego (terapia fotodynamiczna PDT). CuNPs laserem o długości fali z zakresu NIR powoduje z kolei uwolnienie jonów Cu^{2+} , prowadzących do wytworzenia wolnych rodników tlenowych, i dużej ilości ciepła, co bezpośrednio wpływa na komórkę bakteryjną (Mutalik et al. 2022). Mechanizm działania metali przejściowych ilustruje **Rycina 8**.

Metalem przejściowym o dobrze scharakteryzowanej aktywności antybakteryjnej jest srebro, które skutecznie hamuje wzrost bakterii w bardzo niskich stężeniach. Aktywność biologiczną srebra wykazują głównie formy jonowe. Mechanizm działania form jonowych obejmuje następujące etapy (Mittapally et al. 2018):

- Wniknięcie do komórki za pomocą białek transbłonowych,
- Hamowanie aktywności białek, w tym enzymów poprzez formowanie mostków disiarczkowych S-S oraz hamowanie syntezy białek przez wiązanie z podjednostką 30S rybosomów,
- Uszkodzenie DNA poprzez interkalację pomiędzy pary zasad purynowych i pirymidynowych i uszkodzanie wiązań wodorowych pomiędzy nimi.



Rycina 8. Mechanizm antybakteryjnej aktywności nanocząstek metali przejściowych oraz jonów metali przejściowych polegający na: 1) uwolnieniu jonów metali z nanocząstek; 2) bezpośrednim oddziaływaniu jonów metali z powierzchnią komórki; 3) bezpośrednim oddziaływaniu nanocząstek z powierzchnią komórki; 4) zwiększeniu wytwarzania reaktywnych form tlenu, co prowadzi do stresu oksydacyjnego skutkującego utlenieniem białek, lipidów i DNA; 5) uszkodzeniu osłon komórkowych, co prowadzi do zwiększenia przepuszczalności komórki; 6) zaburzeniu funkcjonowania białek, w tym enzymów; 7) uszkodzeniu DNA (Mutalik et al. 2022)

Aktywność biologiczną wykazano zarówno dla nanocząstek srebra (AgNPs) jak i dla nanocząstek tlenku srebra (Ag₂ONPs). Ponadto jony Ag⁺ wprowadzane są do matrycy HAp lub do materiałów tytanowych, gdzie wykazuje aktywność zarówno względem bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Poza aktywnością antybakteryjną obserwowano również poprawę gojenia kości po aplikacji materiałów z dodatkiem nanoform srebra. Wykazano również, że nanocząstki srebra mają wyższą aktywność niż cząstki o większych rozmiarach, co może być związane z lepszym uwalnianiem jonów Ag⁺ (Franco et al. 2022).

Aktywność AgNPs opiera się przede wszystkim na oddziaływaniach fizycznych z peptydoglikanem, co prowadzi do zmian strukturalnych ściany komórkowej i zmienia przepuszczalność komórki, a także na interakcji z grupami -SH białek i zapobieganiu replikacji DNA. Ag₂ONPs wpływa natomiast bezpośrednio na DNA bakteryjne, w wyniku czego dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M. Ponadto nanoformy srebra powodują wytwarzanie dużej ilości reaktywnych form tlenu, co prowadzi do uszkodzeń komórki w wyniku stresu oksydacyjnego. Odnotowano również, że AgNPs o rozmiarach poniżej 6 nm są w stanie penetrować biofilm bakteryjny na całej grubości (Franco et al. 2022). Hydroksyapatyty domieszkowane jonami srebra wykazują aktywność antybakteryjną i przeciwgrzybową względem szerokiego panelu patogenów. Srebro w niskich stężeniach nie wykazuje cytotoksyczności względem komórek eukariotycznych (Tite et al. 2018).

Spośród jonów dwuwartościowych aktywność antybakteryjną posiadają na przykład jony Cu²⁺ i Zn²⁺. Aktywność jonów i nanocząstek miedzi jest dobrze zbadana i szeroko opisana w literaturze. Warto podkreślić, że Cu²⁺ występuje naturalnie w komórkach bakteryjnych jako mikroelement niezbędny do zachowania homeostazy. W komórkach *P. aeruginosa* bierze udział w tlenowych reakcjach metabolicznych i w konsekwencji ułatwia namnażanie bakterii w organizmie gospodarza (Argüello et al. 2013; Tarawneh et al. 2019). Z tego względu tolerancja względem jonów Cu²⁺ jest zdecydowanie wyższa niż w przypadku innych metali o charakterze antybakteryjnym np. Ag⁺, co wiąże się z koniecznością stosowania wyższych jej dawek do osiągnięcia pożądanego efektu antybakteryjnego (Begg 2019).

Należy zwrócić też uwagę na fakt, że miedź może występować na dwóch stopniach utlenienia: I i II. Jony Cu⁺ są nietrwałe i szybko ulegają utlenieniu do jonów Cu²⁺, natomiast możliwe jest uzyskanie kompleksów z jonami miedzi (Cu⁺) o zadowalającej stabilności (Le

Fur et al. 2016). Jony Cu^+ działają głównie na zasadzie katalizowania reakcji utleniania makromolekuł kluczowych dla funkcjonowania komórek, takich jak białka, lipidy i kwas nukleinowe. W reakcji tej w obecności nadtlenu wodoru H_2O_2 powstaje rodnik wodorotlenkowy $\text{OH}\cdot$ (Begg 2019). Podobna aktywność została zaobserwowana w przypadku jonów Cu^{2+} (Lemire et al. 2013).

Mechanizm aktywności jonów miedzi względem bakterii opiera się przede wszystkim na uszkodzeniu błony zewnętrznej, co prowadzi do wzrostu przepuszczalności osłon komórkowych (Jiang et al. 2019). Podobnie jak wiele innych metali, jony miedzi zwiększają produkcję wolnych rodników w komórce, co zaburza równowagę oksydoredukcyjną i prowadzi do stresu oksydacyjnego. Dodatkowo obserwuje się wiązanie się jonów Cu^{2+} z grupami funkcyjnymi w cząsteczkach białek (grupy tiolowe, imidazolowe, aminowe i karboksylowe), co zmienia ich strukturę. Dochodzi także do zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych, zaburzenia transportu komórkowego oraz uszkodzenia kwasów nukleinowych. Zaobserwowano również zwiększenie aktywności makrofagów względem bakterii (Kolmas et al. 2014).

Nanocząstki miedzi (CuNP) wykazują zmienną aktywność antybakteryjną w zależności od użytej metody syntezy. Dodatkowo opisano wpływ zewnętrznych czynników, takich jak promieniowanie UV, na skuteczność ich działania. Nanocząstki miedzi wykazują skuteczność w hamowaniu wzrostu *P. aeruginosa*. Ponadto wykazano, że nanocząstki miedzi (CuNP) są bardziej aktywne niż nanocząstki tlenku miedzi (CuONP), co może być związane z lepszym przekazywaniem elektronów pomiędzy bakteriami a CuNP (Vimbela et al. 2017). Niestety otrzymanie stabilnych CuNP jest trudne, a otrzymany produkt często ulega szybkiemu utlenieniu w podłożu lub w kontakcie z powietrzem (Giannousi et al. 2014). W przypadku CuNP kształt nanocząstek jest czynnikiem silnie wpływającym na uwalnianie wolnych jonów z nanomateriału i nanocząstki o kształcie płytki (*plate-like*) uwalniają więcej jonów Cu^{2+} niż nanocząstki o kształcie ziaren (*grain-like*) oraz igieł (*needle-like*), co wynika ze stosunku powierzchni do objętości cząstek (Vimbela et al. 2017). Aktywność antybakteryjną wykazuje również tlenek miedzi (I) Cu_2O oraz jego nanometryczny odpowiednik Cu_2ONP (Giannousi et al. 2014).

Hydroksyapatyt domieszkowany jonami Cu^{2+} wykazuje aktywność zarówno względem bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*), Gram-ujemnych (*E. coli*) jak i grzybów (*Candida albicans*) (Tite et al. 2018; Jiang et al. 2019; Sobierajska et al. 2021a). Bakterie

Gram-ujemne, jak opisano wcześniej, są bardziej wrażliwe na działanie nanocząstek od bakterii Gram-dodatnich (Tite et al. 2018).

Obecność miedzi w środowisku może dodatkowo wpływać na zmianę wrażliwości bakterii na antybiotyki. Wykazano, że jony miedzi mogą wiązać się z antybiotykami z grupy penicylin, β -laktamów, aminoglikozydów, makrolidów, chinolonów i innych, co powoduje spadek ich aktywności. Z drugiej strony, czasem może dochodzić do zwiększenia aktywności substancji dezynfekujących, głównie peptydów przeciwbakteryjnych (ang. *antimicrobial peptides*, AMP) czy czwartorzędowych związków amonowych (ang. *quaternary ammonium compounds*, QAC) (Poole 2017).

Bakterie wykształciły szereg mechanizmów chroniących je przed toksycznym wpływem jonów, w tym jonów miedzi (Teitzel and Parsek 2003). Jednym z ważniejszych jest ich usuwanie za pomocą systemów *efflux*. Miedź może być aktywnie usuwana z komórki, w co zaangażowane są produkty genów *copB* i *copD*, lub wiązana przez białka błonowe będące produktami genów *copA* i *copC*. Innym systemem zaangażowanym w usuwanie toksycznych jonów z komórki jest ATPaza typu P, która również działa jak pompa (Tarawneh et al. 2019). W przypadku *P. aeruginosa*, oprócz wyrzutu toksycznych jonów z komórki, zaobserwowano również zmniejszenie przepuszczalności błony zewnętrznej oraz tworzenie kompleksów z kationami oraz przekształcanie metali do mniej toksycznych związków chemicznych (Teitzel and Parsek 2003; Tarawneh et al. 2019).

Niestety pomimo udowodnionych silnych właściwości antybakteryjnych, jony miedzi wykazują efekt toksyczny względem komórek eukariotycznych, szczególnie w wyższych stężeniach (Fowler et al. 2019). Cytotoksyczność nanocząstek miedzi (CuNP) wynika głównie z uwolnionych jonów miedzi, dlatego rozpuszczalność materiału jest czynnikiem, który szczególnie mocno koreluje z jego toksycznością. Przykładowo, CuONP, które lepiej się rozpuszczają, wykazują wyższą cytotoksyczność niż CuO. Kolejnym czynnikiem wpływającym na toksyczność jest wielkość nanocząstek, i generalnie im mniejsza frakcja tym wyższa toksyczność (Vimbela et al. 2017).

Hydroksyapatyty domieszkowane jonami miedzi mogą wykazywać efekt toksyczny w wyższych stężeniach oraz działać stymulująco na wzrost komórek w niższych stężeniach. Wykazano, że dodatek jonów miedzi może powodować większą adsorpcję białek oraz wzrost i różnicowanie komórek tkanki kostnej w miejscu wszczepienia implantu (Tite et al. 2018).

Wykazano również, że miedź, zarówno w postaci wolnych jonów jak i domieszka w materiałach, może prowadzić do hemolizy oraz zmiany morfologii erytrocytów. Zaobserwowano, że inkubacja w obecności wysokich stężeń jonów miedzi prowadzi do zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej erytrocytów przy jednoczesnym spadku ich odkształcalności, która jest jedną z charakterystycznych cech komórek. Podatność na odkształcenia jest jedną z ważniejszych cech zdrowego erytrocytu, ponieważ umożliwia przeciskanie się nawet przez najwęższe naczynia włosowate. Utrata tej cechy może skutkować wystąpieniem anemii u człowieka, która wynika z braku możliwości swobodnego poruszania się krwinek w krwiobiegu i zatrzymania ich w drobnych naczyniach, gdzie ulegają fagocytozie (Adams et al. 1979). Dodatkowo może dochodzić do denaturacji hemoglobiny i gromadzenia się jej w postaci złogów wewnątrz komórek (tzw. ciała Heinsa) (Adams et al. 1979).

Drugim metalem o aktywności antybakteryjnej jest cynk, ale pomimo że jego mechanizm działania jest zbliżone do tego opisanego dla miedzi oraz innych metali, efekt antybakteryjny polega głównie na interakcji z osłonami komórkowymi, co prowadzi do zmian strukturalnych i zwiększenia przepuszczalności komórki. Napływające do komórki jony mogą wchodzić w interakcje z bakteryjnym DNA i hamować replikację (Ressler et al. 2021). Tolerancja komórek bakteryjnych na jony cynku jest stosunkowo wysoka, co wynika z jego istotnej roli w metabolizmie, na przykład jako kofaktor metaloprotein (Begg 2019).

Cynk, jako mikroelement, podobnie jak miedź, sprzyja szybszej regeneracji tkanki kostnej, a materiały współdomieszkowane jonami Zn^{2+} i Cu^{2+} są mniej toksyczne od tych domieszkowanych jedynie miedzią (Ressler et al. 2021). Aktywność biologiczną wykazano również dla nano tlenku cynku (ZnONPs), który powodował przede wszystkim uszkodzenie osłon komórkowych oraz nasilał produkcję reaktywnych form tlenu (Franco et al. 2022). Domieszkowanie hydroksyapatytu jonami cynku poprawia jego właściwości regeneracyjne, co zbadano na modelu osteoblastów (Tite et al. 2018).

Podsumowując, *P. aeruginosa* to mikroorganizm wielolekooporny charakteryzujący się szeroką gamą czynników wirulencji i wysoką patogennością, co stwarza niebezpieczeństwo dla zdrowia ludzi, szczególnie tych o obniżonej odporności. Ze względu na rosnącą antybiotykooporność wciąż poszukuje się alternatywnych terapii przeciwbakteryjnych wśród których duży potencjał wykazuje szeroko pojęta nanotechnologia. Nanocząstki mogą wpływać na komórki na zasadzie oddziaływań

fizycznych i/lub być nośnikiem jonów o aktywności antybakteryjnej. Jako nośniki jonów często wykorzystuje się matrycę nanohydroksyapatytową, ze względu na jej wysoką biokompatybilność i niską cytotoksyczność wobec komórek eukariotycznych. Nie bez znaczenia jest również fakt, że hydroksyapatyt jest naturalnym składnikiem kości, przez co wykorzystywany jest do wytwarzania materiałów o potencjalnym zastosowaniu w implantologii. Do matrycy apatytowej można wprowadzać również jony lantanowców, które dzięki zdolności do luminescencji mają zastosowanie w bioobrazowaniu. Ze względu na fakt, że procedury implantologiczne są obarczone dużym ryzykiem rozwoju infekcji, na etapie projektowania nowych materiałów należy badać jaki wpływ mają one na wzrost, patogenność i właściwości powierzchniowe drobnoustrojów.

II. CEL ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie aktywności biologicznej jonów lantanowców (Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , Lu^{3+}) oraz jonów metali przejściowych (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) w formie wolnej oraz jako domieszek w różnych formach nanohydroksyapatytu wobec wybranych szczepów wzorcowych oraz klinicznych *P. aeruginosa*. Cel rozprawy doktorskiej realizowano poprzez badanie:

- właściwości antybakteryjnych jonów lantanowców i jonów metali przejściowych wobec testowanych szczepów *P. aeruginosa*,
- wpływu wybranych jonów lantanowców na wirulencję *P. aeruginosa*, (tworzenie biofilmów oraz ilość uwolnionego eDNA, produkcję i aktywność picyjaniny, piowerdyny i elastazy oraz wpływ na ruch typu *swimming*, *swarming* i *twitching*) oraz na właściwości powierzchniowe komórki (hydrofobowość, ładunek powierzchniowy oraz przepuszczalność osłon komórkowych),
- aktywności antybakteryjnych oraz wpływu na formowanie biofilmu różnych form (nanoformy polikrystaliczne w postaci sproszkowanej, koloidy, hydrożele, tabletki) nanoapatytu domieszkowanego jonami lantanowców i metali przejściowych
- cytotoksyczności jonów lantanowców oraz wybranych nanomateriałów na modelu erytrocytów zwierzęcych oraz linii komórkowej osteoblastów mysich,
- wpływu jonów lantanowców na wrażliwość szczepów *P. aeruginosa* w obecności wybranych antybiotyków.

Ponadto w rozprawie doktorskiej badano wpływ składników podłoż microbiologicznych na aktywność wybranych jonów metali przejściowych bloku d.

Określono również wpływ preparatyki otrzymanych materiałów (metoda hydrotermalna/współstrąceniowa) na aktywność antybakteryjną i cytotoksyczność nanomateriałów domieszkowanych i współdomieszkownych kationami Eu^{3+} i Cu^{2+} .

III. MATERIAŁY I METODY

III.1 Biologiczne modele badawcze

Szczepy Pseudomonas aeruginosa

W badaniach zastosowano szczepy referencyjne *Pseudomonas aeruginosa*: PAO1 (ATCC 15692) i ATCC 27853 pochodzące z kolekcji American Type Culture Collection oraz izolaty kliniczne: PA 3, PA 12, PA 15, PA 18, PA 20, PA 14/3, PA 15/3, PA 82/3, PA 9/5, PA 164 i PA 249P pochodzące z kolekcji szczepów Zakładu Biologii Patogenów i Immunologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Szczepy kliniczne zostały wybrane zgodnie z różnymi wzorcami wrażliwości na antybiotyki, jak pokazano w **Tabeli S.1.** zamieszczonej w Materiałach dodatkowych (Sobierajska et al. 2018). Szczepy przechowywano w temperaturze -80°C w bulionie tryptozowo-sojowym (TSB, (Biomaxima, Polska) uzupełnionym 20% glicerolem (Chempur, Polska).

Do hodowli bakterii użyto następujących podłoży:

Podłoża pełne:

- Bulion Luria Bertani (LB) (BioShop, Canada) (pH = 6,8-7,2),
- Bulion Mueller Hinton Broth (MHB) (z 2,741 mg Ca^{2+} /l i 5,282 mg Mg^{2+} /l) (Oxoid, Wielka Brytania) (pH $7,3 \pm 0,1$),
- Bulion tryptozowo-sojowy (TSB, (Biomaxima, Polska) (pH $7,3 \pm 0,2$),
- Bulion BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid, UK) (pH $7,4 \pm 0,2$),
- Bulion odżywczy (Biomaxima, Polska),
- Podłoże stałe Mueller Hinton Agar (MHA) (Biomaxima, Polska).

Podłoża minimalne:

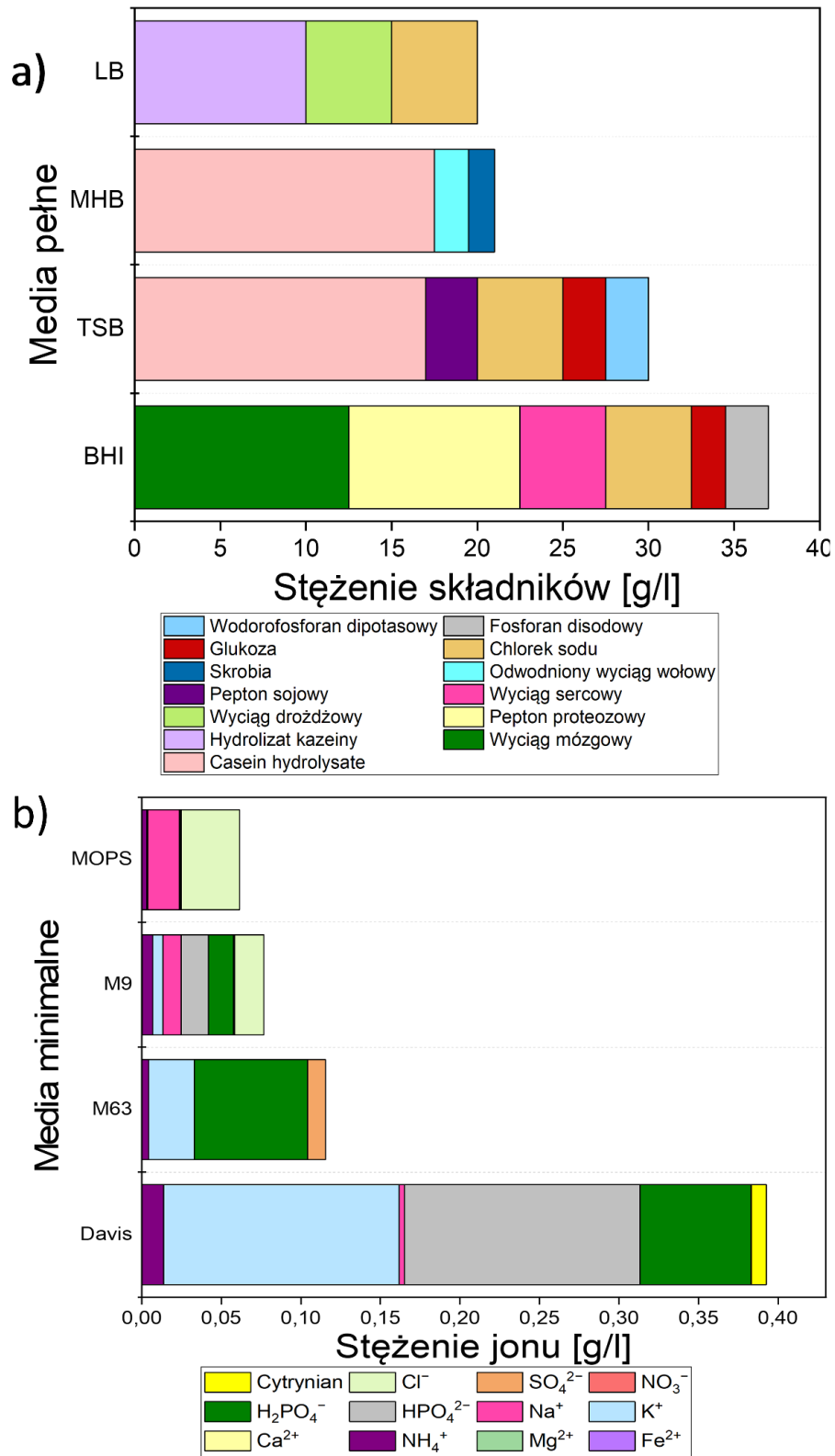
- Podłoże MOPS (pH 6,5 oraz 7,5),
- Podłoże Davisa (pH 7,3),
- Podłoże M9 (pH 7,3)
- Podłoże M63 (pH 7,2).

Podłoża minimalne zostały przygotowane z naważek zamieszczonych w **Tabeli 4.** pH podłoż zostało ustalone przy udziale 10M NaOH, POCH, Polska) oraz kwasu solnego (25-

28%, WarChem, Polska) (pH-metr METTLER TOLEDO MP220). Porównanie składów poszczególnych podłoży ilustruje **Rycina 9**.

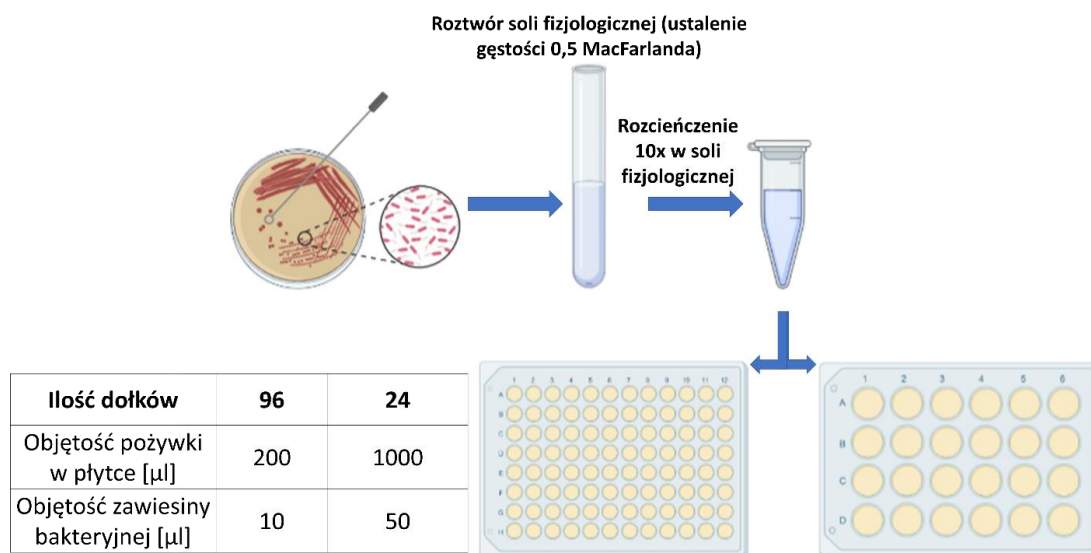
Tabela 4. Składniki podłoży minimalnych wykorzystanych w badaniach (Rewak-Soroczynska et al. 2022a)

	MOPS	M9	M63	Davis
Węgiel	Glukoza – $2 \cdot 10^{-2}$ M	Glukoza – $2.2 \cdot 10^{-2}$ M	Glukoza – $1.1 \cdot 10^{-2}$ M	Glukoza – $5.5 \cdot 10^{-2}$ M
Fe ²⁺	FeSO ₄ · 7 H ₂ O – $1 \cdot 10^{-5}$ M	-	FeSO ₄ · 7 H ₂ O – $1.8 \cdot 10^{-6}$ M	-
Mg ²⁺	Mg(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O – $5.2 \cdot 10^{-4}$ M	MgSO ₄ · 7H ₂ O – $2 \cdot 10^{-3}$ M	MgSO ₄ · 7 H ₂ O – $1 \cdot 10^{-3}$ M	MgSO ₄ · 7 H ₂ O – $4 \cdot 10^{-4}$ M
NH ⁴⁺	NH ₄ Cl – $9.52 \cdot 10^{-3}$ M	NH ₄ Cl – $1.97 \cdot 10^{-2}$ M	(NH ₄) ₂ SO ₄ – $1.5 \cdot 10^{-2}$ M	(NH ₄) ₂ SO ₄ – $5 \cdot 10^{-2}$ M
Ca ²⁺	CaCl ₂ – $5 \cdot 10^{-7}$ M	CaCl ₂ – $1 \cdot 10^{-4}$ M	-	-
PO ₄ ³⁻	K ₂ HPO ₄ – $1.32 \cdot 10^{-3}$ M	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O – $4.8 \cdot 10^{-2}$ M KH ₂ PO ₄ – $2.2 \cdot 10^{-2}$ M	KH ₂ PO ₄ – $1 \cdot 10^{-1}$ M	K ₂ HPO ₄ – $2.68 \cdot 10^{-1}$ M KH ₂ PO ₄ – $9.8 \cdot 10^{-2}$ M
Pozostałe składniki	MOPS – $4 \cdot 10^{-2}$ M Tricine[N-Tris (Hydroxymethyl) Methylglycine] – $4 \cdot 10^{-3}$ M K ₂ SO ₄ – $2.9 \cdot 10^{-4}$ M NaCl – $5 \cdot 10^{-2}$ M (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ – $3 \cdot 10^{-9}$ M HBO ₃ – $4 \cdot 10^{-7}$ M Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O – $3 \cdot 10^{-8}$ M CuSO ₄ x 5 H ₂ O – $1 \cdot 10^{-8}$ M Mn(NO ₃) ₂ · H ₂ O – $8 \cdot 10^{-8}$ M ZnSO ₄ · 7 H ₂ O – $1 \cdot 10^{-8}$ M	NaCl – $8.6 \cdot 10^{-3}$ M	-	Cytrynian sodu – $1.29 \cdot 10^{-2}$ M
Źródło	(LaBauve and Wargo, Matthew 2015)	(Coffey and Anderson 2014)	(Coffey and Anderson 2014)	(Atlas 2004)



Rycina 9. Porównanie stężeń poszczególnych składników w podłożach mikrobiologicznych pełnych a), oraz minimalnych b) (Rewak-Soroczynska et al. 2022a)

Bakterie pobierane z zamrożenia hodowano na płytkach ze stałym podłożem MHA w 37°C a następnie wyrosłe kolonie zawieszano w soli fizjologicznej (0,9% NaCl (Chempur, Polska) do gęstości optycznej 0,5 w skali MacFarlanda (Densimat, Biomérieux, Francja) i rozcieńczano 10x w soli fizjologicznej według schematu przedstawionego na **Rycina 10**.



Rycina 10. Schemat przygotowania zawiesiny bakteryjnej i objętości pożywek oraz zawiesiny bakteryjnej dodawane do dołków płytek 96- i 24-dołkowych. (Schemat opracowano z wykorzystaniem Biorender.com)

Eukariotyczne linie komórkowe

Linia komórkowa 7F2 mysich osteoblastów pochodziła z kolekcji Katedry Biostruktury i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Przed eksperymentami hodowle komórkowe były trzykrotnie pasażowane i przechowywane w wysoko glukozyowym medium hodowlanym DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Biowest, Francja).

Do hodowli komórek eukariotycznych stosowano następujące medium hodowlane:

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) z L-glutaminą (Biowest, Francja). Medium uzupełniono o 10% płodową surowicę bydlęcą (ang. *fetal bovine serum*, FBS; Biowest, Francja), 200U/ml penicyliny i 200μg/ml streptomycyny.

Erytrocyty

Frację erytrocytów uzyskano z krwi baraniej (ProAnimali, Polska), którą odwirowywano przez 5 minut (3000 obr./min, Sigma 3-16KL) w celu uzyskania frakcji erytrocytów. Wirowanie powtarzano trzykrotnie i za każdym razem czerwone krwinki oczyszczano solą fizjologiczną (0,9% NaCl (Chempur, Polska) w wodzie destylowanej) w celu usunięcia pozostałości roztworu Alsevera (stosowanego przez producenta do konserwacji krwi). Krwinki zawieszono w soli fizjologicznej w stosunku 1:1.

III.2 Jony lantanowców oraz jony metali przejściowych

W badaniach wykorzystano jony następujących lantanowców: ceru (Ce^{3+}), prazeodymu (Pr^{3+}), neodymu (Nd^{3+}), samaru (Sm^{3+}), europu (Eu^{3+}), gadolinu (Gd^{3+}), terbu (Tb^{3+}), dysprozu (Dy^{3+}), holmu (Ho^{3+}), erbu (Er^{3+}), tulu (Tm^{3+}), iterbu (Yb^{3+}) oraz lutetu (Lu^{3+}). Roztwory azotanów lantanowców ($Ln(NO_3)_3$) w wodzie dejonizowanej otrzymano przez rozpuszczenie sześciowodnego azotan ceru (III) 99,5% (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, USA) oraz roztworzenie poszczególnych tlenków: prazeodymu (III, IV) 99,999% (Sigma Aldrich, USA), neodymu (III) 99,99% (ABCR, Niemcy), samaru (III) 99,99% (Sigma Aldrich, USA), europu (III) 99,99% (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, USA), gadolinu (III) 99,99% (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, USA), terbu (III) 99,99% (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, USA), dysprozu (III) 99,9% (Ubichem Limited, Wielka Brytania), holmu (III) 99,99% (Rare Earth Products Limited, USA), erbu (III) 99,99% (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, USA), tulu (III) 99,9% (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, USA), iterbu (III) 99,99% (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, USA) i lutetu (III) 99,99% (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, USA) w 10% kwasie azotowym (HNO_3) (suprapur; Merck, Niemcy). Stężenie jonów poszczególnych Ln^{3+} wynosiło 10 mg/ml w roztworach $Ln(NO_3)_3$.

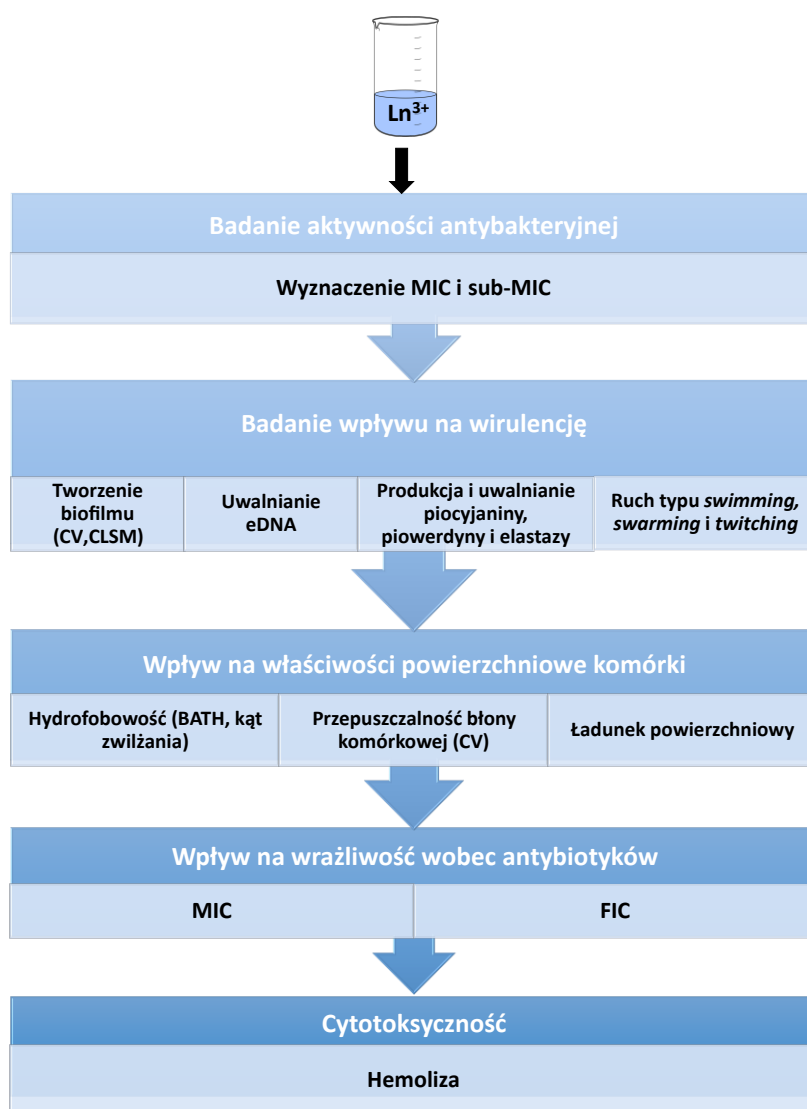
Roztwory wybranych jonów przejściowych bloku d uzyskano przez rozpuszczenie w wodzie dejonizowanej następujących związków: $AgNO_3$ (POCH, Polska), $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ (Acros Organics, Belgia) and $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (Chempur, Polska). Podobnie jak w przypadku jonów Ln^{3+} stężenie jonów Ag^+ w roztworze $AgNO_3$, jonów Cu^{2+} w roztworze $Cu(NO_3)_2$ i jonów Zn^{2+} w roztworze $Zn(NO_3)_2$ wynosiło 10 mg/ml.

Roztwory jonów lantanowców i jonów metali przejściowych zostały przygotowane przez dr Katarzynę Szyszkę (Oddział Fizykochemii Biomedycznej, Instytut Niskich

Temperatur i Badań Strukturalnych PAN) zgodnie z metodyką opracowaną przez Profesora Rafała Wiglusza.

III.2.1 Aktywność biologiczna roztworów jonów lantanowców i jonów metali przejściowych bloku d

Badania aktywności biologicznej wybranych jonów lantanowców oraz metali przejściowych prowadzono zgodnie ze schematem przedstawionym na **Rycinie 11**.

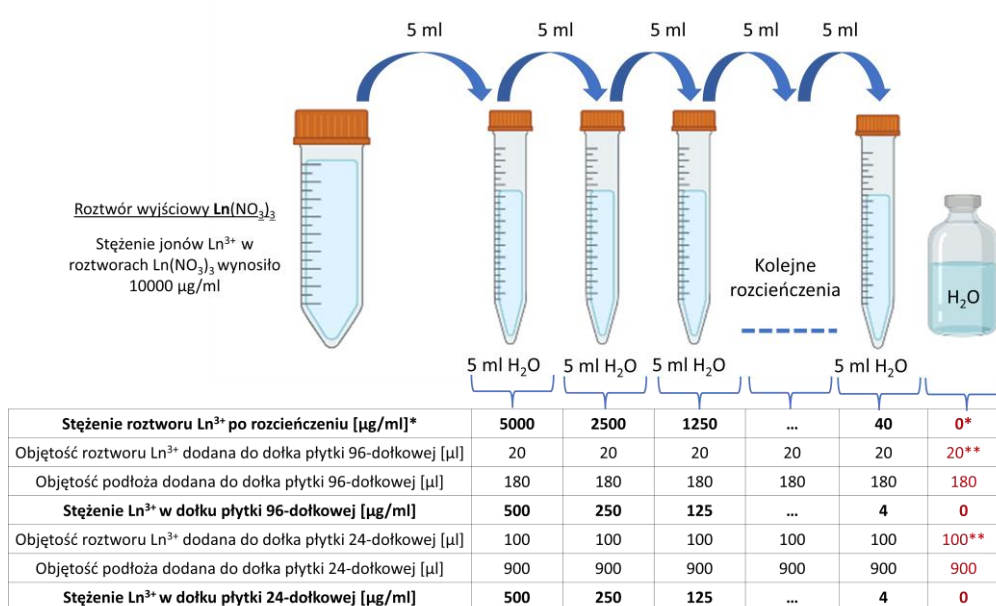


Rycina 11. Schemat badań z udziałem jonów lantanowców

III.2.1.1 Badanie aktywności antybakteryjnej (wyznaczenie MIC i sub-MIC)

Do oceny przeciwbakteryjnej aktywności jonów lantanowców zastosowano metodę mikrorozcieńczeń zgodnie ze standardami EUCAST (https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/) z własnymi modyfikacjami. Schemat

przygotowania podwójnych rozcieńczeń jonów lantanowców w wodzie oraz proporcje w jakiej zmieszano poszczególne roztwory z podłożem hodowlanym obrazuje **Rycina 12**. 5 ml roztworu wyjściowego $\text{Ln}(\text{NO}_3)_3$ (tzw. *stock*) o stężeniu 10 mg/ml rozcieńczano w proporcji 1:1 sterylną wodą destylowaną i intensywnie mieszano, a następnie przenoszono 5 ml do kolejnej probówki. Proces powtarzano aż do uzyskania stężenia 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, co odpowiadało końcowemu stężeniu 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, po 10-krotnym rozcieńczeniu podłożem hodowlanym (MHB) w dołku płytki wielodołkowej (24 lub 96-dołków) używając objętości wykazanych na **Rycina 12**.



* - Próba kontrolna

** - Zamiast roztworów Ln^{3+} dodano wodę destylowaną

Rycina 12. Schemat podwójnych rozcieńczeń jonów lantanowców i ich uzyskane stężenia końcowe (Schemat opracowano z wykorzystaniem Biorender.com)

Zawiesiny bakterii w soli fizjologicznej przygotowano zgodnie z wcześniejszym opisem (**Rycina 10**). Badanie aktywności antybakteryjnej jonów lantanowców przygotowano w dwóch wariantach: w dołkach płytki 96- i 24-dołkowej zgodnie z wcześniejszymi schematami (**Rycina 10** i **Rycina 12**). Oprócz kontroli wzrostu przygotowano również próby ślepe, zawierające pożywkę suplementowaną badanymi jonami, bez dodatku zawiesiny bakteryjnej.

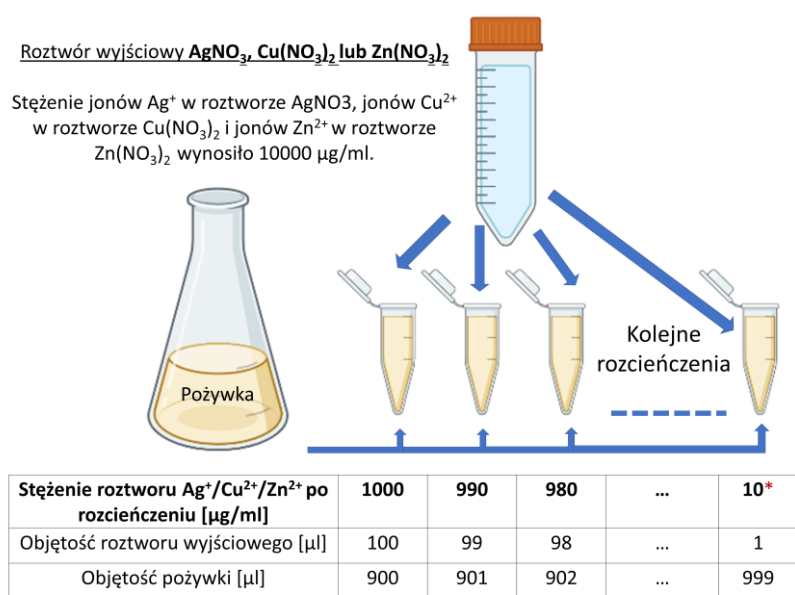
Płytki titracyjne inkubowano przez 24h z wytrząsaniem (120 obr/min) i mierzono gęstość optyczną przy długości fali 600 nm za pomocą spektrofotometru (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific). Pierwsze stężenie Ln^{3+} w którym nie występowało zmętnienie hodowli uznawano za wartość minimalnego stężenia hamującego wzrost (ang. *minimal inhibitory concentration*, MIC). Stężenia poniżej wartości MIC, w których obserwowano wzrost gęstości hodowli uznawano za wartości stężeń sub-inhibicyjnych (sub-MIC).

Następnie płytki poddawano działaniu ultradźwięków przez 15 min w myjce ultradźwiękowej (Polonic, Polska) na lodzie, aby ułatwić oderwanie komórek od dna dołków. Powstałe zawiesiny zbierano do probówek typu Eppendorf, energicznie mieszano (VORTEX MX-S) i wykonywano seryjne 10-krotne rozcieńczenia w płynie fizjologicznym. Uzyskane rozcieńczone zawiesiny posiewano na płytki MHA, a po całonocnej inkubacji w temperaturze 37°C liczono wyrosłe kolonie i obliczano wartości CFU/ml (ang. *colony-forming unit*; jednostka tworząca kolonię) według wzoru:

$$\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} = \text{ilość kolonii} \times \text{rozcieńczenie} \times \frac{1}{\text{objętość}}$$

W przypadku wybranych jonów metali przejściowych bloku d rozcieńczenia przygotowano metodą seryjnych mikrorozcieńczeń z roztworów wyjściowych: AgNO_3 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ i $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. Stężenie jonów Ag^+ w roztworze AgNO_3 , jonów Cu^{2+} w roztworze $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ i jonów Zn^{2+} w roztworze $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ wynosiło 10 mg/ml. Roztwory rozcieńczano do pożądanych stężeń bezpośrednio w podłożach hodowlanych pełnych (LB, MHB, TSB i BHI) oraz minimalnych (podłoże MOPS, podłoże Davisa, podłoże M9 i podłoże M63).

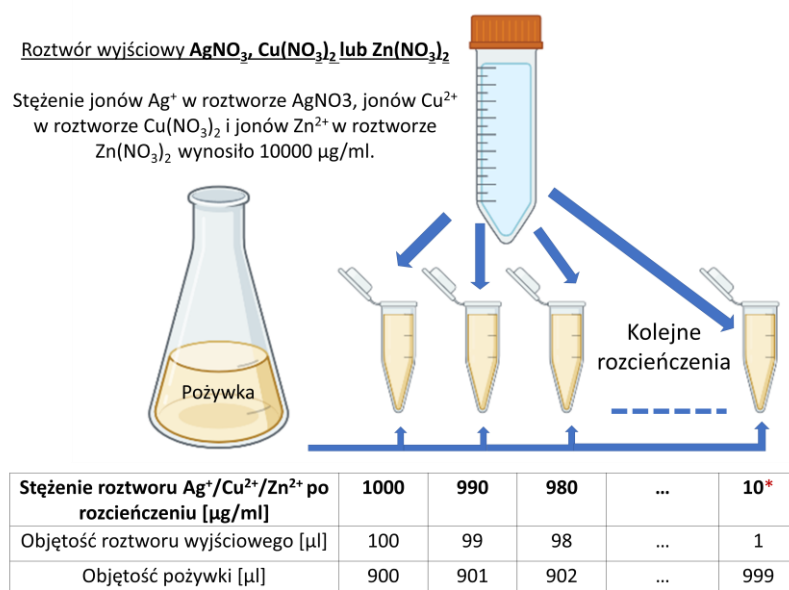
Schemat przygotowywania rozcieńczeń jonów metali przejściowych obrazuje



* - W przypadku Ag^+ przygotowano również roztwory o stężeniach:

- 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 (poprzez dwukrotne rozcieńczanie roztworu o stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$)
- 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 (poprzez dwukrotne rozcieńczanie roztworu o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$)

Rycina 13. Do dołków płytki 96-dołkowej dodano po 200 μl roztworów jonów metali w podłożu w trzech powtórzeniach i dodawano zawiesinę bakteryjną przygotowaną jak opisuje **Rycina 10**. Sposób inkubacji oraz odczyt wyników (pomiar zmętnienia) wykonano tak jak opisano w sekcji dla jonów lantanowców. Oprócz kontroli wzrostu przygotowano również próby ślepe, zawierające pożywkę suplementowaną badanymi jonami, bez dodatku zawiesiny bakteryjnej. Kontrolę wzrostu stanowiło czyste podłoże hodowlane. Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.



- * - W przypadku Ag^+ przygotowano również roztwory o stężeniach:
- 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 (poprzez dwukrotne rozcieńczenie roztworu o stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$)
 - 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 (poprzez dwukrotne rozcieńczenie roztworu o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$)

Rycina 13. Schemat rozcieńczeń jonów metali przejściowych i ich uzyskane stężenia końcowe (Schemat opracowano z wykorzystaniem Biorender.com)

III.2.1.2 Pomiar ilości wytworzonego biofilmu

Do płytki 96-dółkowej dodano w trzech powtórzeniach roztwory jonów lantanowców i pożywkę MHB według schematu (**Rycina 12.**). Dodano zawiesiny bakteryjne, które przygotowano zgodnie ze schematem (**Rycina 10.**). Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h z wytrząsaniem (120 obr./min). W celu usunięcia niezwiązanych komórek planktonicznych, hodowle odciągnięto za pomocą pipety a dołki dwukrotnie przepłukano płynem fizjologicznym. Zdolność do tworzenia biofilmów oceniono za pomocą dwóch metod: pośredniej wykorzystującej fiolet krystaliczny do wybarwienia struktur biofilmu, oraz bezpośredniej polegającej na obserwacji wybarwionych fluorescencyjnie struktur w mikroskopie konfokalnym (Kirmusaoğlu 2019). Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

Barwienie za pomocą fioletu krystalicznego (Doll et al. 2016)

Do dołek z odpłukanym biofilmem dodano 200 μl roztworu 1% fioletu krystalicznego (Stamar, Polska), i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Nadmiar barwnika usunięto a dołki przepłukano trzykrotnie solą fizjologiczną w celu usunięcia niezwiązanych resztek. Następnie do każdego dołka dodano 200 μl mieszaniny

płuczającej (1% SDS (AlChem, Polska) i 50 $\mu\text{mol/l}$ HCl (Chempur, Polska) w propan-2-olu (POCH, Polska), dokładnie zmieszano za pomocą pipety i zmierzono absorbancję uwolnionego fioletu krystalicznego przy użyciu spektrofotometru przy długości fali 595 nm (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, USA).

Mikroskopia konfokalna (Kirmusaoğlu 2019)

Do dołek z odpłukanym biofilmem dodawano 50 μl roztworu barwiącego LIVE/DEAD zawierającego: jodek propidyny (długość fali wzbudzenia $\lambda_{\text{wz.}} = 543 \text{ nm}$, długość fali emisji $\lambda_{\text{em.}} = 615$) i SYTO 9 (długość fali wzbudzenia $\lambda_{\text{wz.}} = 488 \text{ nm}$, długość fali emisji $\lambda_{\text{em.}} = 498 \text{ nm}$) w stężeniu 1 $\mu\text{l/ml}$ zgodnie z instrukcją producenta (BacLight Bacterial Viability Kit (ThermoFisher Scientific, USA)). W kolejnych częściach rozprawy doktorskiej dla barwienia metodą z zastosowaniem BacLight Bacterial Viability Kit zastosowano nazwę LIVE/DEAD. Płytki pozostawiono w ciemności na 20 minut, a następnie obserwowano fluorescencję komórek w biofilmie za pomocą mikroskopu konfokalnego Olympus IX83 Fluoview FV 1200 z zastosowaniem powiększenia 20x oraz dodatkowego 2x powiększenia cyfrowego. Zdjęcia wykonano co 2,5 μm , dostosowując ich ilość do grubości obserwowanych biofilmów (od 15 do 60 zdjęć), następnie zdjęcia składano wykorzystując funkcję *z-stack*. Porównanie intensywności otrzymanych obrazów wykonano za pomocą programu ImageJ 1.54d (Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI, University of Wisconsin)).

III.2.1.3 Pomiar ilości uwolnionego eDNA (Das et al. 2014)

Doświadczenie przygotowano w dołkach płytki 24-dołkowej w objętości 1 ml zgodnie z opisanym wcześniej protokołem (**Rycina 10.**, **Rycina 12.**) w podłożu płynnym MHB z dodatkiem jonów lantanowców (Ce^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+}) w stężeniu odpowiadającym 0,5MIC (250 $\mu\text{g/ml}$) i inkubowano 24 h, 37 $^{\circ}\text{C}$, z wytrząsaniem 120 obr./min. Po zakończeniu inkubacji zawartość dołek dokładnie zmieszano za pomocą pipety i przeniesiono do probówek typu Eppendorf. Hodowle zwirowano w 4 $^{\circ}\text{C}$ przez 5 minut (4500 x g, Sigma 3-16KL) a supernatant przeniesiono do nowych probówek. Pomiar ilości uwolnionego eDNA wykonano z zastosowaniem komercyjnego zestawu Qubit™ dsDNA Broad-Range (BR) Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) zgodnie z procedurą producenta. Barwnik fluorescencyjny (*DMSO dye stock*) rozcieńczono 200-krotnie w dołączonym do zestawu buforze (*buffer*) i dokonano kalibracji urządzenia pomiarowego (fluorymetr Qubit 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) za pomocą

dwóch standardów (*standards*). W tym celu do 190 μ l rozcieńzonego w buforze barwnika dodano po 10 μ l standardów, zmieszano dokładnie (VORTEX MX-S) w specjalnych probówkach (Qubit™ Assay Tubes, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Po kalibracji przygotowano próby badane: 190 μ l rozcieńzonego barwnika fluorescencyjnego mieszano z 10 μ l supernatantu pochodzącego i mierzono wykorzystując program do pomiaru stężenia dwuniciowego DNA (dsDN). Uzyskane wyniki zostały przeliczone tak aby uzyskać stężenia DNA w supernatancie wyjściowym (bez uwzględnienia rozcieńczenia go w buforze), do czego wykorzystano jedną z funkcji urządzenia. Wykonano również zmodyfikowaną wersję doświadczenia. Do supernatantu uzyskanego z próby kontrolnej (inkubowanej bez obecności jonów lantanowców) dodano roztwory Ln³⁺ w stężeniu końcowym odpowiadającym 0,5MIC i mierzono ilość eDNA tak jak opisano powyżej. Od wszystkich pomiarów odjęto wartość uzyskaną dla próby ślepej (czystego podłoża MHB). Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach. Uzyskane wyniki przeliczono na % w odniesieniu do próby kontrolnej według wzoru:

$$\text{Relatywne stężenie eDNA} = \frac{\text{Stężenie eDNA w próbce badanej}}{\text{Stężenie eDNA w próbce kontrolnej}} \times 100\%.$$

III.2.1.4 Pomiar poziomu produkcji piocjaniny, piowerdyny i elastazy w hodowlach w obecności badanych jonów

Hodowle bakteryjne do oznaczania poziomu produkcji piocjaniny, piowerdyny i elastazy przygotowywano zgodnie z opisanym wcześniej protokołem (**Rycina 10.**) z dodatkiem jonów lantanowców (Ce³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺, Er³⁺, Yb³⁺) w stężeniu odpowiadającym 0,5MIC (250 μ g/ml) i 0,25MIC (125 μ g/ml). Po zakończeniu inkubacji zawartość dołków dokładnie zmieszano za pomocą pipety i przenoszono do probówek typu Eppendorf. Hodowle wirowano przez 10 minut (10 000 obr./min, Sigma 3-16KL), a uzyskany supernatant przenoszono do nowych probówek. Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach. Pomiar poziomu produkcji piocjaniny, piowerdyny i elastazy w uzyskanym supernatancie przeprowadzano w sposób opisany poniżej.

Oznaczenie poziomu produkcji piocjaniny (Das and Manefield 2012)

Supernatant po hodowli przeniesiono do płytki 96-dołkowej i mierzono absorbancję przy długości fali 691 nm (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, USA).

Oznaczenie poziomu produkcji piowerdyny (Hoegy F. et al. 2014)

Supernatant po hodowli przeniesiono do czarnej płytki 96-dołkowej i mierzono fluorescencję (emisja 460 nm, wzbudzenie 398 nm) (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, USA). W celu oceny, czy zmiana fluorescencji piowerdyny wynikała ze zmian w produkcji czynnika wirulencji, czy też była konsekwencją tworzenia chelatów pomiędzy piowerdyną i jonami lantanowców, hodowle *P. aeruginosa* (bez suplementacji jonami lantanowców) inkubowano i odwirowywano jak opisano powyżej. Supernatant zbierano, przenoszono (180 μl) na czarną płytkę 96-dołkową i uzupełniano 20 μl azotanów lantanowców (Ce³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺, Er³⁺ i Yb³⁺) w stężeniach końcowych wynoszących: 500, 250, 125, 62,5 i 31,25 μg/ml. W próbie kontrolnej azotany lantanowców zastąpiono wodą destylowaną. Przygotowano również dodatkową kontrolę (200 μl supernatantu, bez dodatku wody), ale poziom fluorescencji był na tyle zbliżony do kontroli, że na wykresie zdecydowano się pokazać tylko kontrolę z dodatkiem wody.. Poziom fluorescencji mierzono w sposób opisany powyżej.

Oznaczenie poziomu produkcji elastazy (Rust et al. 1994)

100 μl supernatantu po hodowli przenoszono do probówki zawierającej 5 mg odczynnika Elastin-Congo red (Sigma-Aldrich, USA) oraz 900 μl buforu (100 mM Tris (IBI Scientific, USA), 1 mM CaCl₂ (Warchem, Polska); pH=7,5). Próby inkubowano przez 3h w 37°C z wytrząsaniem (120 obr/min), a następnie wstawiono do lodu na 15 min w celu zatrzymania reakcji. Następnie próby odwirowywano przez 10 min (10 000 obr/min, Sigma 3-16KL), a supernatant przenoszono do 96-dołkowej płytki i mierzono absorbancję przy długości fali 495 nm (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, USA).

Uzyskane wyniki poziomu produkcji oznaczonych czynników wirulencji porównywano bezpośrednio względem wzrostu w samym podłożu (kontrola) oraz pośrednio odnoszono do wartości CFU/ml traktując wyniki dla kontroli jako 1. Względny współczynnik wirulencji (ang. *relative vilurence factor*, RVF) obliczano stosując następujące równanie (Dorotkiewicz-Jach et al. 2021):

$$RVF = \frac{\frac{\text{Absorbancja próby}}{\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \text{ próby}}}{\frac{\text{Absorbancja kontroli}}{\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \text{ kontroli}}}$$

III.2.1.5 Badanie wpływu jonów lantanowców na ruch typu *swimming*, *swarming* i *twitching*

Przygotowano hodowle *P. aeruginosa* w podłożu MHB z dodatkiem wybranych jonów lantanowców (Ce^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+}) w stężeniu odpowiadającym 0,5MIC (250 $\mu\text{g/ml}$), tak jak opisano wcześniej (**Rycina 10.**, **Rycina 12.**). Hodowle inkubowano przez 24 h w temperaturze 37 °C z wytrząsaniem (120 obr./min). Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.. Doświadczenie przeprowadzono w trzech wariantach:

- posiewano bakterie inkubowane w obecności jonów lantanowców na płytki agarowe,
- posiewano bakterie inkubowane w podłożu (hodowla kontrolna bez dodatku jonów) na płytki z dodatkiem jonów lantanowców oraz
- posiewano bakterie inkubowane w obecności jonów lantanowców na płytki z dodatkiem jonów lantanowców.

Kolejne etapy różnią się w zależności od badanego mechanizmu (*swimming*/*swarming*/*twitching*) i zostały opisane w sekcjach poniżej.

Swimming motility (Ha et al. 2014b)

Przygotowano podłoże Mueller-Hinton Bulion (MHB) z dodatkiem 0,3 % agaru. Podłoża wylano na płytki Petriego w objętości 20 ml na płytkę, a po zestaleniu za pomocą sterylnej końcówki do pipety automatycznej wykonano płytkie nakłucie w powierzchni agaru (3 punkty na każdej z dwóch płytek). Płytki inkubowano (bez odwracania) w temperaturze 37 °C przez 18 h. Po inkubacji wykonano zdjęcia oraz zmierzono średnicę obserwowanych w głębi podłoża stref wzrostu.

Swarming motility (Ha et al. 2014a)

Przygotowano podłoża MHB z dodatkiem 0,5 % agaru. Podłoża wylano na płytki Petriego w objętości 20 ml na płytkę, a po zestaleniu wysiewano po 2,5 μl zawiesiny bakteryjnej (3 punkty na każdej z dwóch płytek). Płytki inkubowano (bez odwracania) w temperaturze 37 °C przez 18 h. Po inkubacji wykonano zdjęcia oraz zmierzono średnicę powstałych hodowli.

Twitching motility (Turnbull and Whitchurch 2014)

Przygotowano podłoża MHB z dodatkiem 1 % agaru. Podłoża wylano na płytki Petriego w objętości 10 ml na płytkę, a po zestaleniu wykonano głębokie nakłucie agaru (do dna płytki) (3 punkty na każdej z dwóch płytek). Płytki inkubowano (bez odwracania) w

temperaturze 37 °C przez 18 h. Po inkubacji podłoże agarowe usunięto, a dna płytek barwiono roztworem 0,1% fioletu krystalicznego przez 10 minut, aby lepiej obserwować strefy *twitching motility*. Barwnik dokładnie opłukano i zmierzono średnicę obserwowanych stref wzrostu.

III.2.2 Wpływ badanych jonów na właściwości powierzchniowe komórki

III.2.2.1 Pomiar hydrofobowości powierzchni komórek bakteryjnych inkubowanych w obecności jonów lantanowców (Rosenberg 1984; Kurincic et al. 2016; Dlamini et al. 2019)

Bakterie hodowano (24 h, 37 °C, z wytrząsaniem 120 obr./min) w podłożu płynnym MHB z dodatkiem jonów lantanowców (Ce^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+}) w stężeniu odpowiadającym 0,5MIC (250 μ g/ml) zgodnie z wcześniejszymi opisami (Rycina 10., Rycina 12.). Po inkubacji hodowle zwirowano w 4 °C przez 5 minut (4500 x g, Sigma 3-16KL), osad zawieszono w buforze PBS (*phosphate buffered saline*; Fisher Scientific, Belgia) uzyskując gęstość optyczną równą 1,0 w skali MacFarlanda.

W celu wykonania testu BATH (ang. *bacterial adhesion to hydrocarbon*) 750 μ l zawiesiny bakteryjnej zmieszano z 250 μ l rozpuszczalnika (ksylen/ octan etylu/ chloroform) i intensywnie mieszano przez 60 sekund (VORTEX MX-S). Do wykonania testu wykorzystano następujące odczynniki: chloroform (Chempur, Polska), ksylen (Chempur, Polska) i octan etylu (Sigma-Aldrich, USA). Próby odstawiono na 5 minut w celu rozdzielenia się faz i zmierzono gęstość optyczną fazy wodnej przy długości fali 600 nm (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, USA). Jako odniesienie wykorzystano OD₆₀₀ wyjściowej zawiesiny bakteryjnej. Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach. Hydrofobowość przedstawiono jako wartość procentową, stosując poniższy wzór:

$$\text{Hydrofobowość [\%]} = \left(1 - \frac{OD_1}{OD_0}\right) \times 100,$$

gdzie:

OD1 – gęstość optyczna fazy wodnej

OD0 – gęstość optyczna zawiesiny bakteryjnej.

III.2.2.2 Pomiar kąta zwilżania i wyznaczenie wartości energii swobodnej powierzchni komórek bakteryjnych (Busscher et al. 1984; Azelmad et al. 2018)

Bakterie hodowano (24 h, 37 °C, z wytrząsaniem 120 obr./min) w podłożu płynnym MHB z dodatkiem jonów lantanowców (Ce^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+}) w stężeniu odpowiadającym 0,5MIC (250 $\mu\text{g/ml}$) zgodnie z wcześniejszymi opisami (**Rycina 10.**, **Rycina 12.**). Po inkubacji hodowle zwirowano (15 min, 8400 x g, Sigma 3-16KL), przemyto dwukrotnie roztworem KNO_3 (0,1 M, Warchem, Polska) i osad zawieszono w tym samym roztworze. Filtry membranowe z octanu celulozy (AC) o średnicy porów 0,45 μm (Whatman, Wielka Brytania) umieszczono w strzykawkowym adapterze do sączenia (Bionovo, Polska), zwilżono wodą destylowaną (3 ml), a następnie przepuszczano po 3 ml zawiesiny bakteryjnej. Wilgotne filtry przenoszono na szkiełko mikroskopowe, suszono 2 minuty w temperaturze pokojowej, a następnie mierzono kąt zwilżania z wykorzystaniem goniometru (KRÜSS DSA25 Standard, kamera KRÜSS CF03). Wykonano 3 pomiary dla każdego rozpuszczalnika – wody oraz diiodometanu (Sigma-Aldrich, USA) metodą kropli osadzonej ($V_{\text{kropki}} = 2 \mu\text{l} = 2 \text{mm}^3$), a pomiaru kąta dokonano wykorzystując dopasowanie wysokość-szerokość. Energia swobodna powierzchni (ang. *surface free energy*, SFE) została wyznaczona wykorzystując model OWRK (Owens, Wendt, Rabel and Kaelble model) (Rudawska and Jacniacka 2009). Uzyskane wyniki analizowano wykorzystując oprogramowanie AD4021 ADVANCE. Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

III.2.2.3 Badanie wpływu jonów lantanowców na przepuszczalność osłon komórkowych *P. aeruginosa*

Bakterie hodowano (24 h, 37 °C, z wytrząsaniem 120 obr./min) w podłożu płynnym MHB z dodatkiem jonów lantanowców (Ce^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+}) w stężeniu odpowiadającym 0,5MIC (250 $\mu\text{g/ml}$) zgodnie z wcześniejszymi opisami (**Rycina 10.**, **Rycina 12.**). Następnie po 50 μl hodowli przeniesiono do 1 ml świeżego podłoża MHB i inkubowano przez 4 h w warunkach jak wyżej, do uzyskania gęstości hodowli OD_{600} równej 0,5. Hodowle bakteryjne (4-godzinna i 24-godzinna) zwirowano (10 minut, temperatura pokojowa, 10000 x g, Sigma 3-16KL), przepłukano solą fizjologiczną i ponownie zwirowano przy tych samych parametrach. Dalsze pomiary przeprowadzono wykorzystując metodę opisaną poniżej. Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

Pomiar przepuszczalności błony z wykorzystaniem fioletu krystalicznego (Halder et al. 2015)

Roztwór fioletu krystalicznego (0,0005%) w PBS dodano do odwirowanego osadu bakteryjnego. Całość dokładnie zmieszano i pozostawiono na 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próby zwirowano (1 minuta, 10000 x g, Sigma 3-16KL) i mierzono absorbancję supernatantu przy długości fali 590 nm (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, USA). Jako odniesienie wykorzystano czysty roztwór fioletu krystalicznego. Ilość pobranego do komórek fioletu krystalicznego została obliczona według poniższego wzoru:

Ilość pobranego do komórki fioletu krystalicznego [%] =

$$1 - \frac{\text{Absorbancja próbki}}{\text{Absorbancja fioletu krystalicznego}} \times 100$$

III.2.2.4 Wyznaczenie wartości ładunku powierzchniowego komórki (potencjał zeta) i wielkości promienia hydrodynamicznego (Halder et al. 2015; Sobierajska et al. 2021b)

Bakterie hodowano (24 h, 37 °C, z wytrząsaniem 120 obr./min) w podłożu płynnym MHB z dodatkiem jonów lantanowców (Ce³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺, Er³⁺, Yb³⁺) w stężeniu odpowiadającym 0,5MIC (250 µg/ml) zgodnie z wcześniejszymi opisami (**Rycina 10.**, **Rycina 12.**). Po inkubacji hodowle zwirowano (10 minut, temperatura pokojowa, 10000 x g, Sigma 3-16KL), przepłukano solą fizjologiczną i ponownie zwirowano przy tych samych parametrach. Supernatant usunięto za pomocą pipety, a osad zawieszano w wodzie destylowanej bezpośrednio przed pomiarem do uzyskania gęstości optycznej OD₆₀₀= 0,2 (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, USA). Wartość potencjału zeta została wyznaczona z wykorzystaniem urządzenia Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) wyposażonego w laser He-Ne 633 nm oraz oprogramowanie do analizy danych (Dispersion Technology Software) w specjalnych kuwetach, w objętości 1 ml. Wszystkie pomiary zostały wykonane w 6 powtórzeniach.

Dodatkowo, po dwukrotnym rozcieńczeniu zawiesin bakteryjnych, wykonano pomiar wielkości promienia hydrodynamicznego w oparciu o metodę DLS (ang. *Dynamic Light Scattering*) korzystając z urządzenia i oprogramowania opisanego w akapicie powyżej. Dla każdej próby wykonano przynajmniej 3 pomiary i uśredniono uzyskane wyniki uzyskując

wartości procentowe odpowiadające udziałowi poszczególnych wielkości obiektów w zawiesinie. Na tej podstawie wyliczono wielkość typową (dominantę). Dodatkowo wyznaczono również wartości współczynnika polidispersji (*polydispersity index*, PDI) dla każdej z prób. Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

III.2.3 Badanie wpływu jonów lantanowców na hemolizę i morfologię erytrocytów baranich

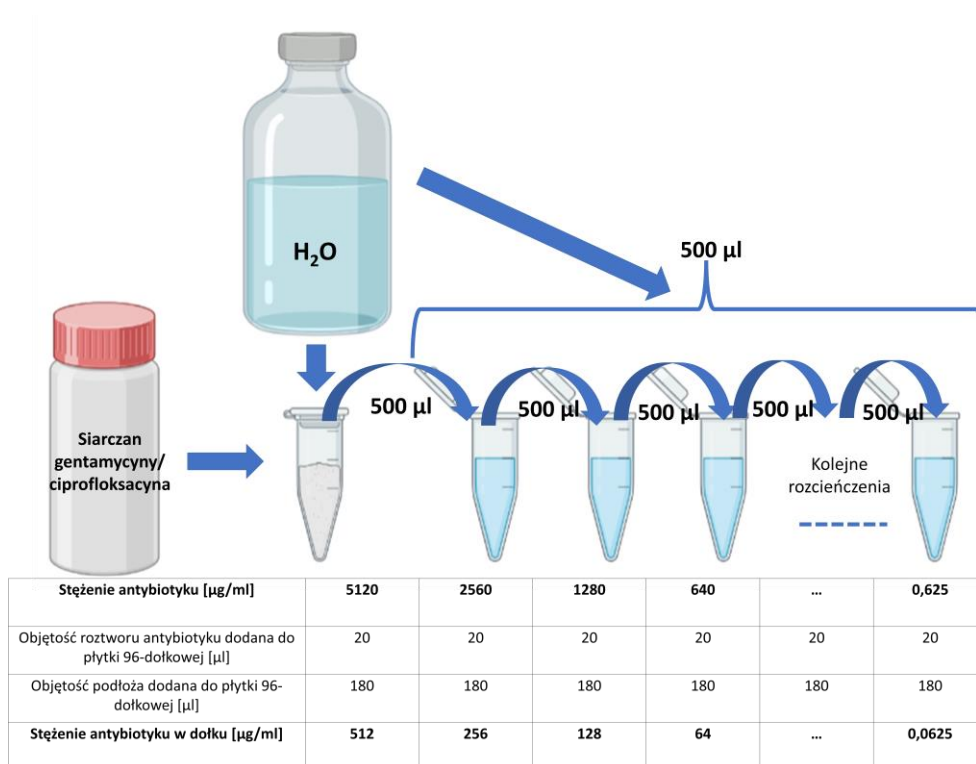
Erytrocyty przygotowano w sposób opisany wcześniej w sekcji **III.1. Biologiczne modele badawcze**. W probówkach typu Eppendorf mieszano 900 μl frakcji erytrocytów zawieszonych w soli fizjologicznej i uzupełniono 100 μl roztworu Ln^{3+} , aby uzyskać końcowe stężenie lantanowców 250 i 125 $\mu\text{g/ml}$. Próbę kontrolną uzupełniono 100 μl wody destylowanej, aby zapewnić jednakowe warunki osmotyczne. Próby inkubowano przez 2h w 37°C , odwirowywano przez 5 min (10 000 obr./min, Sigma 3-16KL) i mierzono absorbancję supernatantu przy długości fali 540 nm (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, USA). Ponadto przygotowywano rozmaz na szkiełku podstawowym, a morfologię erytrocytów obserwowano w mikroskopie (Olympus IX83 Fluoview FV 1200, kamera CCD Hamamatsu C13440, powiększenie 20x). Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

III.2.4 Wpływ jonów lantanowców na wrażliwość *P. aeruginosa* na substancje antybakteryjne

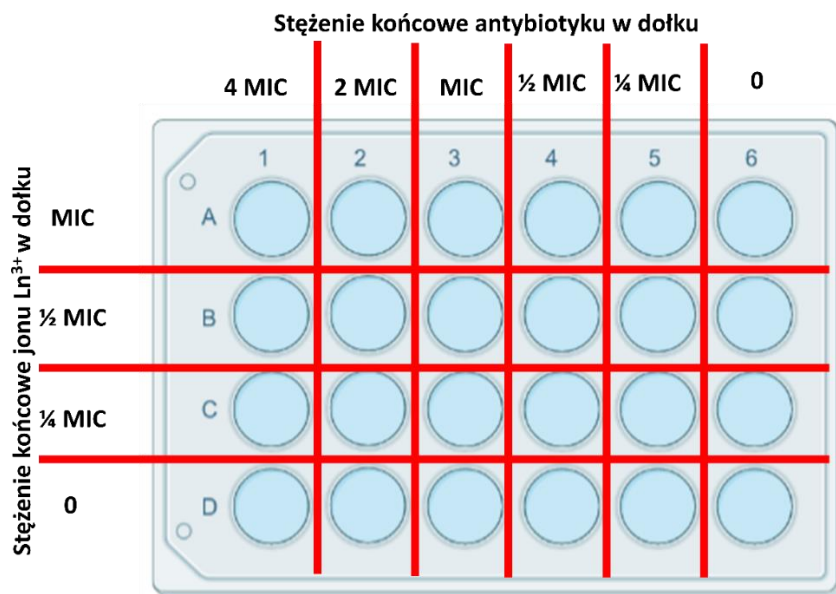
III.2.4.1 Wyznaczenie minimalnych stężeń hamujących (MIC) i frakcyjnych stężeń hamujących (FIC) gentamycyny i ciprofloksacyny w obecności jonów lantanowców

Minimalne stężenia hamujące (MIC) gentamycyny (MP BIOMEDICALS, USA) i ciprofloksacyny (MP BIOMEDICALS, USA) oceniano przy użyciu standardowej metody mikrorozcieńczeń w bulionie (https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/). Frakcyjne stężenia hamujące (FIC) oceniano według metody *checker-board*, jak opisano w literaturze (Bonapace et al. 2002; Jain et al. 2011). Wartości MIC dla antybiotyków oraz wartości FIC dla mieszanin antybiotyków/ Ln^{3+} wyznaczono wobec szczepów *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853, a dla wybranych jonów lantanowców (Ce^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Er^{3+} i Yb^{3+}) działanie sprawdzono dodatkowo na szerszym panelu izolatów klinicznych (*P. aeruginosa* PA 15/3, PA 82/3, PA14 i PA 164). W ramach badań wstępnych wyznaczono wartości MIC gentamycyny i ciprofloksacyny względem badanych szczepów, dobierając ich stężenia testowe na podstawie ich wrażliwości opisanej w literaturze (**Tabela S.1.**) (Sobierajska et

al. 2018). Siarczan gentamycyny i ciprofloksacynę odważono (siarczan gentamycyny: 8,5 mg, ciprofloksacyna 5,1 mg) i rozpuszczono w 1 ml wody destylowanej uzyskując stężenia wyjściowe = 5120 µg/ml w przeliczeniu na czystą gentamycynę i ciprofloksacynę, a następnie wykonano szereg dwukrotnych rozcieńczeń za pomocą wody destylowanej zgodnie ze schematem **Rycina 14**. Doświadczenie wykonano w płytkach 96-dołkowych, dzieląc płytkę na 4 sektory i uzupełniając dołki jak pokazano na schemacie (**Rycina 15**). Do dołków płytki 96-dołkowej dodano po 20 µl każdego roztworu (roztwór Ln^{3+} lub roztwór antybiotyku). Końcowe stężenie jonów lantanowców ustalono na 250 i 125 µg/ml, podczas gdy w przypadku antybiotyków stężenia odpowiadały 4MIC, 2MIC, MIC, 0,5MIC i 0,25MIC. Zakres stężeń antybiotyków rozszerzano, jeśli nie było możliwe określenie stężeń hamujących w początkowym zakresie. Do każdego dołka dodawano 160 µl MHB. W rzędach kontrolnych (tylko jedna substancja) objętość uzupełniono 20 µl wody destylowanej, a w kontroli wzrostu dodano 40 µl wody, aby zapewnić równy stosunek podłoża do wody w każdym dołku. Następnie do dołków dodano po 10 µl zawiesiny bakterii w płynie fizjologicznym (0,5 w skali MacFarlanda, rozcieńczone 10x) i inkubowano przez 24 h w 37°C z wytrząsaniem (120 obr./min). Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.



Rycina 14. Schemat dwukrotnych rozcieńczeń testowanych antybiotyków: gentamycyny i ciprofloksacyny (Schemat opracowano z wykorzystaniem Biorender.com)



W dołkach mieszano: po 20 μ l substancji badanych (Ln^{3+} , antybiotyk, H_2O (do uzupełnienia objętości) + 160 μ l podłoża MHB

Rycina 15. Schemat wykonania testu *checkerboard assay* dla antybiotyków (gentamycyny i ciprofloksacyny) oraz jonów lantanowców. (Schemat opracowano z wykorzystaniem Biorender.com)

Po inkubacji mierzono gęstość optyczną przy 600 nm (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, USA), a od pomiarów odejmowano wartości ślepej próby. Wartości MIC dla każdego roztworu osobno, jak również mieszaniny Ln^{3+} /antybiotyk, określono jako najniższe stężenie, w którym nie wykryto widocznego wzrostu. Frakcyjne stężenia hamujące (FIC) obliczono następująco (Jain et al. 2011):

$$\mathbf{FIC = FICA + FICB}$$

gdzie:

$$FICA = \frac{\text{MIC roztworu A w połączeniu}}{\text{MIC roztworu A}}$$

$$FICB = \frac{\text{MIC roztworu B w połączeniu}}{\text{MIC roztworu B}}$$

III.2.4.2 Wyznaczenie wartości MIC i FIC dla jonów europu i miedzi oraz ich połączeń oraz badanie zmian dynamiki wzrostu hodowli bakteryjnych

Wartości MIC i FIC wobec *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 wyznaczono również dla jonów Eu^{3+} i Cu^{2+} . Zastosowano podłoże minimalne MOPS o pH 6,5, wykorzystując płytki 96-dołkowe (objętość 200 μl), które uzupełniano analogicznie jak w przypadku badania antybiotyków opisanego w poprzednim podrozdziale. Czas inkubacji wydłużono do 48-godzin ze względu na spowolniony wzrost bakterii w podłożu minimalnym o obniżonym pH. Mieszano ze sobą następujące stężenia jonów:

- Eu^{3+} : 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 0 $\mu\text{g/ml}$
- Cu^{2+} : 50; 25; 12,5; 6,25; 0 $\mu\text{g/ml}$.

Sposób odczytu wyników i obliczenie FIC opisano w poprzednim podrozdziale. Ponadto dla stężeń subinhibicyjnych, tj. 125; 62,5 i 31,25 $\mu\text{g/ml}$ Eu^{3+} i 25; 12,5 i 6,25 $\mu\text{g/ml}$ Cu^{2+} zbadano tempo wzrostu bakterii w obecności jonów i mierzono gęstość optyczną hodowli bakteryjnych przez 48 godzin co 30 minut (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, USA) przy długości fali $\lambda=600$ nm. Wyniki zostały przedstawione w postaci krzywych wzrostu oraz w postaci posortowanych histogramów (wykresów Pareto) przedstawiających skumulowane wartości OD_{600} .

Wzrost hodowli bakteryjnych w obecności wybranych stężeń jonów (125 $\mu\text{g/ml}$ Eu^{3+} i 25 $\mu\text{g/ml}$ Cu^{2+} , osobno i w połączeniu) oceniono również w dołkach płytki 24-dołkowej w objętości 1ml dodając odpowiednio:

- 100 μl Eu^{3+} o stężeniu 1250 $\mu\text{g/ml}$, 100 μl wody destylowanej i 800 μl podłoża MOPS,
- 100 μl Cu^{2+} o stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$, 100 μl wody destylowanej i 800 μl podłoża MOPS,
- 100 μl Eu^{3+} o stężeniu 1250 $\mu\text{g/ml}$, 100 μl Cu^{2+} o stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$, i 800 μl podłoża MOPS,
- 200 μl wody destylowanej i 800 μl podłoża MOPS (kontrola wzrostu).

Do płytek dodawano zawiesinę bakteryjną przygotowaną tak jak opisano wcześniej (**Rycina 10.**) i inkubowano płytki w 37 °C z wytrząsaniem (120 obr/min) przez 48 h. Po zakończeniu inkubacji wykonano zdjęcia hodowli oraz, po ostrożnym odciągnięciu podłoża pipetą, obserwowano pozostałą zawartość dołków z wykorzystaniem mikroskopu jasnego

poła (Olympus IX83 Fluoview FV 1200 , kamera CCD Hamamatsu C13440, powiększenie 20x) oraz mikroskopu konfokalnego (Olympus IX83 Fluoview FV 1200 z zastosowaniem powiększenia 20x oraz dodatkowego 2x powiększenia cyfrowego) z barwieniem z zestawem LIVE/DEAD (LIVE Bacterial Viability Kit (ThermoFisher Scientific, USA), oraz z dodatkiem barwnika fluorescencyjnego Sypro Ruby (wzbudzenie = 450 nm, emisja = 610 nm; ThermoFisher Scientific, USA), który stosowany jest do wizualizacji macierzy biofilmu. Poszczególne barwienia przeprowadzono w osobnych dołkach. Zestaw LIVE/DEAD rozcieńczono tak jak opisano w podrozdziale **III.2.1.2. (Pomiar ilości wytworzonego biofilmu)**, dodano po 250 μ l roztworu barwiącego do dołków. Barwnik Sypro Ruby dodano bez rozcieńczania, zgodnie z instrukcją producenta Płytki pozostawiono na 20 minut w ciemności i po tym czasie wykonano zdjęcia mikroskopowe. Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

III.3 Badanie aktywności biologicznej różnych związków o strukturze hydroksyapatytu domieszkowanych jonami metali przejściowych bloku d oraz jonami Eu^{3+}

Określono aktywność antybakteryjną różnych form nanomateriałów apatytowych, które przedstawiono w **Tabeli 5**. Sposób otrzymania, charakterystyka fizykochemiczna oraz pełne wyniki badań biologicznych (aktywność antybakteryjna oraz cytotoksyczność zbadana na liniach komórkowych) zostały opublikowane w publikacjach współautorskich mgr Justyny Rewak-Soroczyńskiej (przedstawione w kolumnie * w **Tabeli 5**). Ponadto, materiały oznaczone jako seria $\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}:\text{HAp}_{\text{Si}}$ zostały samodzielnie zsyntetyzowane przez Doktorantkę z wykorzystaniem metody hydrotermalnej. Materiały z serii $\text{Ag}:\text{HAp}$ oraz $\text{PTFE}@\text{Ag}:\text{HAp}$ (PTFE – poli-(tetrafluoroetylen) otrzymała dr inż. Sara Targońska z Oddziału Fizykochemii Biomedycznej, INTiBS PAN, natomiast materiały z serii $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$ otrzymała dr Paulina Sobierajska z tej samej jednostki naukowej.

Tabela 5. Zestawienie nanomateriałów apatytowych domieszkowanych jonami metali przejściowych z uwzględnieniem ich formy oraz badań wykonanych, * - referencja

Seria	Material	Forma	Badania wykonane	*
Ag ⁺ :HAp	1.HAp 2.HAp: 1mol% Ag ⁺ 3.HAp: 2,5mol% Ag ⁺ 4.HAp: 5mol% Ag ⁺	Koloidy Tabletki	Liczebność w soli fizjologicznej w obecności koloidów Wzrost w obecności tabletek w podłożu LB	(Targonska et al. 2020)
PTFE@ Ag ⁺ :HAp	5.PTFE 6.PTFE@Ag ⁺ :5HAp 7.PTFE@Ag ⁺ :10HAp	Tabletki	Wzrost w obecności tabletek w podłożu LB	
Zn ²⁺ /Sr ²⁺ : HAp_Si	8.0,0 mol% Zn ²⁺ /Sr ²⁺ :Si ₄ -HAp 9.0,5 mol% Zn ²⁺ /Sr ²⁺ :Si ₄ -HAp 10.1,0 mol% Zn ²⁺ /Sr ²⁺ :Si ₄ -HAp 11.3,5 mol% Zn ²⁺ /Sr ²⁺ :Si ₄ -HAp 12.3,5mol% Zn ²⁺ /Sr ²⁺ :Si ₅ -HAp	Koloidy Tabletki	Liczebność w soli fizjologicznej w obecności koloidów Formowanie biofilmu na powierzchni tabletek	(Rewak-soroczynska et al. 2022)
Zn ²⁺ /Cu ²⁺ : HAp	13.nHAp 14.nHAp:5mol% Zn ²⁺ 15.nHAp:5mol% Cu ²⁺ 16.nHAp:5mol% Zn ²⁺ , 5mol% Cu ²⁺	Koloidy Hydrożele Eluaty z hydrożeli Tabletki	Liczebność w soli fizjologicznej w obecności koloidów Liczebność w soli fizjologicznej w obecności eluatów z hydrożeli Wzrost w obecności hydrożeli Wzrost w obecności tabletek Formowanie biofilmu na powierzchni hydrożeli Formowanie biofilmu na powierzchni tabletek	(Sobierajska et al. 2021a)

Ponadto w badaniach wykorzystano grupę 18 hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami europu (Eu³⁺) i miedzi (Cu²⁺) otrzymanych metodami: współstrąceniową (seria strąceniowa, P (ang. *precipitation*) oraz hydrotermalną (seria hydrotermalna, H (ang. *hydrothermal*). Wzory chemiczne oraz oznakowania poszczególnych związków zamieszczone są w **Tabeli 6**. Nanohydroksyapatyty otrzymała dr Katarzyna Szyszka Oddział Fizykochemii Biomedycznej, INTiBS, PAN) metodami współstrąceniową i hydrotermalną zgodnie z metodyką opracowaną przez Profesora Rafała Wiglusza. Stężenia domieszek Eu³⁺ i Cu²⁺ zostały ustalone na 2 oraz 5 mol% (w przeliczeniu na ilość jonów wapnia) Ponadto jako kontrolę odniesienia przygotowano próby czystego hydroksyapatytu.

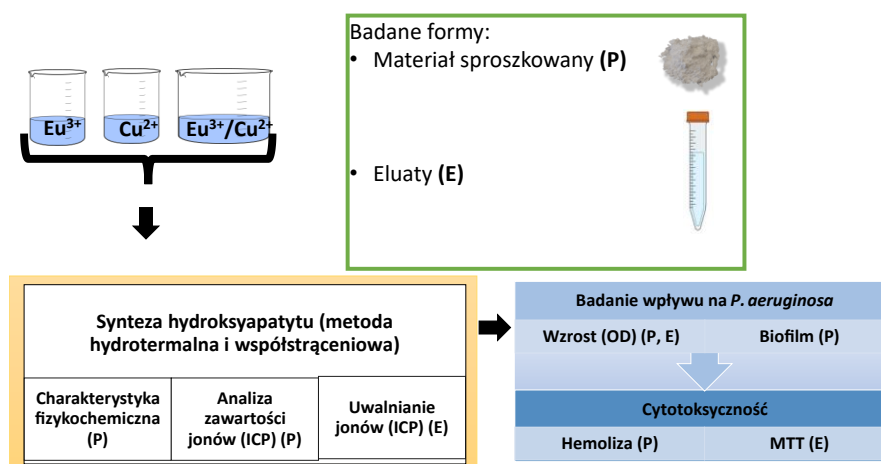
Tabela 6. Wzory chemiczne oraz oznakowanie hydroksyapatytów domieszkowanych Eu^{2+} oraz Cu^{2+}

Wzór chemiczny	Oznakowanie materiału	Wzór chemiczny	Oznakowanie materiału
Seria strąceniowa (P – precipitation)		Seria hydrotermalna (H – hydrothermal)	
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	P_HAp	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	H_HAp
$\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	P_2mol% Eu^{3+}	$\text{Ca}_{9,8}\text{Eu}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	H_2mol% Eu^{3+}
$\text{Ca}_{9,5}\text{Eu}_{0,5}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	P_5mol% Eu^{3+}	$\text{Ca}_{9,5}\text{Eu}_{0,5}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	H_5mol% Eu^{3+}
$\text{Ca}_{9,8}\text{Cu}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	P_2mol% Cu^{2+}	$\text{Ca}_{9,8}\text{Cu}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	H_2mol% Cu^{2+}
$\text{Ca}_{9,5}\text{Cu}_{0,5}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	P_5mol% Cu^{2+}	$\text{Ca}_{9,5}\text{Cu}_{0,5}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	H_5mol% Cu^{2+}
$\text{Ca}_{9,6}\text{Eu}_{0,2}\text{Cu}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	P_2mol% Eu^{3+} , 2mol% Cu^{2+}	$\text{Ca}_{9,6}\text{Eu}_{0,2}\text{Cu}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	H_2mol% Eu^{3+} , 2mol% Cu^{2+}
$\text{Ca}_{9,3}\text{Eu}_{0,2}\text{Cu}_{0,5}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	P_2mol% Eu^{3+} , 5mol% Cu^{2+}	$\text{Ca}_{9,3}\text{Eu}_{0,2}\text{Cu}_{0,5}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	H_2mol% Eu^{3+} , 5mol% Cu^{2+}
$\text{Ca}_{9,3}\text{Eu}_{0,5}\text{Cu}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	P_5mol% Eu^{3+} , 2mol% Cu^{2+}	$\text{Ca}_{9,3}\text{Eu}_{0,5}\text{Cu}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	H_5mol% Eu^{3+} , 2mol% Cu^{2+}
$\text{Ca}_9\text{Eu}_{0,5}\text{Cu}_{0,5}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	P_5mol% Eu^{3+} , 5mol% Cu^{2+}	$\text{Ca}_9\text{Eu}_{0,5}\text{Cu}_{0,5}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	H_5mol% Eu^{3+} , 5mol% Cu^{2+}

Do syntez wykorzystano następujące odczynniki: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (cz.d.a. 99+%, ACROS ORGANICS®, USA), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (cz.d.a. 99+%, ACROS ORGANICS®, USA), Eu_2O_3 (99.99%, Alfa Aesar, Niemcy), $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (98.0–102.0%, Alfa Aesar, Niemcy) i $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99%, Avantor, Polska). Z tlenku europu otrzymano hydrat, tak jak opisano w podrozdziale **III.2. (Jony lantanowców oraz jony metali przejściowych)**, oraz dodano $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. W wersji hydrotermalnej doprowadzono pH mieszaniny do wartości 9-10 za pomocą $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i umieszczono w naczyniu teflonowym w reaktorze mikrofalowym (ERTEC MV 02-02, Polska). Mieszaninę ogrzewano przez 90 min w temperaturze 250 °C pod ciśnieniem 50 atm. W wersji współstrąceniowej doprowadzono pH mieszaniny do wartości 7 za pomocą $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i ogrzewano całość przez 3 h w temperaturze 100 °C, cały czas mieszając. Próby otrzymane z wykorzystaniem obu metod wirowano, płukano za pomocą wody destylowanej do uzyskania pH 7 oraz suszono w 70 °C. Po wysuszeniu próby zostały roztarte w moździerzu.

Otrzymane materiały zostały scharakteryzowane fizykochemicznie przez dr Katarzynę Szyszkę z wykorzystaniem następujących metod analitycznych: metoda dyfrakcji rentgenowskiej (ang. *X-ray powder diffraction*, XRPD), skaningowy mikroskop

elektronowy (ang. *scanning electron microscope*, SEM) z analizą zawartości poszczególnych jonów (ang. *energy-dispersive X-ray spectrometer*, EDAX), spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. *Fourier-transformed infrared-spectra*, FT-IR) oraz spektroskopia emisyjna (ang. *emission spectra*). Wybrane wyniki analiz fizykochemicznych zostały umieszczone w Materiałach dodatkowych (**Rycina S.1.**, **Rycina S.2.**) oraz częściowo opublikowane w publikacji współautorskiej Zespołu Profesora Rafała Wiglusza (Szyszka et al. 2021). Schemat badań hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami europu i miedzi przedstawia **Rycina 16.**



Rycina 16. Schemat badań hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami europu (Eu^{3+}) i miedzi (Cu^{2+}). (Schemat opracowano z wykorzystaniem Biorender.com). W żółtym prostokącie przedstawiono etapy wykonane przez dr Katarzynę Szyszkę.

III.3.1 Analiza zawartości jonów w hydroksyapatytach domieszkowanych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} oraz analiza uwalniania jonów w różnych mediach

W celu określenia rzeczywistej ilości wbudowanych do matrycy hydroksyapatytowej jonów Eu^{3+} oraz Cu^{2+} , otrzymane próby poddano analizie z wykorzystaniem metody indukcyjnie wzbudzonej plazmy (ang. *Inductively coupled plasma*; ICP) z wykorzystaniem spektrometru (Agilent 720 bench-top optical emission spectrometer with inductively coupled Ar plasma; Ar-ICP-OES). Próby zostały roztworzone w kwasie azotowym (V) (65% suprapur Merck, Niemcy), natomiast analiza została przeprowadzona na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

Uwalnianie jonów Eu^{3+} oraz Cu^{2+} w wybranych mediach hodowlanych zostało zbadane z wykorzystaniem metody ICP, jak opisano powyżej. Przygotowanie prób do

analizy obejmowało następujące etapy: badane materiały w postaci ssproszkowanej zawieszono w badanym medium (podłoże mikrobiologiczne MHB lub medium do hodowli komórek eukariotycznych DMEM) w stężeniu 10 mg/ml i wytrząsano w temperaturze 37 °C przez 24 h. Następnie próby zwirowano, a powstały supernatant roztworzono w kwasie azotowym (V), jak opisano powyżej.

III.3.2 Badanie aktywności antibakteryjnej hydroksyapatytów

III.3.2.1 Liczebność bakterii w obecności hydroksyapatytów

Hydroksyapatyty domieszkowane jonami metali przejściowych przedstawione w **Tabeli 5.** zawieszano w fizjologicznej do uzyskania stężenia:

- 25 µg/ml dla serii Ag⁺:Hap,
- 100, 50, 25 i 10 µg/ml dla serii Zn²⁺/Sr²⁺:Hap_Si,
- 100, 50, 25 i 10 µg/ml dla serii Zn²⁺/Cu²⁺:HAp.

Roztwory koloidalne otrzymano poprzez zawieszenie naważki nanomateriału w soli fizjologicznej i poddanie próby działaniu ultradźwięków (BANDELIN SONOPULS HD 2070) przez 2 minuty (30% mocy). Po utworzeniu koloidów próby sterylizowano w autoklawie i przechowywano w lodówce. 200 µl koloidów dodawano do dołków płytki 96-dółkowej i dodawano 10 µl zawiesiny bakteryjnej przygotowanej w sposób opisany we wcześniejszych rozdziałach (**Rycina 10.**). Jako kontrolę wykorzystano roztwór soli fizjologicznej. Płytki inkubowano w 37 °C z wytrząsaniem (120 obr/min) przez:

- 2 h dla serii Ag⁺:Hap,
- 18 h dla serii Zn²⁺/Sr²⁺:Hap_Si,
- 18 h dla serii Zn²⁺/Cu²⁺:HAp.

Liczebność bakterii sprawdzono również w obecności eluatów przygotowanych z hydrożeli (seria Zn²⁺/Cu²⁺:HAp). Hydrożele zostały wykonane przez dr Paulinę Sobierajską na bazie 3,6-anhydro- α -1-galakto- β -d-galaktuanu i poddane liofilizacji w celu uzyskania porowatego żelu. Szczegółowy sposób przygotowania hydrożeli i ich ocenę fizykochemiczną opublikowano w pracy współautorskiej (Sobierajska et al. 2021a). Hydrożele pocięte za pomocą sterylnej skalpela na jednakowe 10 mg kawałki sterylizowano pod lampą UV (jak wyżej), umieszczono w sterylnych falkonach i dodano 10 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej. Falkony wytrząsano (120 obr/min) przez 24 h w

37 °C, a następnie płyn przenoszono do nowych falkonów i dodawano po 200 µl do dołków płytki 96-dołkowej. Płytki inkubowano 18 h w 37 °C z wytrząsaniem (120 obr/min).

Po zakończeniu inkubacji zawartość dołków została przeniesiona do probówek typu Eppendorf, dokładnie zmieszana (VORTEX MX-S) i rozcieńczona w szeregu 10-krotnych rozcieńczeń w soli fizjologicznej. Rozcieńczone zawiesiny bakteryjne wysiewano na płytki MHA, inkubowano 18 h w 37 °C i liczono wyrosłe kolonie. Wartość CFU/ml obliczono wg wzoru zamieszczonego w sekcji **III.2.1.1. (Badanie aktywności antybakteryjnej (wyznaczenie MIC i sub-MIC)).**

Liczebność *P. aeruginosa* ATCC 27853 w obecności koloidów i eluatów hydrożeli (seria $Zn^{2+}/Cu^{2+}:HAp$) obrazowano również przy użyciu technik mikroskopowych: skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), mikroskopii konfokalnej z barwieniem LIVE/DEAD oraz mikroskopii jasnego pola. Do obrazowania przygotowano zawiesinę bakteryjną o $OD_{600} = 1,5$, którą przeniesiono (po 900 µl) do dołków płytki 24-dołkowej. Hydroksyapatyt ($nHAp:Cu^{2+}-Zn^{2+}$) zawieszono za pomocą ultradźwięków w soli fizjologicznej w stężeniu 1 mg/ml i sterylizowano w autoklawie. Hydrożel otrzymany z tego samego materiału apatytowego zawieszano w soli fizjologicznej w stężeniu 10 mg/ml i otrzymano eluat tak jak opisano wcześniej. Koloidy oraz eluaty z hydrożeli dodawano do zawiesin bakteryjnych (po 100 µl). Płytki inkubowano 24 h w 37 °C z wytrząsaniem (120 obr/min). Po zakończeniu inkubacji zawiesiny bakteryjne przeniesiono do probówek typu Eppendorf. W celu zobrazowania prób w jasnym polu kroplę zawiesiny bakteryjnej nanoszono na szkiełko mikroskopowe i obrazowano w mikroskopie (Olympus IX83 Fluoview FV 1200 , kamera CCD Hamamatsu C13440, powiększenie 20x). Wykonano również zdjęcia z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego. W tym przypadku rozcieńczony (w sposób opisany wcześniej) roztwór barwników LIVE/DEAD dodano w ilości 10 µl do kropli naniesionej na szkiełko mikroskopowe i po 20 minutach inkubacji w ciemności obserwowano fluorescencję w mikroskopie (Olympus IX83 Fluoview FV 1200 z zastosowaniem powiększenia 20x oraz dodatkowego 2x powiększenia cyfrowego). Przygotowanie prób do SEM zostało przeprowadzone w Pracowni Technik Mikroskopowych Uniwersytetu Wrocławskiego przez dr Ryszarda Adamskiego. Próby zostały utrwalone 2,5% aldehydu glutarowego i OsO_4 , odwodnione w etanolu i acetonie, napyłone złotem (Auto 306 Coater with Turbomolecular Pumping System, Edwards Vacuum) i obrazowane w mikroskopie skaningowym (FEI NovaNanoSEM 230) wyposażonym w detektor (Apollo X Silicon Drift Detector SDD) przez dr Damiana

Szymańskiego (INTiBS, PAN). Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

III.3.2.2 Wzrost bakterii w obecności różnych form hydroksyapatytów

Wpływ nanomateriałów na wzrost bakterii oceniono wykorzystując różne formy nanomateriałów. Tabletki wykonano przez sprasowanie odważonej porcji materiału sproszkowanego za pomocą prasy hydraulicznej. W badaniach wykorzystano również kompozyty polimeru PTFE (tetrafluoroetylen) i hydroksyapatytu domieszkowanego jonami srebra. Wszystkie tabletki wykonał dr Jacek Chmielowiec (Oddział Fizykochemii Biomedycznej, INTiBS, PAN), co zostało szczegółowo opisane we współautorskich publikacjach (Targonska et al. 2020; Sobierajska et al. 2021a; Rewak-soroczynska et al. 2022) Gotowe tabletki sterylizowano z obu stron przez naświetlenie za pomocą lampy UV przez 20 minut, następnie umieszczano za pomocą sterylnej pęsety w dołkach płytki 24-dołkowej i dodawano 1 ml płynnego podłoża: LB (serie $\text{Ag}^+:\text{HAp}, \text{PTFE}@\text{Ag}^+:\text{HAp}, \text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$) i bulion odżywczy (seria $\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}:\text{HAp}_{\text{Si}}$), w którym zawieszono bakterie *P. aeruginosa* ATCC 27853 ($\text{OD}_{600} = 0,1$, rozcieńczone 10x za pomocą podłoża). Płytki inkubowano 24h w 37 °C z wytrząsaniem (120 obr/min). Po zakończeniu inkubacji hodowle bakteryjne zebrano z dołków, zmieszano, przeniesiono do dołków płytki 96-dołkowej (po 200 μl) i zmierzono gęstość optyczną przy długości fali 600 nm (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, USA). Powierzchnię tabletek przemyto solą fizjologiczną, przeniesiono do czystej płytki 24-dołkowej za pomocą pęsety i obrazowano utworzony biofilm w mikroskopie konfokalnym. Analogicznie badano próby hydrożeli (seria $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$).

Aby ocenić wzrost *P. aeruginosa* w obecności HAp domieszkowanych i współdomieszkowanych kationami Eu^{3+} i Cu^{2+} do dołków płytki 24-dołkowej odważono po 10 mg każdego z badanych nanomateriałów i dodano po 1 ml podłoża oraz 50 μl rozcieńczonej w soli fizjologicznej zawiesiny bakteryjnej. Płytkę hodowano przez 24 h w 37 °C z wytrząsaniem, po czym zmierzono absorbancję hodowli bakteryjnych (OD_{600}). W tym celu zawartość dołków dokładnie zmieszano za pomocą pipety, a następnie odczekano 15 minut, żeby hydroksyapatyt opadł na dno dołka. Pobierano po 200 μl hodowli znad osadu do dołków płytki 96-dołkowej i mierzono absorbancję. Po pomiarze hodowle ponownie umieszczono w dołkach i pozostawiono w cieplarni na następne 24 godziny. Po tym czasie powtórzono pomiar dokładnie w ten sam sposób. W tym doświadczeniu wprowadzono dodatkową modyfikację i zastosowano 24-godzinne uwalnianie wstępne hydroksyapatytów

w podłożu mikrobiologicznym. W tym celu płytki z naważką apatytów i dodanym podłożem bez dodawania zawiesiny bakteryjnej, wytrząsano przez 24 h w 37 °C (120 obr/min). Po tym czasie dodano do dołków zawiesinę bakteryjną i płytki poddano powtórnej inkubacji w tych samych warunkach. Odczyt wykonano tak jak opisano wcześniej. Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

III.3.2.3 Badanie wpływu różnych form hydroksyapatytów na formowanie biofilmu

Tabletki wykonane z materiałów hydroksyapatytowych (seria $Zn^{2+}/Sr^{2+}:HAp_Si$ i $Zn^{2+}/Cu^{2+}:HAp$) inkubowano w obecności zawiesin bakteryjnych, tak jak opisano w podrozdziale **III.3.2.2. Wzrost bakterii w obecności różnych form hydroksyapatytów**. Po zakończeniu inkubacji powierzchnię tabletek przepłukano solą fizjologiczną i przeniesiono je do czystych dołków płytki 24-dołkowej, do których dodano 250 μ l rozcieńczonych barwników fluorescencyjnych z zestawu LIVE/DEAD (jak opisano wcześniej). Płytki inkubowano 20 minut w ciemności, a następnie obrazowano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego (Olympus IX83 Fluoview FV 1200 z zastosowaniem powiększenia 20x oraz dodatkowego 2x powiększenia cyfrowego). Analogicznie postępowano z hydrożelami (seria $Zn^{2+}/Cu^{2+}:HAp$).

Do określenia wpływu hydroksyapatytu wapnia domieszkowanego i współdomieszkowanego jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} na powstawanie biofilmów bakteryjnych wybrano nanomateriały z najwyższą zawartością domieszek, z obu serii (**Tabela 6.**) oraz czysty hydroksyapatyt jako odniesienie. Bakterie inkubowano w obecności sproszkowanych nanomateriałów, tak jak to opisano w podrozdziale **III.3.2.2. Wzrost bakterii w obecności różnych form hydroksyapatytów**, a następnie hodowle przenoszono do czystych dołków płytki 96-dołkowej pozostawiając je w cieplarni na 24 h w celu utworzenia biofilmu. Po 24 h inkubacji w obecności apatytów hodowla bakteryjna została dokładnie zmieszana za pomocą pipety, przeniesiona do dołków płytki 96-dołkowej (po 200 μ l) i ponownie inkubowana przez 24 h w 37 °C. Po tym czasie zawiesina bakteryjna została usunięta z dołków, które przepłukano w celu usunięcia niezwiązanych komórek solą fizjologiczną i dodano po 50 μ l zestawu barwników fluorescencyjnych LIVE/DEAD, które rozcieńczono tak jak wcześniej opisywano. Morfologię i żywotność uformowanych biofilmów obserwowano w mikroskopie konfokalnym (Olympus IX83 Fluoview FV 1200 z zastosowaniem powiększenia 20x oraz dodatkowego 2x powiększenia cyfrowego). Intensywność fluorescencji oszacowano ilościowo przy wykorzystaniu programu ImageJ

1.54d (Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI, University of Wisconsin). Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

III.3.2.4 Określenie poziomu cytotoksyczności nanomateriałów

Cytotoksyczność nanomateriałów została określona na modelu komórkowym osteoblastów (linia komórkowa 7F2). Przygotowano zawiesinę materiałów na bazie hydroksyapatytu wapnia domieszkowanego i współdomieszkowanego jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} w medium hodowlanym DMEM w stężeniu 10 mg/ml. Po 24 h wytrząsania w 37 °C próby zwirowano, a supernatant przeniesiono do nowych probówek. Otrzymany eluat rozcieńczono 10x i 100x za pomocą DMEM. Hodowle komórkowe (gęstość wyjściowa około 10 000 komórek na 1 cm^2) inkubowano w standardowych warunkach (37 °C, 5% CO_2) w płytkach 96-dołkowych przez 24 h. Następnie medium usunięto, komórki przemyto sterylnym PBS i dodano eluaty hydroksyapatytów w stężeniach 10, 1 i 0,1 mg/ml. Hodowle inkubowano kolejne 24 godziny. Po tym czasie eluaty usunięto, komórki przemyto, dodano sterylny PBS zawierający 0,5 mg/ml odczynnika do testu MTT (ang. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (Sigma-Aldrich, USA) i komórki inkubowano przez 3 godziny w temperaturze 37°C. Po inkubacji utworzone kryształy formazanu rozpuszczono w DMSO. Absorbancję odczytywano przy 560 nm (tło 670 nm) przy użyciu czytnika płytek (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, USA). Jako kontrolę odniesienia wykorzystano hodowlę, do której zamiast eluatów dodano czyste medium hodowlane. Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach. Żywotność użytych linii komórkowych oszacowano za pomocą następującego wzoru:

$$\text{Żywotność komórek [\%]} = \frac{\text{Absorbancja próby}}{\text{Absorbancja kontroli}} \times 100.$$

III.3.2.5 Ocena wpływu związków hydroksyapatytu wapnia na hemolizę i morfologię erytrocytów

W celu określenia wpływu hydroksyapatytów na hemolizę oraz morfologię erytrocytów, krwinki przygotowano tak jak opisano w podrozdziale **III.2.3. Badanie wpływu jonów lantanowców na hemolizę i morfologię erytrocytów baranich**. Do probówek typu Eppendorf odważono po 10 mg badanego materiału i dodano po 1 ml wcześniej przygotowanej frakcji erytrocytów. Przygotowano również próbę kontrolną, którą stanowiły same krwinki. Probówki mieszano przez inwersję kilka razy na dobę. Pomiary absorbancji oraz rozmazy krwinek wykonano po 1, 4 i 7 dniach. Absorbancję mierzono przy

dwóch długościach fali: 540 nm, co odpowiada maksimum absorpcji dla hemoglobiny, oraz 502 nm, co odpowiada maksimum absorpcji dla methemoglobiny. Ocenę morfologii krwinek wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego w trybie jasnego pola, tak jak to opisano w podrozdziale **III.2.3. Badanie wpływu jonów lantanowców na hemolizę i morfologię erytrocytów baranich** Wszystkie pomiary wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

III.4 Analiza statystyczna otrzymanych wyników

Przeprowadzone eksperymenty były wykonywane minimum w 3 powtórzeniach w 3 niezależnych czasach. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie GraphPad Prism 9. Pierwszym etapem było sprawdzenie normalności rozkładu z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilka. Wyniki spełniające założeń rozkładu normalnego analizowano z pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (One-way ANOVA) z dodatkowym testem metodą Dunnetta dla wielokrotnych porównań. Wyniki niespełniające założeń rozkładu normalnego za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa z dodatkowym testem metodą Dunna dla wielokrotnych porównań. Istotność statystyczną oznaczano za pomocą gwiazdek (*dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$). Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie zostały obliczone jako średnie arytmetyczne z przeprowadzonych pomiarów wraz z obliczonymi odchyleniami standardowymi (SD). Na niektórych wykresach, ze względu na ograniczone miejsce, przy wysokim poziomie istotności, stosowano zbiorcze oznaczenie dla sąsiadujących słupków: $\overline{\text{****}}$. Oznacza, to że wszystkie słupki pod kreską są jednakowo istotnie różne od kontroli. Natomiast istotność statystyczną pomiędzy dwoma wynikami oznaczano jako klamrę: $\overbrace{\quad\quad\quad}^{\text{****}}$.

IV. WYNIKI

Rozwój nauki i poszukiwanie nowych rozwiązań jest nierozłącznym elementem ewolucji człowieka. Wyzwania jakie podejmujemy są odpowiedzią na nękające ludzkość problemy. Jednym z nich jest nieprzerwana walka z patogennymi drobnoustrojami w tym z *P. aeruginosa*, jako przyczyną infekcji okołoperacyjnych szczególnie okołowszczepiennych. W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono badania mające na celu zobrazowanie wpływu jonów lantanowców oraz metali przejściowych w formie wolnej jak i jako domieszek w nanohydroksyapatytach na wzrost i wirulencję tego patogenu. Wyniki badań zaprezentowane w tym rozdziale zostały podzielone na dwa duże etapy wynikające z poszukiwania mechanizmów oddziaływań poszczególnych elementów nanomateriałów z komórkami bakteryjnymi. W pierwszym etapie pod uwagę wzięto jony lantanowców oraz metali przejściowych w formie wolnej i ich oddziaływanie w różnych stężeniach oraz układach na komórki bakteryjne oraz ich wirulencję. W drugiej części badań skupiono się na oznaczeniu właściwości biologicznych nanohydroksyapatytów w różnych formach zawierających zróżnicowane domieszki badanych pierwiastków.

IV.1 Badanie aktywności biologicznej wolnych jonów lantanowców i jonów metali przejściowych

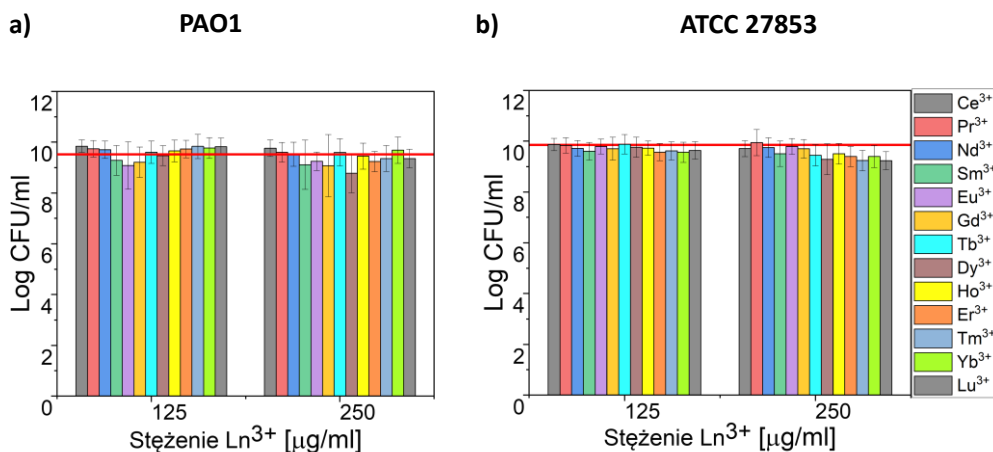
IV.1.1 Wpływ obecności wolnych jonów lantanowców w stężeniach subinhibicyjnych na wzrost i wirulencję *P. aeruginosa*

Ze względu na fakt częstego wykorzystywania lantanowców jako domieszek w nanomateriałach z potencjałem zastosowania w implantologii w pierwszej kolejności postanowiono sprawdzić jak obecność jonów Ln^{3+} w podłożu hodowlanym wpływa na wzrost i poziom produkcji podstawowych czynników wirulencji *P. aeruginosa*. Większość badań prowadzono na powszechnie stosowanych i dobrze znanych szczepach wzorcowych PAO1 oraz ATCC27853, które często są wykorzystywane do badania oddziaływań związków antybakteryjnych u tego gatunku. W przypadku badania aktywności antybakteryjnej testowanych jonów panel szczepów był rozszerzany o szczepy kliniczne reprezentujące zróżnicowane wzorce oporności na antybiotyki i zwiększające heterogenność badanej grupy.

Pierwszym etapem badań było wyznaczenie wartości minimalnych stężeń hamujących (MIC) jonów Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , Lu^{3+} . Przetestowano stężenia w zakresie od 4 do 500 $\mu\text{g/ml}$ w seryjnych, dwukrotnych

rozcieńczeniach. Analiza uzyskanych wyników wykazała MIC na poziomie 500 $\mu\text{g/ml}$ każdego z badanych jonów Ln^{3+} wobec wszystkich szczepów *P. aeruginosa* zarówno referencyjnych (PAO1, ATCC 27853) jak i klinicznych (PA3, PA12, PA15, PA18, PA20, 14/3, 15/3, 82/3, 9/5, 164 i 249P). Pomiary OD_{600} wykazały, że w badanym zakresie stężeń nie zaobserwowano znaczącej różnicy w gęstości optycznej hodowli *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 w odniesieniu do kontroli wzrostu bez obecności jonów. Co ciekawe w przypadku szczepu PAO1 obserwowano zwiększenie gęstości optycznej hodowli prowadzonej w obecności Ln^{3+} w stężeniach w zakresie pomiędzy 4 a 125 $\mu\text{g/ml}$ (**Rycina S.3.**).

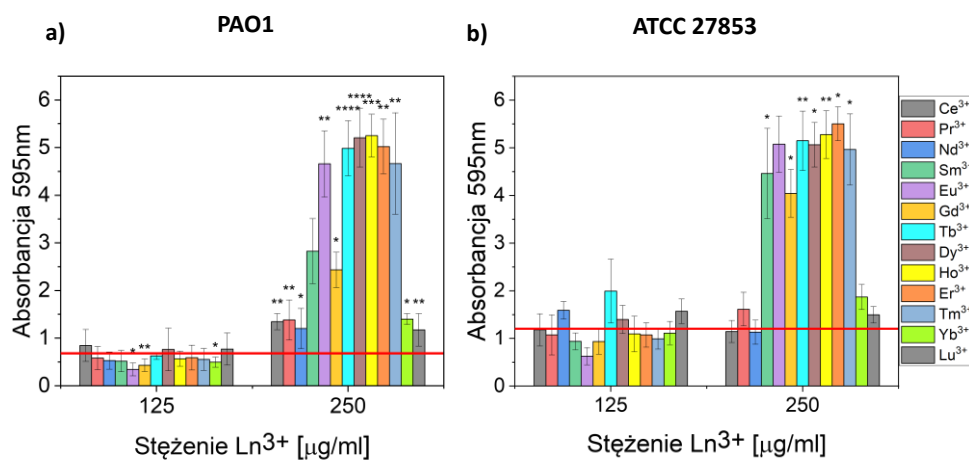
Biorąc pod uwagę fakt, że pomiar zmętnienia nie zawsze pozwala na dokładną ocenę liczebności żywych komórek bakteryjnych w hodowli, w kolejnym etapie badań wyznaczono wartości CFU/ml 24-godzinnych hodowli badanych szczepów PAO1 i ATCC 27853 w obecności stężeń 0,5MIC i 0,25MIC wszystkich testowanych jonów lantanowców. Uzyskane wartości prezentowane jako log CFU/ml zestawiono na **Rycinie 17.**



Rycina 17. Wzrost *P. aeruginosa* a) PAO1 i b) ATCC 27853 w obecności subinhibicyjnych stężeń Ln^{3+} (0,25MIC=125 $\mu\text{g/ml}$ i 0,5MIC=250 $\mu\text{g/ml}$). Czerwona linia wskazuje CFU/ml dla kontroli wzrostu bez obecności jonów Ln^{3+} .

Obecność jonów lantanowców w testowanych stężeniach 0,5MIC oraz 0,25MIC nie powodowała istotnych zmian we wzroście liczebności bakterii w stosunku do kontroli (linia czerwona). Ponadto nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy aktywnością poszczególnych jonów, jak również pomiędzy badanymi szczepami wzorcowymi.

W omawianym powyżej doświadczeniu przed wykonaniem szeregów rozcieńczeń, hodowle bakteryjne poddawano działaniu ultradźwięków, co pozwoliło na oderwanie komórek od dna dołków i uzyskanie jednorodnych prób. W trakcie doświadczenia zaobserwowano, że bakterie poddane działaniu 0,5MIC stężenia jonów lantanowców (250µg/ml) tworzyły grube i odporne na ultradźwięki struktury przypominające biofilm, które pozostawały przyklejone do dna dołków powodując ich wyraźnie widoczne zmętnienie, podczas gdy w próbie kontrolnej dno studzienki pozostawało wizualnie przezroczyste. Obserwacja ta była bodźcem do przeprowadzenia kolejnych eksperymentów, których celem było zbadanie wpływu jonów lantanowców na powstawanie biofilmu bakteryjnego. Zastosowano dwie standardowe metody: barwienie biofilmu fioletem krystalicznym (ang. *crystal violet*, CV) oraz laserową mikroskopię konfokalną (ang. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) z barwieniem żywych i martwych komórek z wykorzystaniem komercyjnego zestawu barwników fluorescencyjnych (LIVE/DEAD). Różnice w poziomie produkcji biofilmu po 24 h hodowli obserwowane po barwieniu CV przedstawiono na poniższym wykresie (**Rycina 18.**).



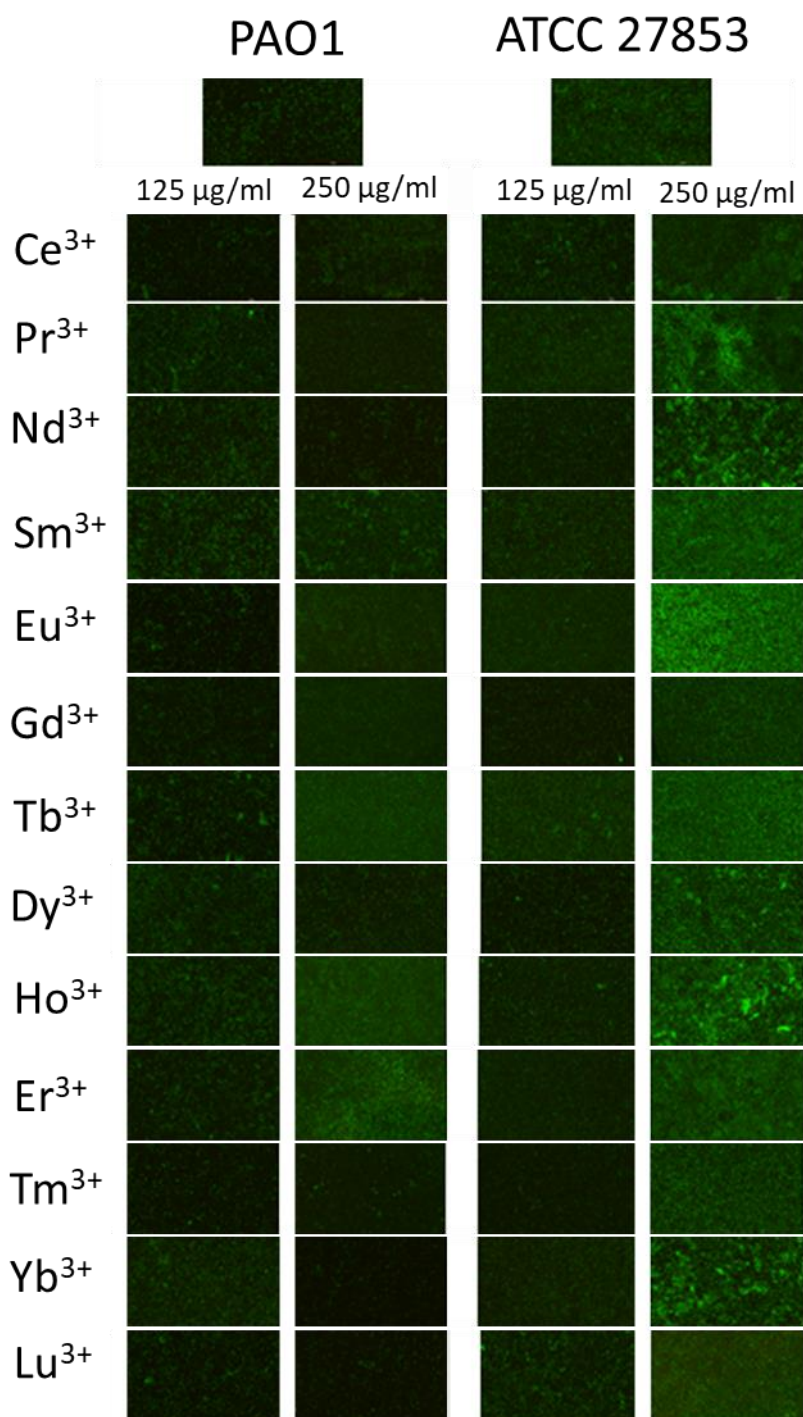
Rycina 18. Tworzenie biofilmu barwionego fioletem krystalicznym przez *P. aeruginosa* a) PAO1 i b) ATCC 27853 w obecności subinhibicyjnych stężeń Ln^{3+} . Czerwona linia wskazuje poziom absorbcji CV związanego przez biofilm powstały w próbie kontrolnej bez obecności jonów lantanowców.

Co ważne, w obecności jonów lantanowców w stężeniu 125 µg/ml (0,25MIC) poziom produkcji biofilmu był porównywalny z kontrolą (linia czerwona), jednak obecność badanych jonów w stężeniu 250 µg/ml (0,5MIC) znacząco zwiększała ilość związanego przez wytworzony biofilm fioletu krystalicznego, co było obserwowane w przypadku obu badanych szczepów. Dodatkowo, różnice we wpływie Ln^{3+} na poziom produkcji biofilmu dostrzeżono również pomiędzy poszczególnymi jonami lantanowców. Zauważyć można, że

obecność jonów ze środka szeregu (od Sm^{3+} do Tm^{3+}) znacząco wpływała na zwiększenie produkcji biofilmu wyrażonej zwiększoną ilością związanego fioletu krystalicznego podczas gdy obecność w hodowli jonów lżejszych (Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+}) i najcięższych (Yb^{3+} , Lu^{3+}) nie wywoływała takiego efektu. Ciekawym przypadkiem jest jon Gd^{3+} , dla którego zaobserwowano spadek aktywności "pro-biofilmowej" w porównaniu z sąsiadującymi lantanowcami z szeregu. Było to widoczne w przypadku obu badanych szczepów.

W celu potwierdzenia obserwowanej w barwieniu CV zwiększonej produkcji biofilmu w obecności poszczególnych jonów, zastosowano dodatkową metodę wizualizacji, czyli obrazowanie z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego. Obrazy mikroskopowe zaadherowanych do powierzchni komórek po barwieniu zestawem komercyjnym LIVE/DEAD przedstawiono na **Rycina 19.**, **Rycina 20.**

Pierwszą ważną obserwacją jakiej dokonano był fakt, że zdecydowana większość komórek była żywa (kolor zielony), natomiast komórki martwe (kolor czerwony) zdarzały się pojedynczo. Drugą obserwacją było to, że liczebność komórek w próbach kontrolnych i inkubowanych w obecności $125 \mu\text{g/ml}$ jonów lantanowców była zbliżona do kontroli, podczas gdy w próbach inkubowanych w obecności $250 \mu\text{g/ml}$ Ln^{3+} była wyraźnie wyższa. Można to zaobserwować porównując jasność i intensywność otrzymanych obrazów przy zachowanych tych samych parametrach laserów dla wszystkich prób (**Rycina 19.**), co zostało dodatkowo potwierdzone za pomocą programu ImageJ (**Tabela 7.**). Można również zaobserwować różnice w intensywności pomiędzy szczepami: zdjęcia wykonane dla szczepu ATCC 27853 charakteryzują się wyższą intensywnością, zarówno w kontroli jak i w próbach z Ln^{3+} , niż zdjęcia wykonane dla szczepu PAO1. Co ciekawe, widoczne było również, że w próbach inkubowanych w obecności jonów Gd^{3+} ($250 \mu\text{g/ml}$) zdjęcia są mniej intensywnie niż dla „sąsiadujących” lantanowców, co potwierdza obserwacje z doświadczenia z fioletem krystalicznym (**Rycina 18.**). W przypadku szczepu PAO1 najwyższą intensywność w odniesieniu do kontroli obserwuje się dla jonów Eu^{3+} i Gd^{3+} (25% wyższa intensywność), Tb^{3+} (50% wyższa intensywność) oraz Ho^{3+} i Er^{3+} (75% wyższa intensywność). W przypadku szczepu ATCC 27853 najwyższe wzrosty intensywności w odniesieniu do kontroli odnotowano dla prób z: Sm^{3+} , Dy^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} i Lu^{3+} (25%), Tb^{3+} i Ho^{3+} (50%) oraz Eu^{3+} (75%).

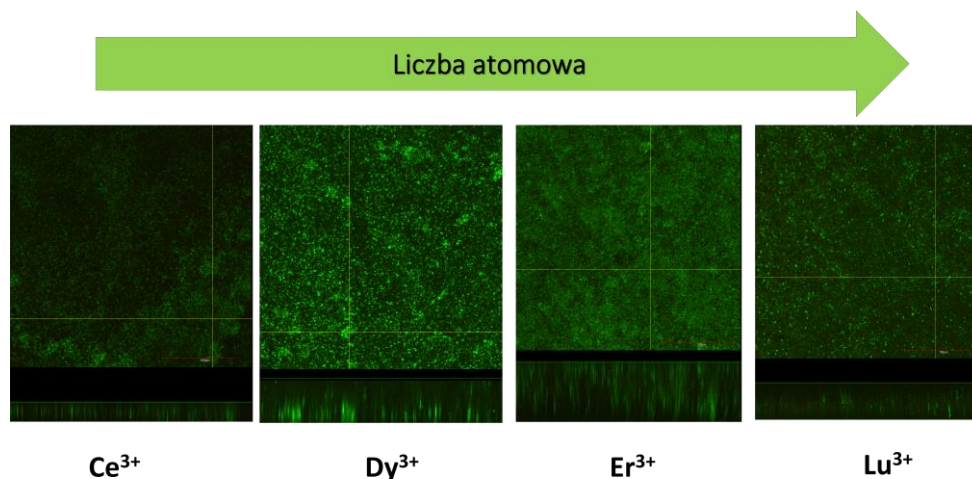


Rycina 19. Obrazy CLSM biofilmów *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 powstałych w obecności subinhibicyjnych (0,5 i 0,25MIC) stężeń Ln³⁺ w porównaniu z kontrolą (bez dodatku Ln³⁺)

Tabela 7. Porównanie intensywności obrazów mikroskopowych. W tabeli wyróżniono kolorami wartości intensywności odpowiadające wzrostowi w porównaniu z kontrolą o: 25%, 50%, 75%, 100%.

	<i>P. aeruginosa</i> PAO1		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
Kontrola	13,51±4,08		18,71±3,85	
Stężenie Ln ³⁺ [µg/ml]	125	250	125	250
Ce ³⁺	10,86 ±2,68	15,86±3,39	14,60±3,45	17,96±3,20
Pr ³⁺	14,40±3,96	15,49±1,98	17,76±2,93	22,48±6,89
Nd ³⁺	15,29±3,75	13,14±2,53	15,02±2,70	22,91±8,22
Sm ³⁺	16,06±4,30	16,23±3,69	17,73±3,14	27,36±4,92
Eu ³⁺	10,68±3,16	19,58±2,23	18,21±2,08	35,77±8,11
Gd ³⁺	12,21±3,64	17,11±2,48	14,06±2,27	20,46±3,49
Tb ³⁺	13,14±4,41	23,33±2,68	20,51±3,10	28,26±5,14
Dy ³⁺	15,23±3,43	15,49±3,03	13,31±2,74	24,24±6,26
Ho ³⁺	15,59±3,66	24,64±3,03	15,75±2,78	28,10±8,74
Er ³⁺	13,80±3,12	24,90±4,93	15,49±1,94	25,63±4,10
Tm ³⁺	11,50±3,16	13,46±2,11	11,93±3,39	21,64±4,33
Yb ³⁺	16,05±3,44	8,81±2,73	16,46±2,46	23,71±8,38
Lu ³⁺	11,67±3,43	9,86±2,92	15,58±3,64	27,35±3,95

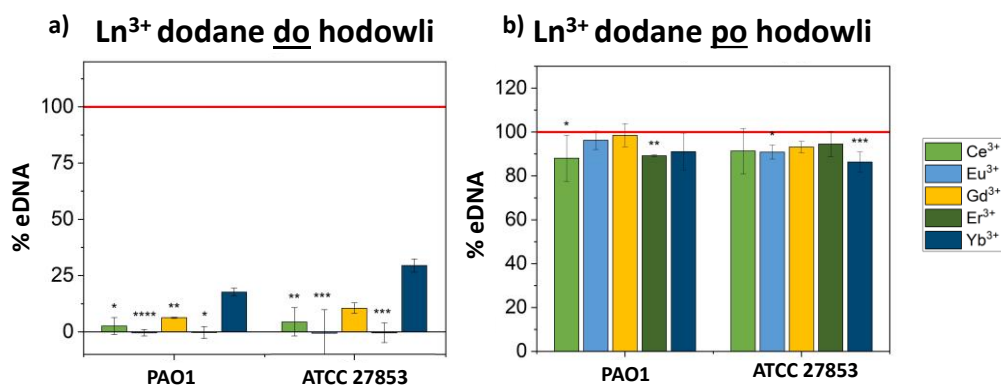
Ostatnia obserwacja w przypadku analizy obrazów uzyskanych w CLSM dotyczyła grubości warstwy zadherowanego biofilmu, która była porównywalna pomiędzy próbkami inkubowanymi w obecności 0,25MIC Ln³⁺ (125 µg/ml) a próbkami kontrolnymi (bez dodatku Ln³⁺). Do zeskanowania pełnej głębokości biofilmu należało w tym wypadku wykonać około 20 zdjęć co 2,5 µm co daje łączną grubość biofilmu na poziomie około 50 µm, podczas gdy próby inkubowane w obecności 250 µg/ml jonów lantanowców były znacznie grubsze. Do zeskanowania pełnej głębokości biofilmu w tym wypadku należało wykonać 40-60 obrazów co daje grubość biofilmu w zakresie 100-150 µm (**Rycina 20.**). Obserwowana grubość warstw biofilmów zmieniała się również wraz z liczbą atomową jonów lantanowców i była najwyższa w obecności jonów Er³⁺ co przedstawiono na **Rycinie 20.**



Rycina 20. Wpływ obecności jonów Ce^{3+} , Dy^{3+} , Er^{3+} i Lu^{3+} w stężeniu 0,5MIC (250 $\mu g/ml$) na grubość produkowanego biofilmu przez *P. aeruginosa* ATCC 27853

W związku z wykazanim istotnym wpływem jonów lantanowców na formowanie biofilmu przez badane szczepy *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853, postanowiono zbadać czy obecność jonów Ln^{3+} wpływa również na ilość eDNA uwalnianego z komórek podczas wzrostu. Do porównania wybrano pięć jonów: cer (Ce^{3+}), europ (Eu^{3+}), gadolin (Gd^{3+}), erb (Er^{3+}) i iterb (Yb^{3+}) jako przedstawicieli lekkich i ciężkich jonów lantanowców o różnych właściwościach fizykochemicznych, w stężeniu 0,5MIC, w obecności którego obserwowano wzmożoną produkcję biofilmu. Skupiono się na oznaczeniu poziomu uwolnionego eDNA, gdyż jest on kluczowym czynnikiem biorącym udział w procesie formowania biofilmów. W tym celu zmierzono stężenie eDNA uwolnionego z komórek *P. aeruginosa* do podłoża hodowlanego bezpośrednio po zakończeniu hodowli w obecności badanych jonów. Wykazano, że ilość eDNA w hodowlach prowadzonych w obecności jonów lantanowców jest znacznie niższa niż w kontroli (czerwona linia), co zaobserwowano dla obu badanych szczepów (**Rycina 21.**). Wykazano, że w supernatantach uzyskanych po hodowli obu badanych szczepów ilość eDNA spadła praktycznie całkowicie (wartości bliskie 0) w przypadku jonów Eu^{3+} i Er^{3+} , w przypadku Ce^{3+} i Gd^{3+} wynosiła od kilku do kilkunastu % w odniesieniu do kontroli, natomiast w przypadku Yb^{3+} wynosiła około 20-30%.

W celu sprawdzenia czy spadek ilości eDNA nie wynika wyłącznie z łączenia się ujemnie naładowanej cząsteczki DNA z jonami lantanowców, co mogłoby wpłynąć na uzyskane odczyty, wykonano dodatkowe doświadczenie. Do supernatantu zawierającego eDNA po hodowli kontrolnej dodano jony Ln^{3+} i zmierzono jego ilość. Zaobserwowano nieznaczny spadek stężenia eDNA w odniesieniu do kontroli, do której zamiast jonów lantanowców dodano adekwatną objętość wody destylowanej (**Rycina 21.**).

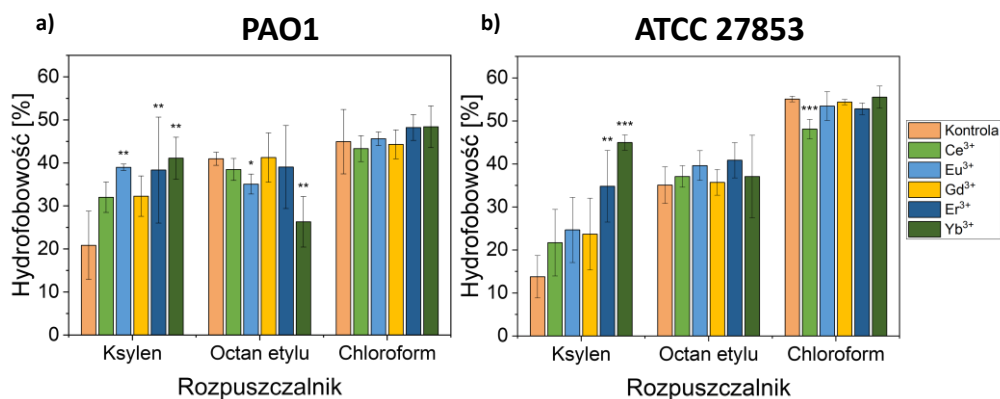


Rycina 21. eDNA w hodowlach *P. aeruginosa* inkubowanych w obecności jonów lantanowców oraz w supernatancie pohodowlanym, do którego dodano jony lantanowców. Wyniki zostały przedstawione w odniesieniu do kontroli jako wartość %. Dane z bezpośrednich pomiarów znajdują się w Materiałach dodatkowych (**Tabela S.3.**).

W omawianym doświadczeniu przedstawiono wyniki jako wartość % w stosunku do kontroli, która stanowiła 100%. Było to podyktowane specyfiką i czułością zastosowanej metody, której powtarzalność była uzależniona od dokładności pipetowania odczynników, czasu wykonania doświadczenia oraz różnic w składzie pożywki hodowlanej. Z tego względu pomiary zestawiano z pomiarami próby kontrolnej wykonanymi w tym samym czasie, z tej samej porcji odczynników. Uzyskane w trakcie badań dane z bezpośrednimi pomiarami zostały przedstawione w Materiałach dodatkowych (**Tabela S.3.**).

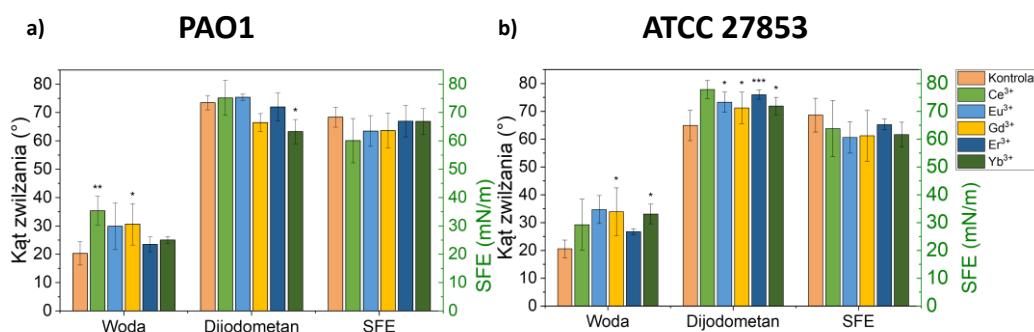
Zaobserwowane zmiany w uwalnianiu eDNA nie tłumaczyły efektu zwiększonej produkcji biofilmu, w związku z tym w kolejnym etapie badano właściwości powierzchniowe komórek bakteryjnych, które mogły wpłynąć na ich oddziaływanie z powierzchnią płytek titracyjnych w których hodowano biofilm w obecności subinhibicyjnych stężeń lantanowców. Aby wyjaśnić to zjawisko zbadano wpływ obecności wybranych jonów lantanowców (Ce³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺, Er³⁺, Yb³⁺) w stężeniu 0,5MIC na właściwości powierzchniowe komórek, w tym na hydrofobowość, która jest czynnikiem mogącym modyfikować oddziaływania fizykochemiczne z otoczeniem. Doświadczenie wykonano za pomocą pomiaru powinowactwa komórek do rozpuszczalników o różnym stopniu rozpuszczalności w wodzie. W przypadku ksylenu, który jest najbardziej hydrofobowym z badanych rozpuszczalników, zaobserwowano największy wzrost hydrofobowości w porównaniu do kontroli, co było obserwowane w próbach inkubowanych w obecności jonów lantanowców, szczególnie jonów Eu³⁺, Er³⁺ i Yb³⁺ w przypadku szczepu PAO1 oraz jonów Er³⁺ i Yb³⁺ w przypadku szczepu ATCC 27853 (**Rycina 22.**). W przypadku octanu etylu, który charakteryzuje się najwyższą rozpuszczalnością w wodzie

spośród badanych rozpuszczalników zaobserwowano z kolei spadek hydrofobowości w porównaniu z kontrolą dla jonów Eu^{3+} i Yb^{3+} dla szczepu PAO1, natomiast w przypadku chloroformu zaobserwowano jedynie nieznaczny spadek hydrofobowości w przypadku szczepu ATCC 27853 inkubowanego z dodatkiem Ce^{3+} .



Rycina 22. Wpływ obecności subinhibicyjnych stężeń wybranych lantanowców na hydrofobowość powierzchni komórek *P. aeruginosa* a) PAO1 i b) ATCC 27853 przedstawioną jako odsetek komórek o powinowactwie do rozpuszczalników: ksyleny, octanu etylu i chloroformu

Kolejnym parametrem świadczącym o poziomie hydrofobowości badanych komórek był kąt zwilżania, który oznaczono z zastosowaniem filtrów membranowych, na których osadzono hodowle *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 inkubowane w obecności 250 $\mu\text{g/ml}$ wybranych jonów lantanowców (Ce^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+}). Wyniki przedstawiono na **Rycinie 23**. Zaobserwowano, że kąt zwilżania w przypadku wody był większy dla hodowli inkubowanych w obecności jonów lantanowców niż w kontroli, natomiast dla dijdometanu zaobserwowano niewielki spadek kąta zwilżania w przypadku szczepu PAO1 inkubowanego w obecności jonów Yb^{3+} , natomiast w przypadku szczepu ATCC 27853 wykazano zwiększenie kąta zwilżania przy pomiarze z użyciem tego rozpuszczalnika (**Rycina 23**). Po uwzględnieniu w wyliczeniach obu parametrów jednocześnie i wyznaczeniu wartości energii swobodnej powierzchni (SFE) nie zauważono jednak istotnych statystycznie różnic w porównaniu z kontrolą, co świadczy o braku wpływu lantanowców w testowanym stężeniu na właściwości powierzchniowe komórek oznaczane tą metodą.



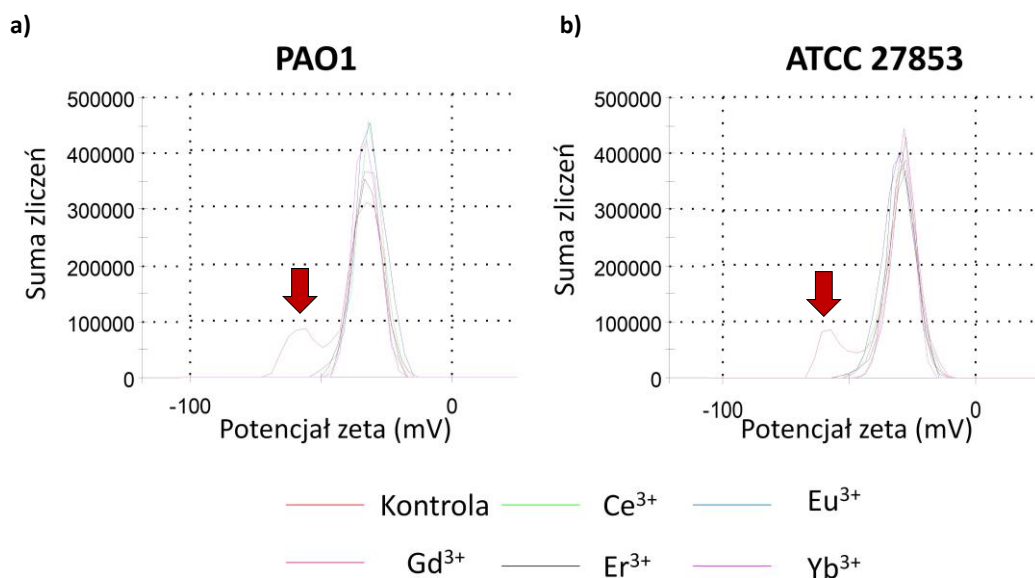
Rycina 23. Wartość kątów zwilżania wody i diiodometanu na powierzchni komórek bakteryjnych *P. aeruginosa* a) PAO1 i b) ATCC 27853 hodowanych w obecności jonów lantanowców. Na wykresie przedstawiono również obliczoną wartość energii swobodnej powierzchni (SFE).

Kontynuując badania wpływu jonów lantanowców na właściwości powierzchniowe komórek wykonano również pomiary potencjału zeta hodowli bakteryjnych w obecności tych związków. Wyniki przedstawione w **Tabeli 8.** sugerują, że obecność w hodowlach subinhibicyjnych stężeń jonów lantanowców, szczególnie jonów Eu^{3+} , Gd^{3+} i Er^{3+} powoduje wzrost potencjału zeta komórek bakteryjnych w przypadku obu badanych szczepów.

Tabela 8. Potencjał zeta (mV) wyznaczony dla komórek *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 hodowanych w obecności jonów lantanowców w stężeniu 0,5MIC

	Potencjał zeta (mV)	
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Kontrola	-38,45 ± 0,90	-31,45 ± 1,31
Ce³⁺	-32,83 ± 0,50*	-30,22 ± 0,71
Eu³⁺	-31,90 ± 0,89**	-29,82 ± 0,84*
Gd³⁺	-33,30 ± 0,48***	-29,53 ± 0,44***
Er³⁺	-31,67 ± 0,23***	-28,59 ± 0,44****
Yb³⁺	-31,50 ± 0,38*	-30,07 ± 1,28

Interesującym jest, że podczas pomiaru potencjału zeta w próbach kontrolnych zaobserwowano pojawienie się na wykresach dwóch pików (**Rycina 24.**, dodatkowy pik zaznaczony czerwoną strzałką), podczas gdy w próbach hodowanych w obecności jonów lantanowców obserwowano tylko jeden pik.



Rycina 24. Wykresy obrazujące pomiary potencjału zeta oraz obecność drugiego pików w próbach kontrolnych (czerwona strzałka) i tylko jednego pików w próbach inkubowanych w obecności jonów lantanowców

Wartość potencjałów zeta (mV) dla prób kontrolnych z uwzględnieniem obu pików przedstawiono w tabeli poniżej (**Tabela 9.**).

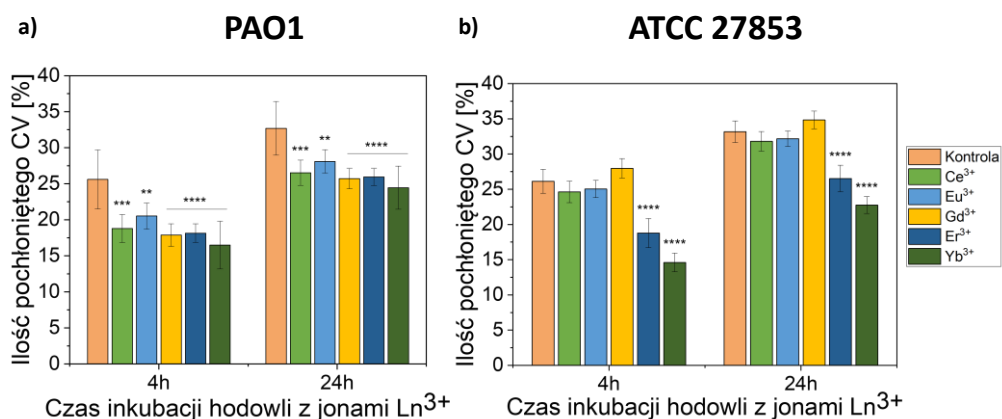
Tabela 9. Wartości potencjałów zeta (mV) z uwzględnieniem udziału procentowego obu pików wyznaczonych dla prób kontrolnych *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853

	Pik 1. (mV)	Udział (%)	Pik 2. (mV)	Udział (%)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	-34,5	78,9	-55,3	21,1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-29,7	92,2	-57,5	7,8

Można zauważyć, że obecność drugiego pików znacznie podnosi średnią wartość potencjałów zeta wyznaczonych dla prób kontrolnych. Z kolei, gdyby wziąć pod uwagę tylko i wyłącznie pik 1., który ma zdecydowanie większy udział % (w przypadku szczepu PAO1 78,9%, a ATCC 27853 92,2%), to różnice pomiędzy próbą kontrolną a próbami dla jonów lantanowców nie byłyby już tak znaczne. Nie jest jasne, dlaczego w kontroli pojawił się drugi pik, którego nie obserwowano w próbach z jonami lantanowców. Wyznaczone wielkości promienia hydrodynamicznego oraz współczynniki polidispersyjności (PDI) znajdują się w Materiałach dodatkowych (**Tabela S.4., Rycina S.4.**).

Pozostając w nurcie badania wpływu obecności subinhibicyjnych stężeń lantanowców na właściwości osłon komórkowych bakterii w kolejnym etapie badań zmierzono ich

przepuszczalność z wykorzystaniem fioletu krystalicznego. W związku z faktem, że naturalna przepuszczalność osłon zwiększa się w miarę starzenia się hodowli bakteryjnych wykonano dwa warianty doświadczenia: w pierwszym zmierzono przepuszczalność osłon dla hodowli w fazie wzrostu logarytmicznego (4 h inkubacji), a w drugim hodowli w późnej fazie stacjonarnej (24 h inkubacji). W obu przypadkach ustalono jednakową wartość gęstości optyczną zawiesiny bakteryjnej tak aby liczebność komórek była zbliżona, niezależnie od wariantu. Wyniki zestawiono na **Rycinie 25**.



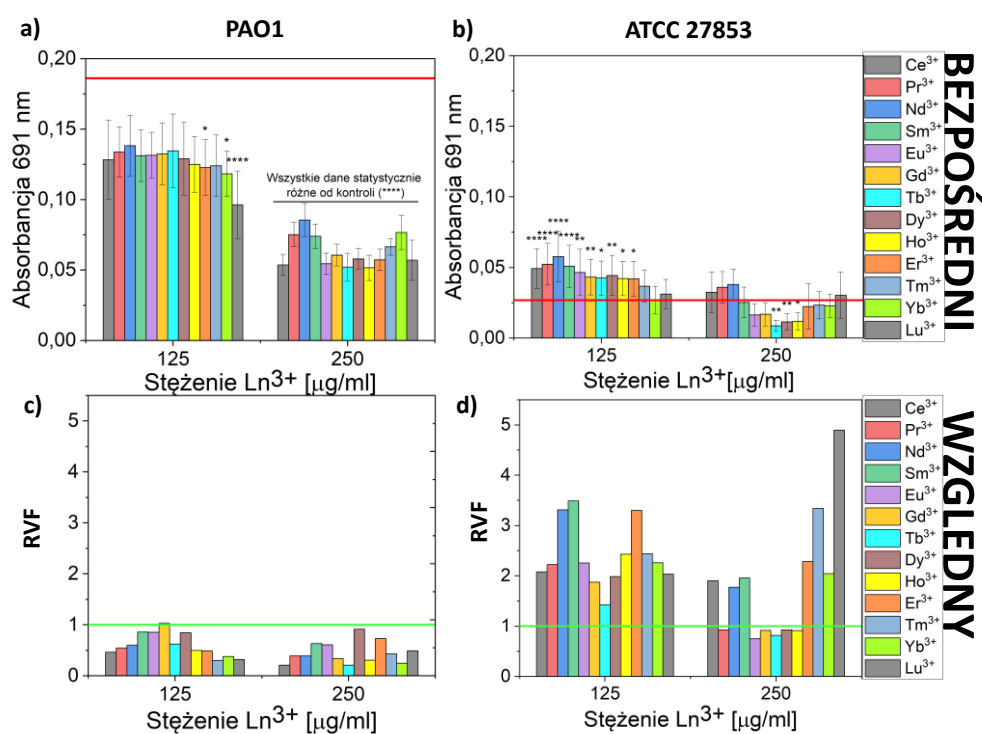
Rycina 25. Przepuszczalność osłon komórkowych bakterii *P. aeruginosa* a) PAO1 i b) ATCC 27853 wyrażona jako % pochłoniętego przez komórkę fioletu krystalicznego w hodowlach 4 i 24 h w obecności 0,5MIC wybranych jonów lantanowców

W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowano, że przepuszczalność osłon komórkowych obu badanych szczepów spadała w odniesieniu do kontroli po inkubacji w obecności 0,5MIC stężeń jonów lantanowców. W przypadku szczepu PAO1 było to widoczne w obecności wszystkich jonów, natomiast w przypadku szczepu ATCC 27853 tylko w obecności jonów Er^{3+} i Yb^{3+} . Ponadto, przepuszczalność rosła wraz ze starzeniem się hodowli, natomiast tendencja w odniesieniu do kontroli pozostawała taka sama jak w przypadku hodowli w fazie logarytmicznej.

Ponieważ obecność subinhibicyjnych stężeń jonów lantanowców istotnie wpływała na poziom produkcji biofilmów oraz uwalnianego eDNA a także zmieniała właściwości powierzchniowe osłon bakterii w kolejnym etapie badań postanowiono sprawdzić, czy produkcja wybranych czynników wirulencji również ulega zmianie. W dalszych doświadczeniach oznaczono poziom produkcji trzech wybranych determinant wirulencji *P. aeruginosa* (piocyjaniny, piowerdyny oraz elastazy) z zastosowaniem metod spektrofotometrycznych. Wyniki przedstawiono zarówno jako pomiar bezpośredni oraz jako współczynnik względny (ang. *relative virulence factor*, RVF). Pomiar bezpośredni jest

niezbędny do oceny ogólnego poziomu produkcji metabolitów, który jest często zależny od szczepu i gęstości komórek w hodowli. Z tego też względu RVF jest niezbędny do oceny, jak wartość uzyskanego pomiaru odnosi się do CFU/ml, co pozwala oszacować, ile danego czynnika wirulencji jest produkowane przez pojedynczą komórkę bakteryjną w obecności badanego czynnika w odniesieniu do kontroli.

Pierwszym oznaczanym czynnikiem wirulencji był poziom produkcji piocyjaniny w supernatancie pochodzonym. Wyniki zestawiono na **Rycinie 26**.

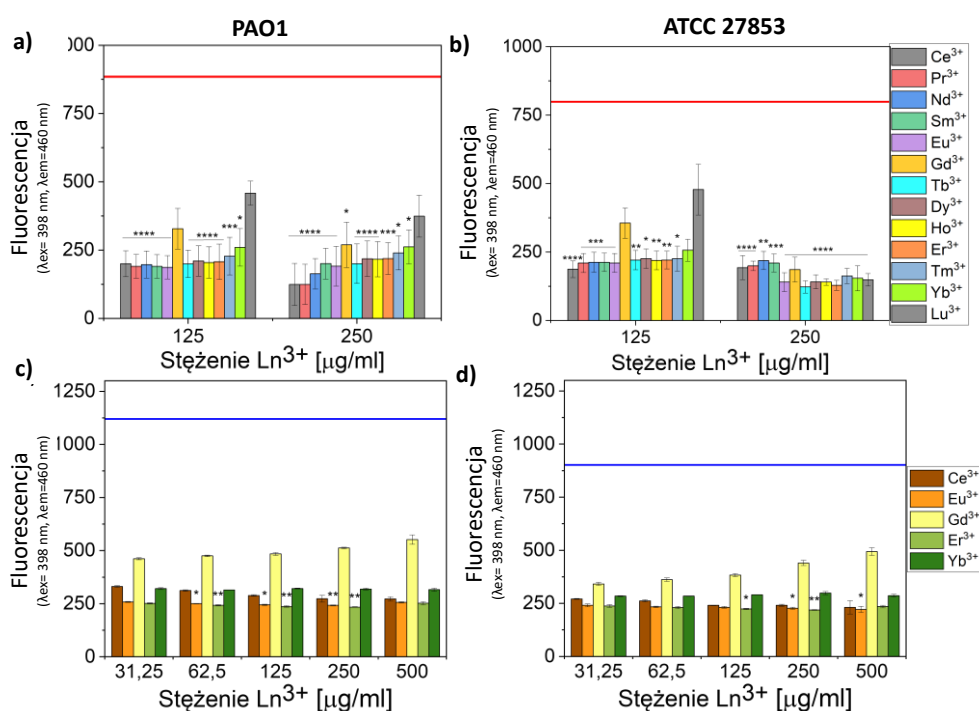


Rycina 26. Bezpośredni (a, b) i względny (c, d) pomiar poziomu produkcji piocyjaniny przez *P. aeruginosa* PAO1 (a, c) i ATCC 27853 (b, d) hodowanych w obecności 125 i 250 $\mu\text{g/ml}$ jonów lantanowców. Czerwona linia wskazuje poziom produkcji piocyjaniny w próbie kontrolnej. Zielona linia wskazuje poziom kontroli, do której odnoszone są wartości RVF ($\text{RVF}_{\text{kontroli}}=1$).

Oznaczono poziom produkcji piocyjaniny w hodowli kontrolnej oraz w próbach inkubowanych z 0,5 i 0,25MIC jonów lantanowców. Zdecydowano się przetestowanie również stężenia 0,25MIC, oprócz wcześniej badanego stężenia 0,5MIC, ponieważ podczas hodowli bakterii w celu określenia wartości Mzauważono zmiany zabarwienia w odniesieniu do hodowli kontrolnej. Było to szczególnie widoczne dla szczepu PAO1. Pomiar spektrofotometryczny wykazał, że w warunkach braku jonów lantanowców w hodowli, szczep PAO1 produkował piocyjaninę na znacznie wyższym poziomie niż szczep ATCC

27853 (czerwona linia wskazuje poziom metabolitu w próbach, które nie były traktowane Ln^{3+}) (**Rycina 26.**). Ponadto w przypadku szczepu PAO1 zaobserwowano istotne obniżenie poziomu produkcji piocyjaniny w odniesieniu do kontroli, co było zależne od stężenia dodanych jonów. Zielona linia na wykresie wskazuje z kolei poziom kontroli (RVF=1), do której były odnoszone wartości współczynnika RVF. W przypadku szczepu ATCC 27853 poziom produkcji piocyjaniny w hodowlach poddanych działaniu jonów lantanowców był nieco wyższy niż w kontroli, zwłaszcza w obecności stężenia 0,25MIC (125 $\mu\text{g/ml}$). Potwierdziły to również obliczone wartości RVF. W przypadku stężenia 0,5MIC (250 $\mu\text{g/ml}$) poziom produkcji piocyjaniny również był wyższy, jednak było to najlepiej widoczne dla prób inkubowanych w obecności jonów Ce^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} i Lu^{3+} .

Kolejnym badanym czynnikiem wirulencji była piowerdyna. Uzyskane wyniki zestawiono na **Rycinie 27.**



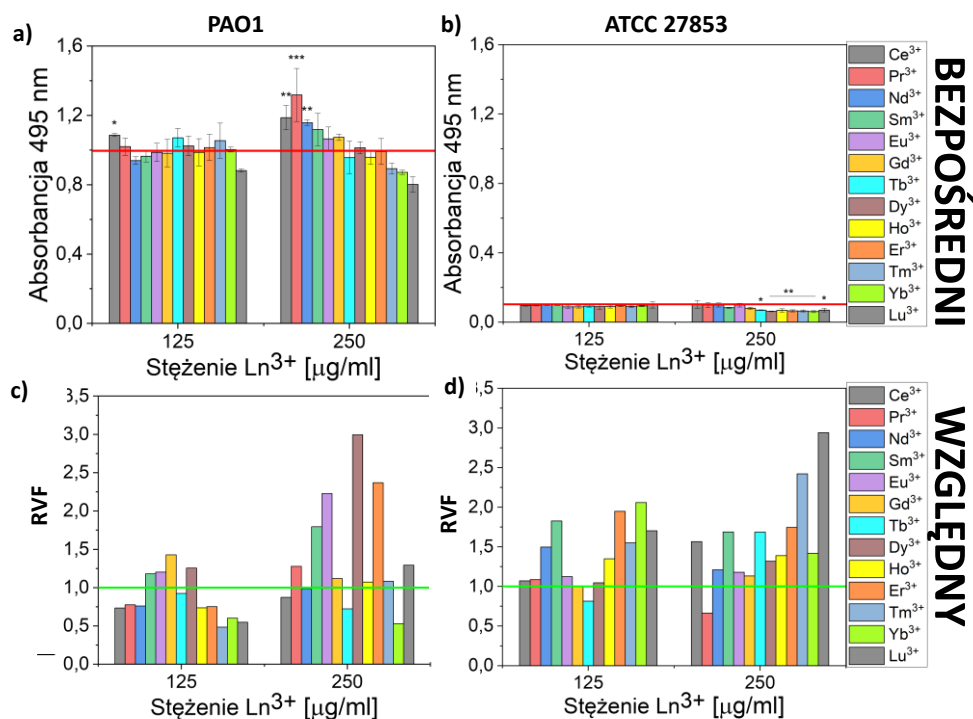
Rycina 27. Poziom fluorescencji emitowanej przez piowerdynę wytwarzaną przez szczepy *P. aeruginosa* PAO1 (a, c) i ATCC 27853 (b, d). Bakterie hodowane w obecności 125 i 250 $\mu\text{g/ml}$ jonów lantanowców (a, b); supernatant po hodowli kontrolnej suplementowany jonami lantanowców (c, d). Czerwona linia (a) wskazuje poziom produkcji piowerdyny w próbie kontrolnej bez suplementacji Ln^{3+} . Niebieska linia (b) - supernatant uzupełniony wodą destylowaną zamiast roztworu jonów lantanowców. Wszystkie zaprezentowane na wykresach dane różniły się istotnie statystycznie od kontroli ($p < 0,05$).

Ze względu na zaobserwowane różnice pomiędzy poziomem produkowanej piocyjaniny w hodowlach suplementowanych 0,5 i 0,25MIC jonów lantanowców, zdecydowano się również w tym przypadku przetestować oba te stężenia. Oba badane szczepy produkowały ten siderofor na zbliżonym poziomie (**Rycina 27.a,b** - linia czerwona), a w hodowli prowadzonej w obecności odpowiednio 125 i 250 $\mu\text{g/ml}$ Ln^{3+} obserwowano istotny spadek poziomu produkcji czynnika w odniesieniu do kontroli. Niestety, obserwowany efekt może być konsekwencją chelatowania jonów lantanowców przez piowerdynę przez, co otrzymany kompleks wpływa na wygaszenie mierzonej w metodzie fluorescencji. Ta hipoteza została potwierdzona dodatkowym eksperymentem przedstawionym na **Rycinie 27.c,d**. Piowerdyna w supernatancie bakteryjnym po hodowli kontrolnej emitowała fluorescencję na poziomie zaznaczonym niebieską linią, jednak po dodaniu do supernatantu wybranych jonów lantanowców (Ce^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Er^{3+} i Yb^{3+}) obserwowano znaczącą redukcję fluorescencji. Co więcej, redukcja fluorescencji nie była zależna od stężenia, co jest zastanawiające, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, iż efekt zależny od dawki obserwowano na **Rycinie 27a,b**. Ponieważ z przeprowadzonych doświadczeń wynika, iż nie jest jasne, w jakim stopniu spadek fluorescencji wynikał z zahamowania produkcji piowerdyny a w jakim z chelatowania jonów lantanowców, założono, że metoda ta jest nieodpowiednia do badania wpływu Ln^{3+} na produkcję piowerdyny przez bakterie i nie należy wyciągać wniosków tylko na podstawie tego doświadczenia.

Trzecim badanym czynnikiem wirulencji produkowanym przez szczepy *P. aeruginosa* był enzym elastaza i jego aktywność proteolityczna wobec odczynnika ECR, skutkująca uwalnianiem barwnika, którego poziom absorbancji mierzono spektrofotometrycznie. Uzyskane wyniki przedstawiono na **Rycinie 28**.

Pomiar aktywności elastazy w obecności jonów lantanowców wykonano testując dwa ich stężenia subinhibicyjne: 0,5 i 0,25MIC. W badaniach wykazano, że szczep *P. aeruginosa* PAO1 był bardziej efektywny w produkcji elastazy niż ATCC 27853, co zaznaczono na **Rycinie 28** czerwoną linią. Aktywność elastazy po inkubacji bakterii w obecności jonów lantanowców, w przypadku obu szczepów, wydawała się być na podobnym poziomie jak ta mierzona dla próby kontrolnej (nie poddanej działaniu Ln^{3+} -linia czerwona). Analiza obliczonych wartości RVF dla elastazy wskazała jednak, że poziom uwolnionego barwnika a tym samym aktywność proteolityczna enzymu po inkubacji w obecności Ln^{3+}

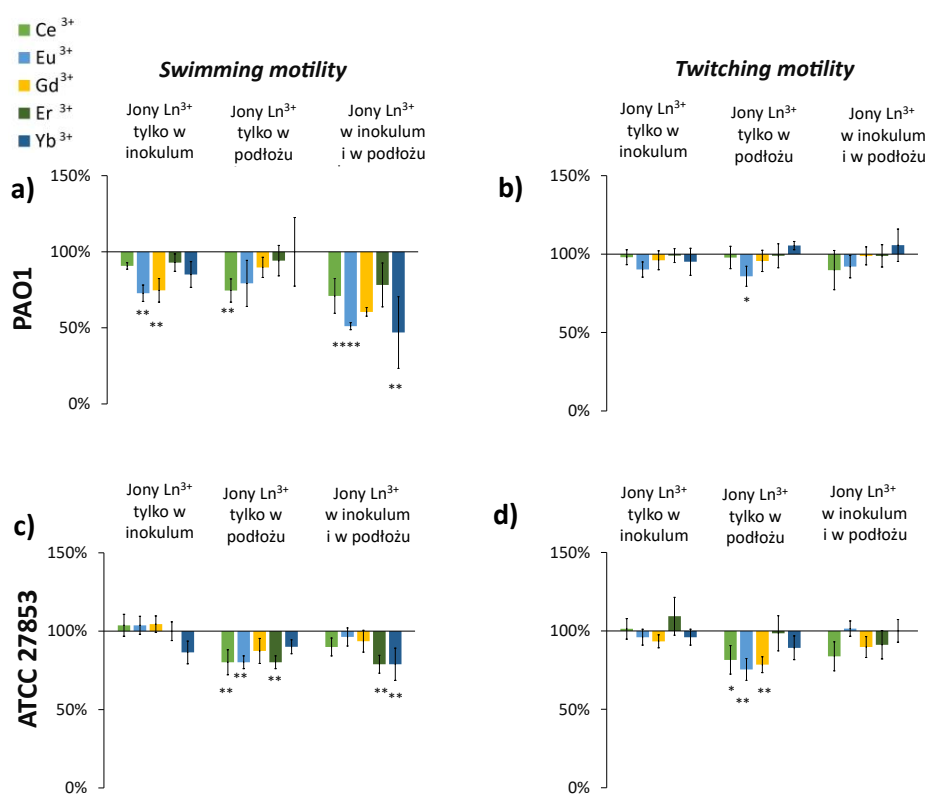
była podwyższona w przypadku obu badanych szczepów, zwłaszcza w obecności lantanowców w stężeniu 0,5MIC (250 $\mu\text{g/ml}$).



Rycina 28. Bezpośredni (a, b) i względny (c, d) pomiar aktywności elastazy produkowanej przez *P. aeruginosa* PAO1 (a, c) i ATCC 27853 (b, d) poddanych działaniu 125 i 250 $\mu\text{g/ml}$ jonów lantanowców. Czerwona linia wskazuje aktywność elastazy w próbce kontrolnej. Zielona linia wskazuje poziom kontroli, do której odnoszone są wartości RVF ($\text{RVF}_{\text{kontroli}}=1$).

Kolejnym badanym czynnikiem wpływającym na wirulencję *P. aeruginosa* była zdolność ruchu typu *swimming*, *swarming* i *twitching*, które mają istotny wpływ na etapie kolonizacji organizmu gospodarza. W związku z tym określono wpływ obecności wybranych jonów lantanowców (Ce^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+}) w stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$ na zdolność ruchu badanych szczepów. W tym celu jonami lantanowców suplementowano podłoża agarowe lub/i hodowle płynne bakterii. Uzyskane wyniki dla ruchu typu *swimming* i *twitching* zestawiono na **Rycinie 29**. W przypadku ruchu typu *swimming motility* zaobserwowano, że kiedy bakterie hodowano w obecności Ln^{3+} i nakłuwano podłoże bez ich dodatku, średnice obserwowanych stref wzrostu były istotnie mniejsze w odniesieniu do kontroli w przypadku szczepu PAO1 oraz jonów Eu^{3+} i Gd^{3+} . W przypadku szczepu ATCC 27853 nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian. Kiedy jony lantanowców

dodawano do podłoża agarowego a posiewane bakterie były inkubowane bez ich obecności obserwowano istotne zmniejszenie średnicy wzrostu w przypadku szczepu PAO1 w obecności jonów Ce^{3+} . W przypadku szczepu ATCC 27853 istotnie mniejsze średnice wzrostu obserwowane były w obecności jonów Ce^{3+} , Eu^{3+} i Er^{3+} . Kiedy jony lantanowców były dodane zarówno do hodowli jak i do podłoża agarowego zaobserwowano istotne zmniejszenie średnic wzrostu szczepu PAO1 w obecności Eu^{3+} i Yb^{3+} , natomiast w przypadku szczepu ATCC 27853 w obecności Er^{3+} i Yb^{3+} .



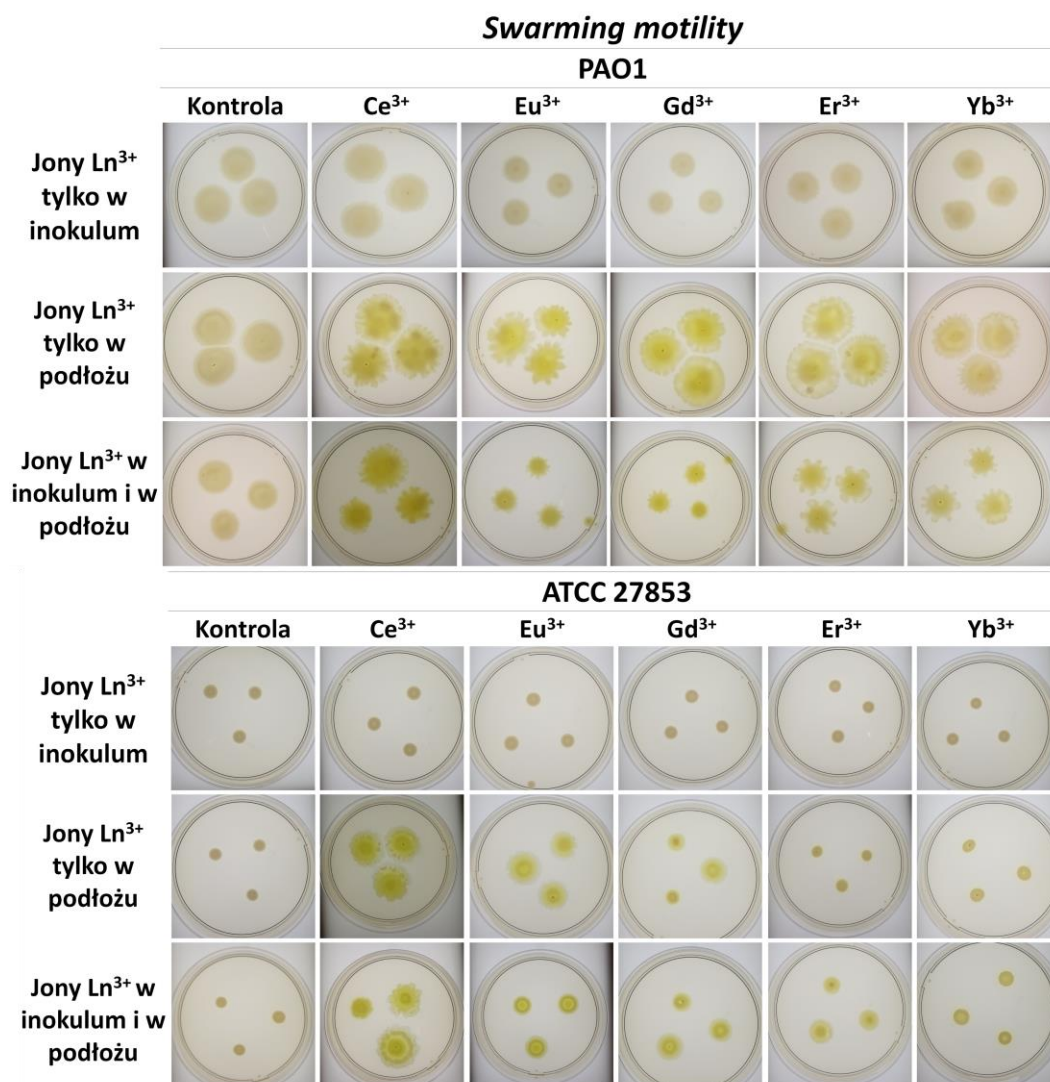
Rycina 29. Porównanie zmian w wielkości promienia stref wzrostu *P. aeruginosa* PAO1 (a, b) i ATCC 27853 (c, d) w odniesieniu do próby kontrolnej [%]. Na wykresach zestawiono wyniki testów na *swimming* (a, c) i *twitching motility* (b, d) wykonanych w różnych warunkach: jony Ln^{3+} były obecne tylko w hodowlach wyjściowych, którymi nakłuwano/nakrapiano płytki; jony Ln^{3+} były obecne tylko w podłożu stałym na płytkach; jony Ln^{3+} były obecne zarówno w hodowlach wyjściowych jak i w podłożu stałym. Stężenie jonów lantanowców było równe 0,5MIC.

W teście na zmiany w ruchu typu *twitching motility* istotne różnice wzrostu zaobserwowano jedynie w przypadku, kiedy jony lantanowców były dodawane tylko do podłoża agarowego. W przypadku szczepu PAO1 zaobserwowano istotne zmniejszenie średnicy wzrostu w hodowli z dodatkiem Eu^{3+} natomiast w przypadku szczepu ATCC 27853 poza jodem Eu^{3+} istotne różnice były obserwowane dodatkowo w obecności Ce^{3+} i Gd^{3+} . Co ciekawe takich zmian nie zauważono, kiedy lantanowce były dodane również do *inokulum*.

W przypadku ruchu typu *swarming motility* analiza wyników polegała na obserwacji zmian fenotypowych, głównie kształtu jaki przyjmuje hodowla na podłożu agarowym. Szczepy *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 naturalnie wzrastają w kształcie koła (ang. *circular*), bez widocznych wypustek czy tendencji do wzrostu typu kwiątka (*flower-like*), co jest widoczne w próbach kontrolnych na wykonanych zdjęciach (**Rycina 30**). Dodanie jonów lantanowców jedynie do *inokulum* nie powoduje zmiany, natomiast ich obecność w podłożu agarowym powoduje widoczną zmianę fenotypu, szczególnie w próbach zawierających Ce^{3+} . Obserwowany wzrost typu *swarming* zmienia się z *circular* w kierunku *flower-like* i dodatkowo obserwowana jest zmiana zabarwienia hodowli z kremowej/bladozielonej na intensywnie zieloną.

W doświadczeniach określających typ ruchu bakterii dobór metody eksperymentalnej jest niezwykle istotny. Jak wykazano, hodowanie bakterii w obecności jonów lantanowców i przeniesienie ich na czyste płytki z podłożem, praktycznie nie powoduje widocznych zmian w zachowaniu *P. aeruginosa* w odniesieniu do kontroli. Największe zmiany zostały odnotowane, kiedy bakterie z hodowli wyjściowej bez dodatku jonów zostały przeniesione na płytki z podłożem suplementowanym jonami lantanowców. Co ciekawe, w przypadku połączenia obu metod, czyli dodania Ln^{3+} zarówno do hodowli wyjściowej jak i do podłoża stałego, powodowało osłabienie zaobserwowanych zmian.

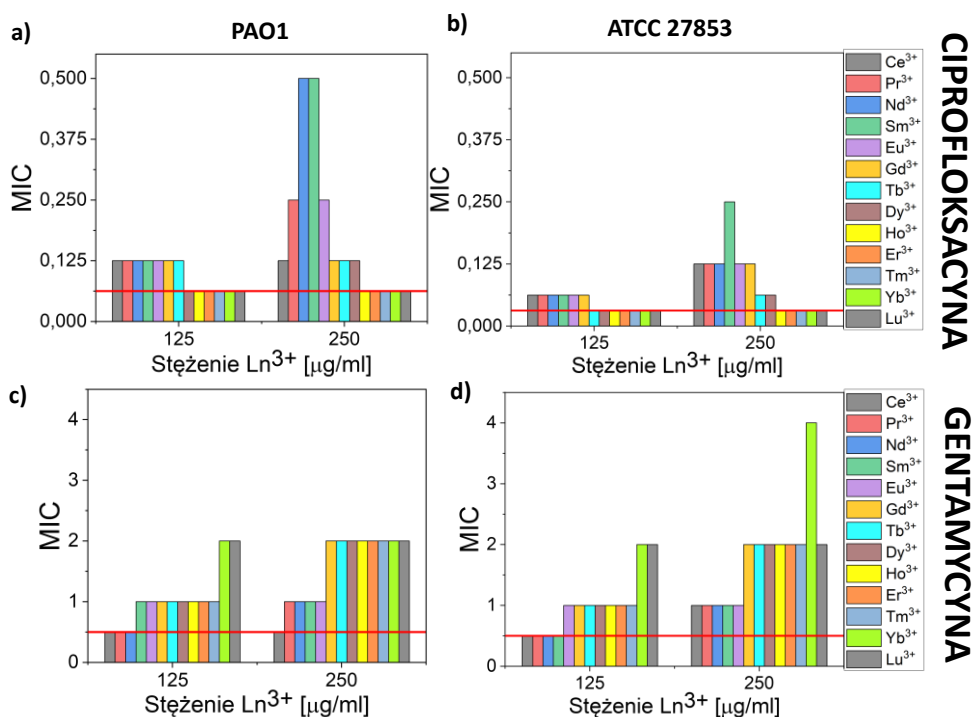
Niestety, jak wskazuje literatura (Ha et al. 2014b; Ha et al. 2014a; Turnbull and Whitchurch 2014) opisane wyżej metody charakteryzują się niską powtarzalnością, a na uzyskane wyniki silnie wpływają czynniki takie jak wilgotność podłoża agarowego, wilgotność otoczenia podczas inkubacji płytek i subtelne różnice w stężeniu agaru w podłożu. Z tego względu wyniki zostały przedstawione jako wartość procentowa w odniesieniu do kontroli wykonanej tego samego dnia w tych samych warunkach, a na wykresach przedstawiono uśrednioną wartość względną w porównaniu z kontrolą.



Rycina 30. Ruch typu *swarming* w hodowlach *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 wykonanych w różnych warunkach: jony Ln³⁺ były obecne tylko w hodowlach wyjściowych, którymi nakłuwano/nakrapiano płytki; jony Ln³⁺ były obecne tylko w podłożu stałym na płytkach; jony Ln³⁺ były obecne zarówno w hodowlach wyjściowych jak i w podłożu stałym.

IV.1.2 Obecność w hodowli jonów lantanowców wpływa na aktywność antybakteryjną ciprofloksacyny i gentamycyny wobec szczepów *P. aeruginosa*

Oprócz wpływu obecności jonów lantanowców w subinhibicyjnych stężeniach na właściwości powierzchniowe komórek bakteryjnych i produkcję wybranych czynników wirulencji, ważna jest również ocena wpływu na aktywność antybakteryjną standardowo stosowanych substancji przeciwdrobnoustrojowych – antybiotyków. Wybrano dwa leki: ciprofloksacynę i gentamycynę, zgodnie z ich udowodnionym działaniem przeciw *P. aeruginosa* (Giamarellou and Antoniadou 2001). Odnotowane zmiany wartości MIC wobec badanych szczepów w obecności stężeń 0,25 oraz 0,5MIC Ln^{3+} przedstawiono na **Rycinie 31**.



Rycina 31. Zmiany wartości MIC ciprofloksacyny (a, b) i gentamycyny (c, d) w obecności 125 i 250 $\mu\text{g/ml}$ jonów lantanowców wobec *P. aeruginosa* PAO1 (a, c) i ATCC 27853 (b, d). Linia czerwona oznacza MIC samego antybiotyku.

W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowano, że obecność w hodowli jonów lantanowców wpływała na działanie obu leków, natomiast efekt był zależny od charakterystyki działania antybiotyku.

Zgodnie z powszechnie przyjętymi standardami w badaniu lekowrażliwości bakterii za istotne zmiany wartości MIC w metodzie seryjnych rozcieńczeń uznaje się czterokrotny

wzrost lub spadek stężenia aktywnego badanego antybiotyku w odniesieniu do kontroli. W przypadku ciprofloksacyny MIC (linia czerwona) wobec szczepu PAO1 został wyznaczony dla stężenia 0,0625 µg/ml, a wobec szczepu ATCC 27853 było to 0,03125 µg/ml. W przypadku szczepu PAO1 inkubowanego w podłożu suplementowanym 0,25MIC jonów lantanowców z początku i środka szeregu (od Ce³⁺ do Tb³⁺) MIC ciprofloksacyny wzrastał dwukrotnie w porównaniu z MIC samego antybiotyku. Pozostałe jony (od Dy³⁺ do Lu³⁺) w stężeniu 0,25MIC nie powodowały zmian wartości MIC leku. W wyższym stężeniu Ln³⁺ (0,5MIC) obserwowano 2-krotny wzrost MIC ciprofloksacyny po dodaniu jonów: Ce³⁺, Gd³⁺, Tb³⁺ i Dy³⁺; 4-krotny wzrost MIC po dodaniu jonów: Pr³⁺ i Eu³⁺ oraz aż 8-krotny wzrost MIC po dodaniu jonów: Nd³⁺ i Sm³⁺. W przypadku szczepu ATCC 27853 po dodaniu 0,25MIC jonów lantanowców obserwowano z kolei 2-krotny wzrost MIC antybiotyku w przypadku jonów od Ce³⁺ do Gd³⁺. Obecność 0,5MIC jonów Tb³⁺ i Dy³⁺ spowodowała 2-krotny wzrost MIC ciprofloksacyny a dodanie 0,5MIC jonów Ce³⁺, Pr³⁺, Nd³⁺, Eu³⁺ i Gd³⁺ - wzrost 4-krotny w odniesieniu do kontroli. Jedynie dodatek jonu Sm³⁺ w stężeniu 0,5MIC spowodował 8-krotny wzrost MIC ciprofloksacyny. Można więc zauważyć, że w przypadku ciprofloksacyny największą zmianę w MIC antybiotyku powodują jony lantanowców z początku i ze środka szeregu.

W przypadku gentamycyny zaobserwowano nieco inną tendencję. MIC antybiotyku wobec szczepów PAO1 i ATCC 27853 wynosił 0,5 µg/ml. Po dodaniu jonów lantanowców (od Sm³⁺ do Tm³⁺) w stężeniu 0,25MIC obserwowano 2-krotny wzrost MIC gentamycyny, natomiast dodatek jonów Yb³⁺ i Lu³⁺ powodował 4-krotny wzrost MIC leku. Wyższe stężenie jonów lantanowców (0,5MIC) powodowało 2-krotny wzrost MIC gentamycyny obserwowany po dodaniu jonów z szeregu od Pr³⁺ do Eu³⁺, natomiast dodatek jonów od Gd³⁺ do Lu³⁺ spowodował 4-krotny wzrost MIC antybiotyku. W przypadku szczepu ATCC 27853 obserwowano 2-krotny wzrost MIC gentamycyny po dodaniu 0,25MIC jonów od Eu³⁺ do Tm³⁺ i 4-krotny wzrost po dodaniu jonów Yb³⁺ i Lu³⁺, z kolei obecność wyższego stężenia Ln³⁺ (0,5MIC) powodowała 2-krotny wzrost MIC antybiotyku po dodaniu jonów od Ce³⁺ do Eu³⁺, 4-krotny wzrost po dodaniu od Gd³⁺ do Tm³⁺ i Lu³⁺ i 8-krotny wzrost po dodaniu jonu Yb³⁺. W przypadku gentamycyny można więc zauważyć, że największą zmianę MIC powodowało dodanie jonów lantanowców ze środka i końca szeregu.

W celu potwierdzenia obserwowanego efektu obniżenia skuteczności badanych antybiotyków w obecności wybranych jonów lantanowców przetestowano ich aktywność wobec wybranych szczepów klinicznych *P. aeruginosa* o zróżnicowanej wrażliwości na

ciprofloksacynę i gentamycynę z zastosowaniem metody *checker-board*. W związku z powszechnie znaną heterogennością szczepów *P. aeruginosa* kluczowa była ocena czy efekt ten jest zauważalny na większej grupie szczepów. W celu łatwiejszej analizy uzyskanych danych obliczono wartości frakcyjnych stężeń hamujących (FIC) wobec wszystkich badanych szczepów i przedstawiono w **Tabeli 10**. Do porównania wybrano pięć jonów: ceru (Ce^{3+}), europu (Eu^{3+}), gadolinu (Gd^{3+}), erbu (Er^{3+}) i iterbu (Yb^{3+}). Zgodnie z wytycznymi (Jain et al. 2011) wartości FIC powyżej 4,0 zaklasyfikowano jako efekt antagonistyczny, w przedziale 0,5-4,0 jako efekt addycyjny lub brak wzajemnego oddziaływania, a poniżej 0,5 jako synergizm.

Tabela 10. Wartości FIC obliczone dla ciprofloksacyny i jonów lantanowców w stężeniu 125/250 $\mu\text{g/ml}$. Antagonizm ($\text{FIC} > 4,0$) został wyróżniony szarym kolorem.

	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> PA 15/3	<i>P. aeruginosa</i> PA 82/3	<i>P. aeruginosa</i> PA 14	<i>P. aeruginosa</i> PA 164
Ce^{3+}	2.25/2.5	2.25/4.5	1.25/1.5	1.25/1.0	1.25/2.5	1.25/1.5
Eu^{3+}	2.25/4.5	2.25/4.5	1.25/1.5	1.25/1.0	2.25/4.5	2.25/1.5
Gd^{3+}	2.25/2.5	2.25/4.5	1.25/1.0	1.25/1.0	2.25/4.5	1.25/1.5
Er^{3+}	1.25/1.5	1.25/1.5	0.75/1.0	0.75/1.0	1.25/1.5	0.75/1.0
Yb^{3+}	1.25/1.5	1.25/1.5	0.75/1.0	0.75/1.0	0.75/1.5	0.75/1.0

Tabela 11. Wartości FIC obliczone dla gentamycyny i jonów lantanowców w stężeniu 125/250 $\mu\text{g/ml}$. Antagonizm ($\text{FIC} > 4,0$) został wyróżniony szarym kolorem.

	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> PA 15/3	<i>P. aeruginosa</i> PA 82/3	<i>P. aeruginosa</i> PA 14	<i>P. aeruginosa</i> PA 164
Ce^{3+}	1.25/1.5	1.25/2.5	2.25/2.5	1.25/1.5	2.25/1.5	2.25/2.5
Eu^{3+}	2.25/2.5	2.25/2.5	2.25/2.5	2.25/2.5	2.25/1.5	2.25/4.5
Gd^{3+}	4.25/4.5	2.25/2.5	4.25/4.5	2.25/2.5	2.25/1.0	2.25/4.5
Er^{3+}	4.25/4.5	4.25/4.5	8.25/8.5	4.25/4.5	2.25/2.5	4.25/4.5
Yb^{3+}	4.25/4.5	4.25/8.5	8.25/8.5	4.25/4.5	2.25/2.5	4.25/8.5

Istotne zmiany ($\text{FIC} > 4,0$) wyróżniono szarym kolorem. W przypadku ciprofloksacyny (**Tabela 10.**) antagonizm wykazano w obecności 0,5MIC Ce^{3+} (szczep ATCC 27853), Eu^{3+}

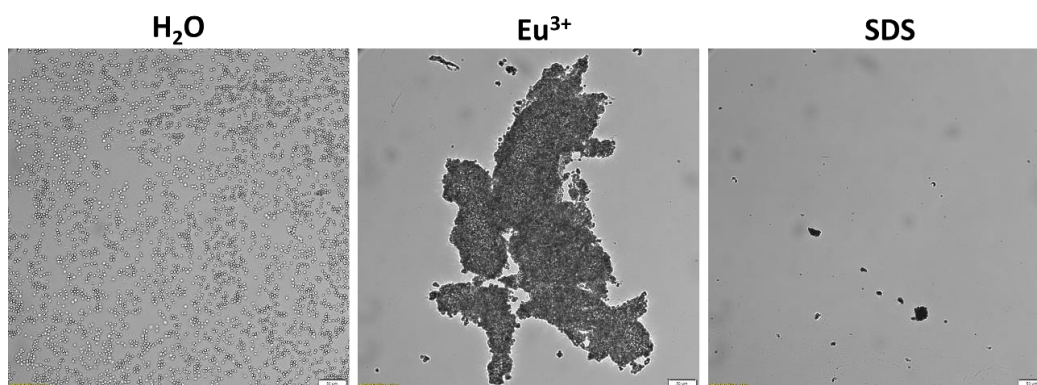
(szczep PAO1, ATCC 27853 i PA 14) i Gd^{3+} (szczep ATCC 27853 i PA 14). Pozostałe kombinacje mogą być interpretowane jako brak wpływu lub efekt addycyjny. Z kolei w przypadku gentamycyny (**Tabela 11.**) antagonizm wykazano w obecności: 0,5MIC Eu^{3+} (szczep PA 164), Gd^{3+} (szczep PAO1, PA 15/3 i PA 164), Er^{3+} (wszystkie szczepy z wyjątkiem PA 14) i Yb^{3+} (wszystkie szczepy z wyjątkiem PA 14) oraz dla 0,25MIC Gd^{3+} (szczep PAO1 i PA 15/3), Er^{3+} (wszystkie szczepy z wyjątkiem PA 14) i Yb^{3+} (wszystkie szczepy z wyjątkiem PA 14).

Zaobserwowane zmiany wyraźnie pokazują, że obecność jonów lantanowców w środowisku działania antybiotyku, może wpływać istotnie na jego aktywność antybakteryjną a tym samym niestety obniżać skuteczność antybiotykoterapii.

IV.1.3 Wpływ subinhibicyjnych stężeń jonów lantanowców na toksyczność wobec erytrocytów

Badając aktywność antybakteryjną różnych związków antybakteryjnych nie można zapomnieć o sprawdzeniu ich toksyczności wobec komórek eukariotycznych. Jest to niezwykle istotna część badań, ponieważ pozwala określić, jakie jest prawdopodobieństwo, że dana substancja będzie mogła być wykorzystywana w kontakcie z organizmem ludzkim. Erytrocyty powszechnie wykorzystywane są jako model do badania cytotoksyczności z kilku względów. Po pierwsze stanowią one mocno uproszczony model komórki zwierzęcej, pozbawionej jądra i organelli komórkowych. Po drugie nie wymagają hodowli i pasażowania jak w przypadku linii komórkowych. Niewątpliwą zaletą jest także fakt, że test hemolizy jest stosunkowo łatwy do przeprowadzenia, a wynik uzyskuje się natychmiast po zakończeniu inkubacji mierząc absorbancję supernatantu, co odpowiada ilości uwolnionej hemoglobiny (Manaargadoo-Catin et al. 2016). W celu oceny aktywności biologicznej badanych subinhibicyjnych stężeń (0,5MIC i 0,25MIC) jonów lantanowców (od Ce^{3+} do Lu^{3+}) względem erytrocytów przeprowadzono standardowy test hemolizy. Nie zaobserwowano wycieku hemoglobiny z krwinek przy żadnym z badanych stężeń jonów lantanowców, co potwierdził pomiar poziomu absorbancji przy długości fali 540 nm (maksimum absorpcji dla hemoglobiny) (**Rycina S.5.**). Ze względu na brak różnic pomiędzy wartościami absorbancji zmierzonymi dla prób z dodatkiem 0,5MIC i 0,25MIC Ln^{3+} na wykresie w Materiałach dodatkowych przedstawiono jedynie wartości absorbancji dla stężenia 0,5MIC.

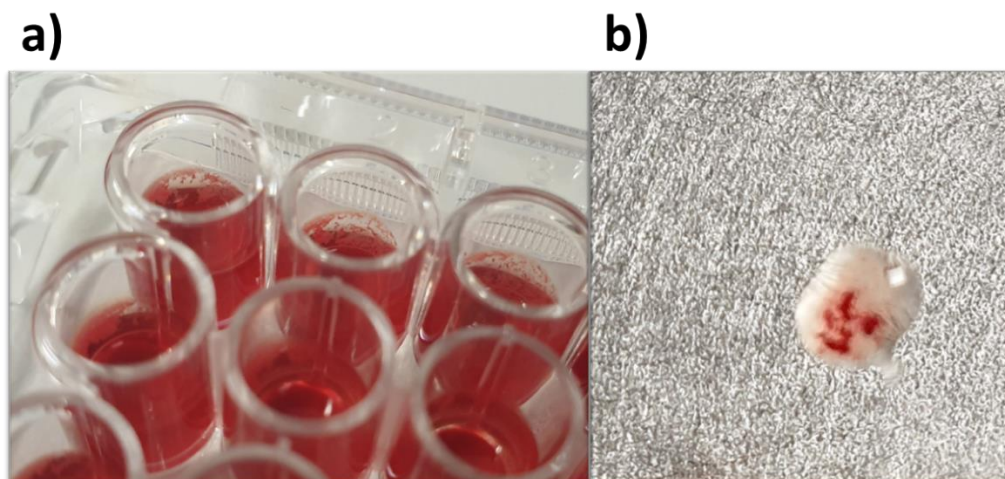
Opierając się tylko na pomiarach absorbancji niestety można było wyciągnąć błędne wnioski o nietoksyczności badanych stężeń jonów lantanowców wobec erytrocytów, dlatego zdecydowano się dodatkowo ocenić morfologię krwinek w obrazie mikroskopowym. W przeprowadzonych dodatkowo eksperymentach w celu oceny bezpieczeństwa stosowania jonów lantanowców wykonano rozmazy erytrocytów i zaobserwowano widoczne zmiany w morfologii krwinek obecności Ln^{3+} , co wskazuje na toksyczne działanie jonów (**Rycina 32.**).



Rycina 32. Reprezentatywny obraz fuzji erytrocytów wywołanej przez obecność jonów Ln^{3+} w porównaniu z wodą destylowaną (kontrola negatywna) i roztworem SDS (kontrola pozytywna)

Aby zapewnić jednakowe warunki osmotyczne, do kontroli negatywnej dodano wodę destylowaną co nie wpłynęło na zmiany obrazu erytrocytów: błony komórkowe były nienaruszone, a erytrocyty równomiernie rozmieszczone i oddzielone od siebie. Natomiast w przypadku wszystkich jonów lantanowców w obu badanych stężeniach (125 i 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zaobserwowano znaczną fuzję (zlepianie) erytrocytów. Efekt ten porównano z kontrolą pozytywną, którą przygotowano z użyciem 1% roztworu SDS, co spowodowało 100% hemolizę i całkowite zniszczenie erytrocytów. W obrazie mikroskopowym w próbie z dodatkiem SDS można dostrzec jedynie pojedyncze pozostałości komórkowe.

Powstanie aglomeratów komórek można było zaobserwować również gołym okiem, co jest widoczne na **Rycinie 33.**, gdzie na ściankach dołków widoczne są przyklejone resztki komórek, które osadziły się podczas wirowania (a) oraz po przeniesieniu niezwirowanych erytrocytów na szkiełko mikroskopowe (b), gdzie można odróżnić zlepione ze sobą komórki zawieszane w bezbarwnym supernatancie. Obserwowane zjawisko potwierdza brak wycieku hemoglobiny.



Rycina 33. Wpływ jonów lantanowców na erytrocyty: a) aglomeraty krwinkowe osadzone na ściankach płytki 96-dółkowej – widok z góry; b) fuzja krwinek widoczna gołym okiem, krwinki zawieszono są w bezbarwnym płynie, co potwierdza, że nie doszło do wycieku hemoglobiny.

IV.1.4 Aktywność antybakteryjna jonów metali przejściowych wobec *P. aeruginosa*

Jony lantanowców często dodawane są jako współdomieszki do nanomateriałów o potencjalnej aktywności antybakteryjnej, gdzie za efekt antybakteryjny mają odpowiadać wprowadzone do matrycy jony metali przejściowych. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa jonów metali przejściowych, szczególnie srebra i miedzi (w formie wolnej i w nanomateriałach), jest dokładnie zbadana i opisana w wielu opracowaniach naukowych. Z tego też względu w kolejnym etapie testowano tylko aktywność antybakteryjną jonów Ag^+ , Cu^{2+} oraz Zn^{2+} w związku z planowanym zastosowaniem ich jako współdomieszek do nanoapatytów zawierających już jony Ln^{3+} . Podczas analizy protokołów badawczych w opublikowanych pracach zauważono również dużą rozbieżność w warunkach doświadczeń, co przekładało się na rozbieżności w otrzymywanych wynikach. Parametrem, który zmieniał się szczególnie często było podłoże hodowlane, co było bodźcem do przeprowadzenia kolejnej części badań. Porównywano aktywność antybakteryjną jonów srebra, miedzi i cynku wobec szczepów referencyjnych i klinicznych *P. aeruginosa*, wykorzystując cztery pełne (LB, MHB, TSB i BHI) oraz cztery minimalne (medium MOPS, medium Davisa, medium M9 i medium M63) podłoża hodowlane. Analiza uzyskanych wyników została szczegółowo omówiona i opublikowana w pracy Rewak-Soroczyńskiej i wsp. (Rewak-Soroczynska et al. 2022a). W **Tabeli 12.** przedstawiono uzyskane wartości MIC poszczególnych jonów wobec szczepów wzorcowych *P. aeruginosa*. Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną (najniższe wartości MIC) zaobserwowano dla jonów Ag^+ a

obserwowany efekt był niezależny od rodzaju zastosowanego podłoża. W pożywkach pełnych wartości MIC wahały się w zakresie od 1,25 do 10 µg/ml odpowiednio dla podłoży LB i BHI. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku jonów miedzi i cynku. Wartości MIC dla jonu Cu²⁺ wahały się w zakresie od 240 do 740 µg/ml (LB i BHI), natomiast dla jonów Zn²⁺ wartości MIC w zakresie od 250 do 370 µg/ml w podłożu LB i MHB, natomiast w TSB i BHI zahamowanie wzrostu nie było obserwowane, nawet przy najwyższym zastosowanym stężeniu (1 mg/ml). Wartości MIC wyznaczone dla jonów Cu²⁺ i Zn²⁺ w LB i MHB były stosunkowo niskie i zbliżone, ale w TSB i BHI były 2–3-krotnie wyższe. Dla Zn²⁺ w podłożach TSB i BHI wartości MIC były poza skalą przy testowanych stężeniach (>1000 µg/ml).

Tabela 12. Porównanie wrażliwości szczepów wzorcowych *P. aeruginosa* na jony antybakteryjne (Ag⁺, Cu²⁺ i Zn²⁺) w różnych podłożach (Rewak-Soroczynska et al. 2022a)

Szczep	Minimalne stężenia hamujące [µg/ml]			
	LB	MHB	TSB	BHI
	Ag⁺			
PAO1	1,25	2,5	5	10
ATCC 27853	1,25	2,5	5	10
	Cu²⁺			
PAO1	240	290	690	730
ATCC 27853	250	290	690	740
	Zn²⁺			
PAO1	350	370	>1000	>1000
ATCC 27853	250	330	>1000	>1000
	Media minimalne			
	MOPS medium	M9 medium	M63 medium	Medium Davisa
	Ag⁺			
PAO1	0,0125	0,0125	0,00625	0,125
ATCC 27853	0,0125	0,025	0,0125	0,0125
	Cu²⁺			
PAO1	50	20	5	100
ATCC 27853	70	20	20	100
	Zn²⁺			
PAO1	170	>1000	>1000	>1000
ATCC 27853	160	>1000	>1000	>1000

W przypadku oznaczania wrażliwości bakterii w pożywkach minimalnych zaobserwowano, iż wartości MIC jonów Ag⁺ i Cu²⁺ były znacząco niższe niż w mediach pełnych. Wartości MIC jonów srebra były bardzo niskie i podobne we wszystkich testowanych pożywkach minimalnych. Warto podkreślić, że MIC Ag⁺ wobec szczepu PAO1

w podłożu BHI był aż 1600 razy wyższy niż w podłożu M63. Umiarkowane różnice w aktywności antybakteryjnej zaobserwowano dla jonów Cu^{2+} , a najniższą wartość MIC odnotowano w podłożu M63 (5 $\mu\text{g/ml}$), natomiast najwyższą w podłożu Davisa (100 $\mu\text{g/ml}$). W przypadku jonów miedzi różnice w aktywności pomiędzy podłożami pełnymi a minimalnymi nie były już tak duże jak w przypadku jonów srebra i w przypadku szczepu PAO1 MIC w BHI był wyższy o 146 razy niż w M63. Aktywność przeciwbakteryjną jonów cynku zaobserwowano jedynie w podłożu MOPS (160–170 $\mu\text{g/ml}$ w zależności od szczepu). Natomiast w M9, M63 i podłożu Davisa, suplementacja jonami cynku spowodowała wtrącenie się osadu i zmierzenie gęstości optycznej hodowli bakteryjnej było niemożliwe.

W celu potwierdzenia obserwowanych różnic pomiędzy wartościami MIC dla szczepów referencyjnych, do dalszej analizy wybrano jedno podłoże pełne (LB) i jedno podłoże minimalne (MOPS) oraz sprawdzono aktywność jonów metali przejściowych wobec czterech szczepów klinicznych *P. aeruginosa* (15/3, 82/3, 9/5, 14/3) o różnej wrażliwości na antybiotyki (**Tabela S.1.**). Podłoża LB i MOPS zostały wybrane ze względu na stosunkowo niskie wartości MIC badanych jonów wobec szczepów referencyjnych i najmniejszą ilość składników organicznych i nieorganicznych, które mogą wpływać na aktywność jonów metali (**Rycina 9.**) MIC dla badanych jonów metali przedstawiono w **Tabeli 13.**, a uzyskane wyniki potwierdzają tendencję obserwowaną dla szczepów referencyjnych.

Tabela 13. Porównanie wrażliwości szczepów klinicznych *P. aeruginosa* na jony antybakteryjne (Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+}) w różnych podłożach (Rewak-Soroczynska et al. 2022a)

Szczep	MIC [$\mu\text{g/ml}$]	
	LB	MOPS medium
Ag^+		
9/5	1.25	0,0125
14/3	1.25	0,025
82/3	1.25	0,0125
15/3	1.25	0,0125
Cu^{2+}		
9/5	170	80
14/3	150	100
82/3	130	50
15/3	140	50
Zn^{2+}		
9/5	280	180
14/3	250	120
82/3	250	190
15/3	250	170

IV.1.5 Aktywność biologiczna jonów Cu^{2+} oraz Eu^{3+} stosowanych w połączeniu wobec *P. aeruginosa* oraz komórek eukariotycznych

Doświadczenia opisane w niniejszym podrozdziale stanowią wstęp do badań aktywności biologicznej hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Cu^{2+} i Eu^{3+} . Miedź została wybrana jako przedstawiciel jonów metali przejściowych o dobrej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, natomiast jon europu wybrano ze względu na jego częste wykorzystanie podczas projektowania nowych związków opartych na matrycy apatytowej, co wynika z jego właściwości luminescencyjnych. W celu zminimalizowania potencjalnych interakcji pomiędzy składnikami podłoża a badanymi jonami zamiast standardowych podłoży hodowlanych zastosowano podłoże minimalne oparte na buforze MOPS (MOPS medium). Interakcje takie, występujące zwłaszcza w podłożach bogatych w fosforany i substancje organiczne, mogą prowadzić do obniżenia aktywności przeciwbakteryjnej, co opisano w opublikowanej już pracy (Rewak-Soroczynska et al. 2022a). W badaniach przedstawionych poniżej zmieniono odczyn podłoża MOPS na bardziej kwaśny, w porównaniu z wcześniejszymi doświadczeniami, gdzie wartości pH wszystkich podłoży minimalnych oscylowały wokół rekomendowanych w literaturze wartości 7,2-7,4. W przypadku kolejnych badań zdecydowano o obniżeniu pH do wartości 6,5, ze względu na fakt, że uwalnianie jonów z matrycy apatytowej jest lepsze w pH kwaśnym. Wartość pH 6,5 dobrano eksperymentalnie, testując wzrost mikroorganizmów w podłożach o różnej kwasowości (pH 5,0-8,0). Wyniki eksperymentu przedstawione są w materiałach dodatkowych (**Rycina S.6.**).

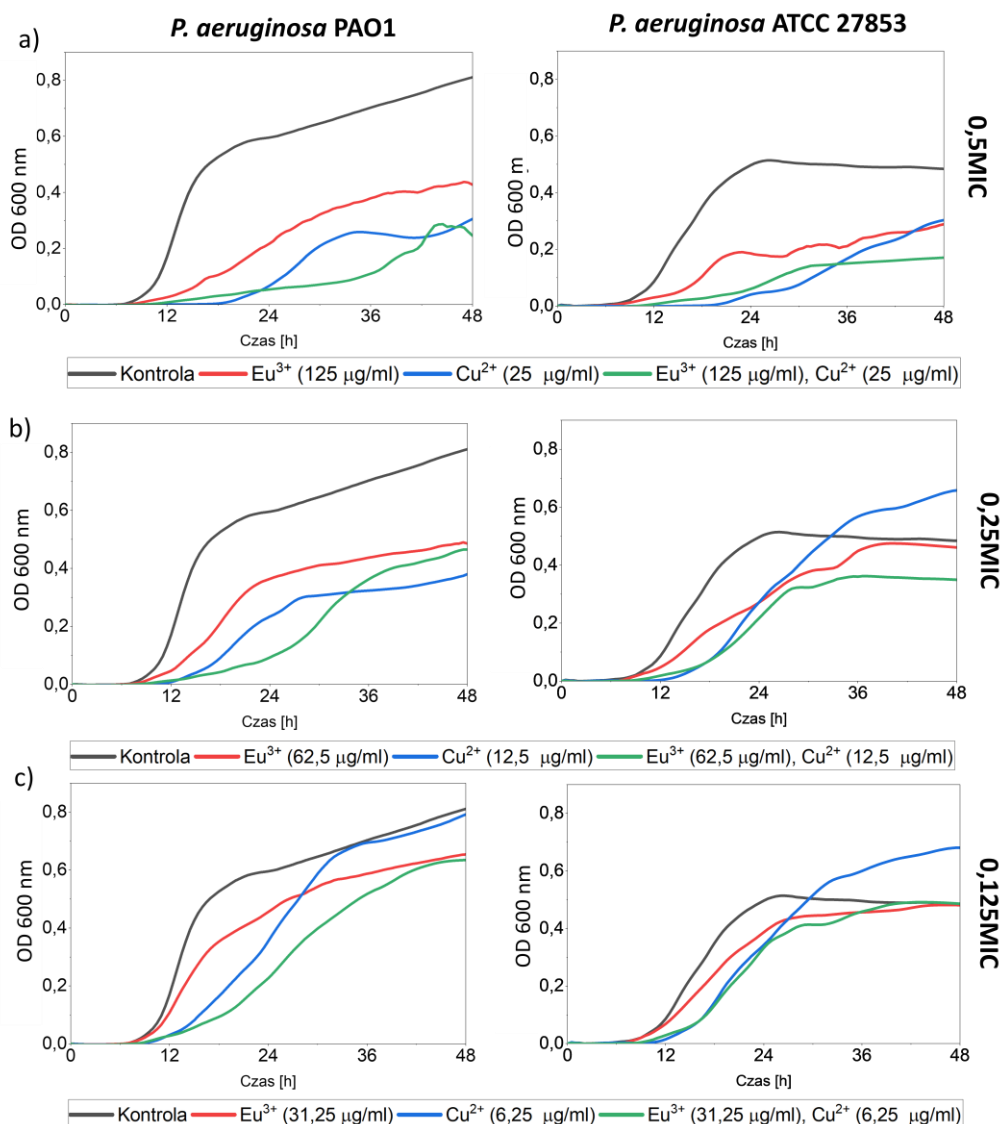
MIC badanych jonów osobno i w połączeniu (**Tabela 14.**) wyznaczono przy użyciu standardowej metody mikrorozcieńczeń w podłożu MOPS. Ponadto, w celu oceny aktywności przeciwbakteryjnej jonów w połączeniu wykonano metodę *checker-board* i obliczono frakcyjne stężenie hamujące (FIC), co pozwoliło na określenie typu interakcji (inhibicja/synergia).

Tabela 14. Minimalne stężenia hamujące (MIC) Eu^{3+} i Cu^{2+} (samodzielnie i w połączeniu z drugim jonem) oraz odpowiadające im frakcyjne stężenia hamujące (FIC) wobec *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853

	Jon	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
MIC	Eu^{3+}	250	250
	Eu^{3+} w obecności Cu^{2+}	250	125
	Cu^{2+}	50	25
	Cu^{2+} w obecności Eu^{3+}	50	50
FIC	$\text{Eu}^{3+} + \text{Cu}^{2+}$	2	2.5

Dla obu badanych szczepów (*P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853) wartość MIC dla jonu Eu^{3+} wynosiła 250 $\mu\text{g/ml}$, natomiast dla jonów Eu^{3+} w obecności Cu^{2+} spadła do 125 $\mu\text{g/ml}$ dla szczepu ATCC 27853, natomiast dla szczepu PAO1 pozostała bez zmian. MIC jonów Cu^{2+} wobec szczepu PAO1 był również taki samo (50 $\mu\text{g/ml}$) bez względu na dodatek jonu Eu^{3+} , natomiast w przypadku szczepu ATCC 27853 sytuacja była zupełnie odwrotna niż ta zaobserwowana dla jonu Eu^{3+} . Uzupełnienie podłoża o jon Eu^{3+} spowodowało wzrost wartości MIC dla jonu Cu^{2+} z 25 do 50 $\mu\text{g/ml}$. Wydaje się jednak, że obserwowane zmiany nie są znaczące, o czym świadczy interpretacja obliczonych wartości FIC. Zgodnie z zakresami zaproponowanymi przez Jaina i wsp. (Jain et al. 2011) wyniki takie można zinterpretować jako efekt addycyjny lub brak wpływu.

Ponadto, w celu monitorowania zmian w dynamice wzrostu bakterii w obecności jonów Eu^{3+} i Cu^{2+} mierzono gęstość optyczną hodowli przez 48 h co 30 minut. Do oceny zastosowano stężenia jonów odpowiadające 0,5MIC, 0,25MIC oraz 0,125MIC (**Tabela 14.**), pojedynczo i w połączeniu. W tym doświadczeniu zdecydowano się na uwzględnienie niższego stężenia jonów (0,125MIC), gdyż w przypadku stosowania domieszek w nanomateriałach ilość uwolnionych jonów jest zazwyczaj na niskim poziomie. Zmętnienie hodowli po inkubacji w obecności stężeń 0,125MIC badanych jonów było jednak już bardzo zbliżone do zmętnienia kontroli, dlatego nie zdecydowano się na dalsze zmniejszanie stężeń. Na **Rycinie 34.** przedstawiono krzywe wzrostu badanych szczepów w obecności wybranych stężeń jonów Eu^{3+} i Cu^{2+} , natomiast więcej wariantów można znaleźć w materiałach uzupełniających (**Rycina S.7.**).



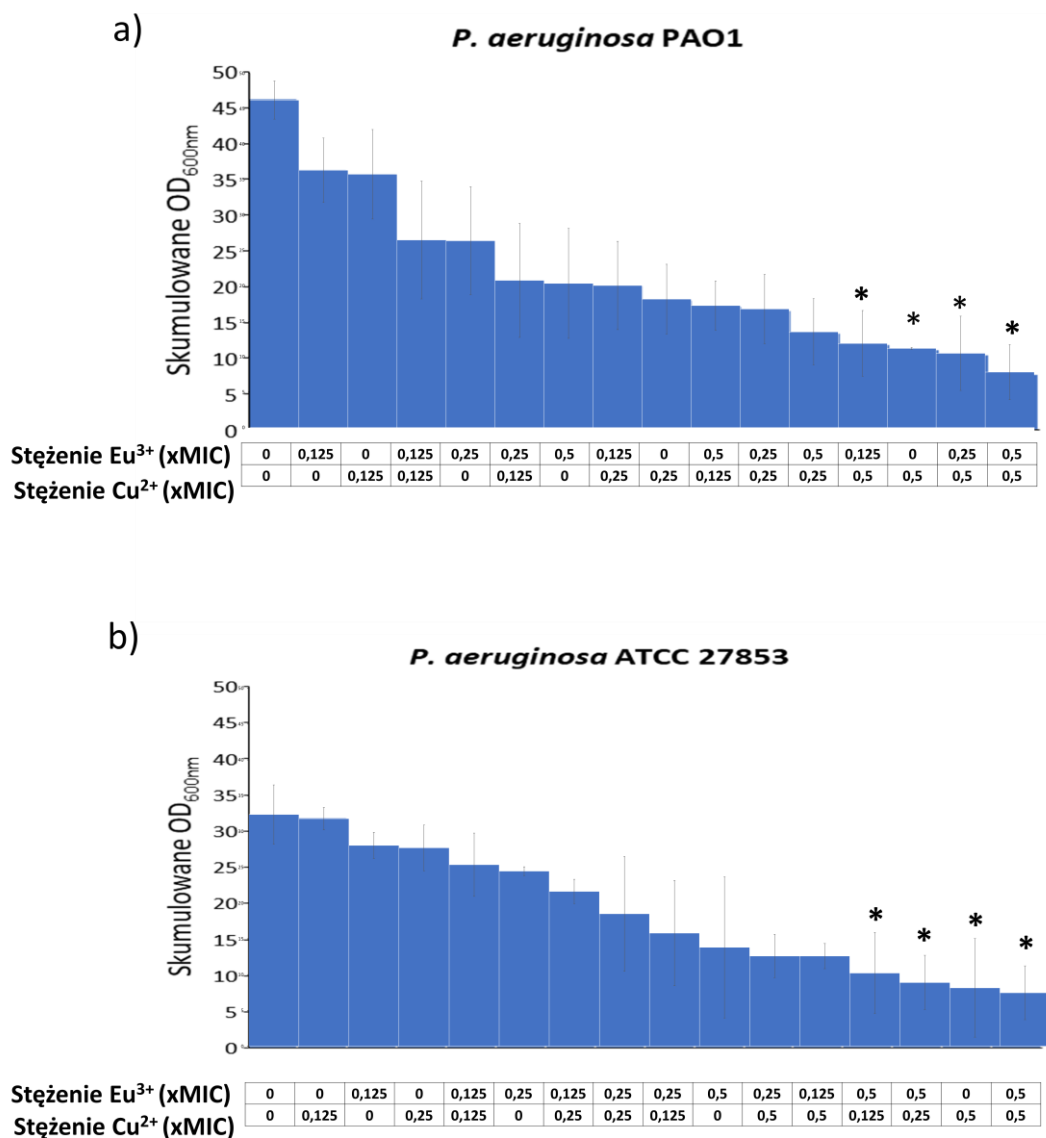
Rycina 34. Dynamika zmian gęstości hodowli *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 w podłożu MOPS uzupełnionym jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} w stężeniach odpowiadających 0,5; 0,25 i 0,125MIC

W przypadku szczepu PAO1 można zaobserwować, że dodanie do podłoża jonów miedzi i europu w stężeniu 0,5MIC (a), oddzielnie i w połączeniu, wpływa hamująco na dynamikę wzrostu w porównaniu z kontrolą. Wyraźnie widać opóźnienie wejścia hodowli w fazę logarytmicznego wzrostu: w kontroli obserwowane jest ono około 12 godziny hodowli, natomiast po dodaniu jonów Eu^{3+} i Cu^{2+} nawet około godziny 24. W przypadku połączenia jonów Eu^{3+} i Cu^{2+} hodowla osiąga wzrost logarytmiczny dopiero około 36 godziny. W przypadku suplementacji podłoża stężeniami 0,25MIC testowanych jonów (b) hodowle wchodzą w fazę logarytmicznego wzrostu szybciej niż w przypadku stężeń 0,5MIC, natomiast wciąż jest to znaczne opóźnienie w porównaniu z kontrolą. W obu

wariantach (a i b) końcowa wartość OD_{600} hodowli suplementowanych jonami metali jest niższe niż wartość OD_{600} hodowli kontrolnej, natomiast istotną statystycznie różnicę gęstości wykazano jedynie dla 0,5MIC jonów Cu^{2+} oraz 0,5MIC jonów Cu^{2+} w połączeniu z 0,5MIC jonów Eu^{3+} . W przypadku stężeń 0,125MIC (c) opóźnienie jest najmniejsze, a hodowle osiągają końcową wartość OD_{600} zbliżoną do kontroli, co potwierdza brak statystycznie istotnych różnic. W przypadku szczepu ATCC 27853 dodanie jonów w stężeniu 0,5MIC powoduje opóźnienie wejścia w fazę logarytmicznego wzrostu, podobnie jak u szczepu PAO1, natomiast dodanie 0,25MIC jonów w tym przypadku nie jest już tak efektywne. Widać to szczególnie w przebiegu krzywej wyznaczonej dla hodowli z dodatkiem jonów Cu^{2+} , która pomimo opóźnienia wejścia w fazę logarytmicznego wzrostu z 12 godziny do ok 20 godziny, osiąga wyższą wartość OD_{600} po około 30 godzinach niż hodowla kontrolna. W przypadku jonów Eu^{3+} końcowa wartość OD_{600} jest zbliżona do kontrolnej, natomiast gęstość hodowli suplementowanej zarówno europem jak i miedzią jest nieznacznie niższa niż kontroli. Dodanie stężeń 0,125MIC nie powoduje znacznego opóźnienia wejścia w fazę logarytmicznego wzrostu, a osiągnięte wartości OD_{600} są zbliżone (dla jonu Eu^{3+} i połączenia jonów Eu^{3+} z jonami Cu^{2+}) lub nawet wyższe (Cu^{2+}) od kontroli. W przypadku szczepu ATCC 27853 nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy końcowymi wartościami OD_{600} kontroli i badanych prób.

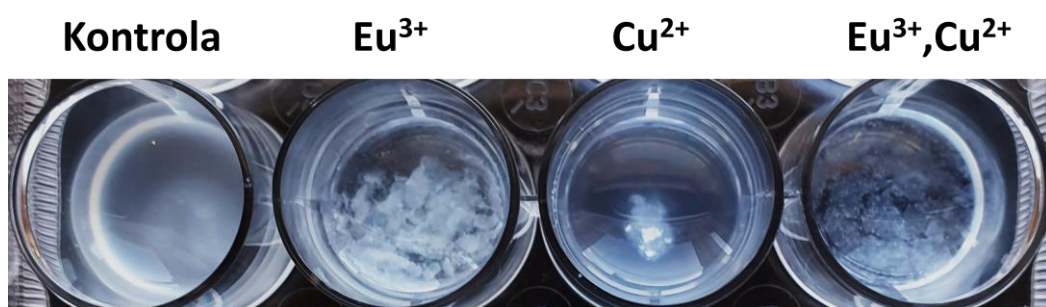
W związku z tym, że analiza samych krzywych wzrostu hodowli bakteryjnych jest dosyć problematyczna postanowiono przedstawić otrzymane wyniki w postaci wykresów skumulowanych wartości OD_{600} uzyskanych podczas 48 h hodowli. Dodatkowo dane na wykresach uszeregowano w kolejności malejącej, co ułatwiło interpretację wyników. W przypadku obu badanych szczepów (PAO1 i ATCC 27853) można zauważyć, że największa redukcja wzrostu hodowli ma miejsce po dodaniu do podłoża zarówno jonów miedzi jak i europu w stężeniach 0,5MIC (**Rycina 35**). Pomimo, że w hodowlach obu szczepów widoczna jest redukcja OD_{600} w porównaniu do kontroli po dodaniu badanych jonów to istotnie niższe zmętnienie odnotowano jedynie w kilku przypadkach. Wartości OD_{600} skumulowanych wyznaczonych dla 0,5MIC jonów Cu^{2+} względem szczepu PAO1 jak również wartości wyznaczone dla połączeń 0,5MIC jonów Cu^{2+} z 0,5; 0,25 i 0,125MIC jonów Eu^{3+} istotnie hamują wzrost hodowli. Podobna wartość OD_{600} i istotność statystyczna o tym samym poziomie (*) tych wyników wskazuje, że dodatek jonów europu nie ma istotnego wpływu na aktywność antybakteryjną jonów miedzi. Z kolei w przypadku szczepu ATCC 27853 istotnie statystycznie niższe skumulowane OD_{600} obserwowano dla: 0,5MIC

jonów Cu^{2+} , połączenia 0,5MIC jonów Cu^{2+} i 0,5MIC jonów Eu^{3+} oraz połączeń niższych stężeń jonów Cu^{2+} (0,25 i 0,125MIC) z 0,5MIC jonów Eu^{3+} . Nie jest to jednak dowód świadczący o wpływie jonów europu na aktywność antybakteryjną jonów miedzi, ponieważ jak można zauważyć na wykresie (**Rycina 35.b**) niższa gęstości hodowli przy zastosowaniu jedynie 0,5MIC jonów Eu^{3+} jest na zbliżonym poziomie, mimo że tego wyniku nie można uznać za istotnie różnego w odniesieniu do kontroli.



Rycina 35. Skumulowane wartości OD_{600} 48 h hodowli bakteryjnych inkubowanych w obecności różnych stężeń jonów miedzi (Cu^{2+}) i europu (Eu^{3+})

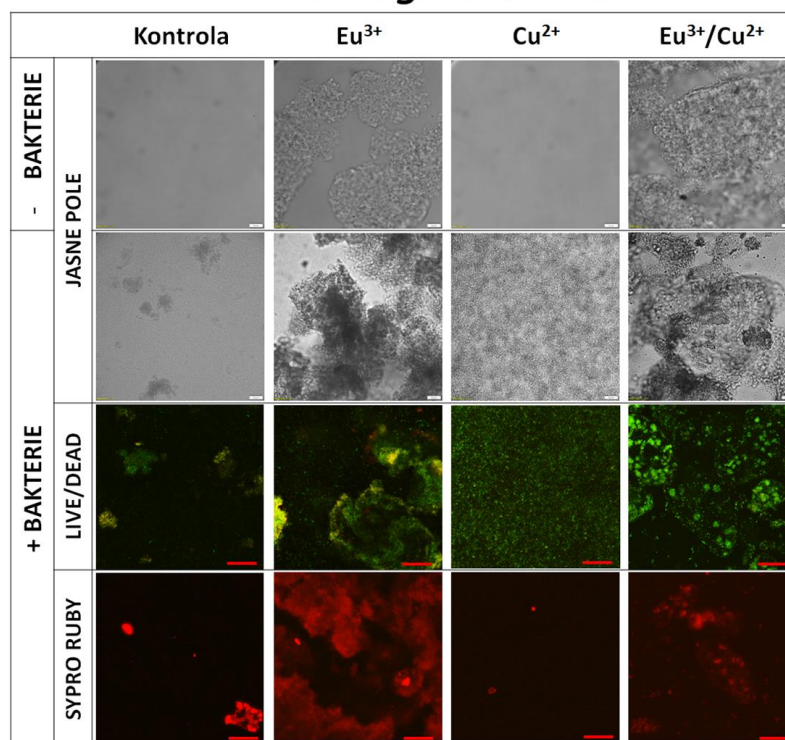
W trakcie badania aktywności antybakteryjnej jonów metali zaobserwowano widoczne gołym okiem zmiany barwy, wzrost zmętnienia lub wytrącanie się osadów w podłożu co było wynikiem oddziaływań zachodzących pomiędzy składnikami pożywki a kationami. Takie zmiany były obserwowane zarówno w podłożach minimalnych jak i pełnych co zostało opisane w opublikowanej już pracy (Rewak-Soroczynska et al. 2022a). Zmiany zabarwienia, zmiany pH i powstałe zmętnienia po suplementacji podłoży mikrobiologicznych jonami Cu^{2+} zostały pokazane w materiałach dodatkowych (**Rycina S.8**). Podczas przygotowywania doświadczenia nie zauważono jednak zmian w wyglądzie pożywki po dodaniu do niej jonów Eu^{3+} . Natomiast po całonocnej inkubacji hodowli bakteryjnej obserwowano (**Rycina 36.**) zamiast równomiernego zmętnienia pożywki pojawienie się osadu w kształcie płatków, ale tylko w próbach z dodatkiem jonów Eu^{3+} . Ponadto w kontroli negatywnej w pożywce z dodatkiem jonów Eu^{3+} , ale bez bakterii, nie obserwowano pojawienia się widocznego gołym okiem osadu.



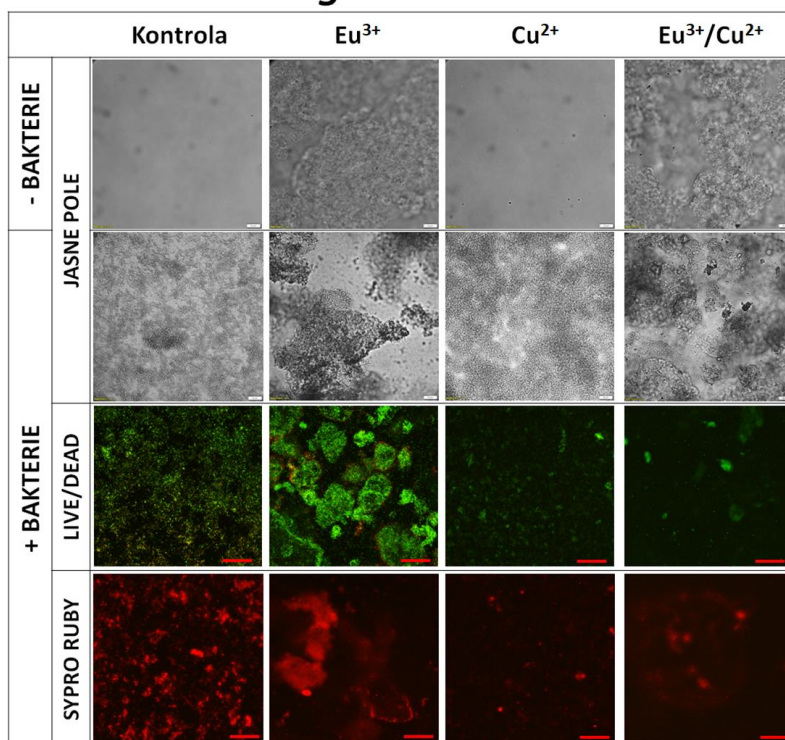
Rycina 36. Osad w medium po dodaniu jonów Eu^{3+} i po inkubacji z *P. aeruginosa* PAO1

Obserwacje te wymagały dalszej weryfikacji, dlatego w kolejnym etapie badań zastosowano mikroskopię jasnego pola i konfokalną mikroskopię laserową z barwieniem żywych i martwych komórek (LIVE/DEAD) oraz barwieniem Sypro Ruby, pozwalającym uwidocznienie macierz biofilmów. Uzyskane wyniki zostały zestawione na **Rycinie 37.** gdzie wyraźnie widać, że czyste medium (kontrola) oraz medium po dodaniu jonów Cu^{2+} (bez bakterii) są klarowne, natomiast w próbach z jonami Eu^{3+} widoczny jest osad w kształcie przypominającym płatki. Struktury te, po inkubacji z bakteriami, służyły jako "platforma" dla wzrostu bakterii, co najlepiej widać po zastosowaniu barwników fluorescencyjnych. Komórki bakteryjne, głównie żywe, wydają się najlepiej przylegać do płatków, a zmętnienie w objętości pożywki nieznacznie się zmniejsza.

a)

***P. aeruginosa* PAO1**

b)

***P. aeruginosa* ATCC 27853**

Rycina 37. Obrazy mikroskopowe hodowli bakteryjnych i kontroli negatywnych pożywek uzupełnionych jonami Eu³⁺ i Cu²⁺ barwionych różnymi technikami: a) *P. aeruginosa* PAO1, b) *P. aeruginosa* ATCC 27853; podziałka odpowiada 50 μm

Podsumowując, w pierwszej części rozprawy zbadano wpływ obecności jonów lantanowców oraz jonów metali przejściowych na wzrost, właściwości powierzchniowe i wirulencję *P. aeruginosa*, co stanowiło wstęp do badań z wykorzystaniem hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych tymi jonami.

IV.2 Charakterystyka aktywności biologicznych różnych form hydroksyapatytów domieszkowanych lantanowcami i metalami przejściowymi

Drugim kluczowym etapem badań było określenie aktywności antybakteryjnej nanomateriałów o strukturze apatyty. Jak już wcześniej wspomniano hydroksyapatyt wapnia ze względu na swoją wysoką biokompatybilność, niską toksyczność wobec komórek eukariotycznych i właściwości osteoregeneracyjne jest materiałem wykorzystywanym do wytwarzania implantów stosowanych do wypełniania ubytków kostnych. Niestety, z procedurami implantologicznymi często związane jest ryzyko infekcji bakteryjnej, która może rozwinąć się w miejscu wszczepu prowadząc do utrudnienia gojenia a nawet do odrzucenia implantu. Z tego względu istnieje konieczność modyfikowania materiałów implantacyjnych w taki sposób, aby zminimalizować ryzyko rozwoju patogennych mikroorganizmów. W tym celu projektowane związki często domieszkuje się jonami metali o potwierdzonej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Zamierzonym efektem takiej modyfikacji strukturalnej jest stopniowe uwalnianie jonów metali z matrycy w miejscu wszczepu i zapobieganie w ten sposób namnażaniu się drobnoustrojów.

IV.2.1 Charakterystyka nanohydroksyapatytów domieszkowanych wybranymi jonami metali przejściowych bloku d

Badania przedstawione w tym rozdziale zostały zaplanowane i wykonane w celu określenia aktywności biologicznej różnych form materiałów o strukturze apatyty (koloidy, tabletki, hydrożele oraz kompozyty z dodatkiem PTFE) domieszkowanych wybranymi jonami metali przejściowych bloku d (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) wobec bakterii *P. aeruginosa*. Wszystkie przedstawione materiały zostały zaprojektowane, wytworzone i scharakteryzowane fizykochemicznie w zespole Profesora Rafała Wiglusza w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN.

Pierwsza grupa badanych materiałów obejmuje dwie serie: $\text{Ag}^+:\text{HAp}$, czyli serię hydroksyapatytów domieszkowanych różnymi stężeniami molowymi jonów srebra (1; 2,5 i 5 mol%) oraz serię $\text{PTFE}@\text{Ag}^+:\text{HAp}$, w której skład wchodziły kompozyty wytworzone z

poli(tetrafluoroetyleny – PTFE) i hydroksyapatytów domieszkowanych 5 i 10mol% Ag⁺. Kompozyty badano w formie tabletek, natomiast apatyty w formie koloidów, przygotowanych przez zawieszenie materiałów sproszkowanych w soli fizjologicznej oraz prasowanych tabletek. Wytworzenie i przebadanie *in vitro* wspomnianych materiałów było pierwszym etapem badań nad materiałami przeznaczonymi do regeneracji tkanki chrzęstnej, które w założeniu miały ograniczać namnażanie drobnoustrojów i zapobiegać tworzeniu się biofilmu na powierzchni implantu. Wyniki badań wstępnych zostały opublikowane we współautorskiej publikacji (Targonska et al. 2020).

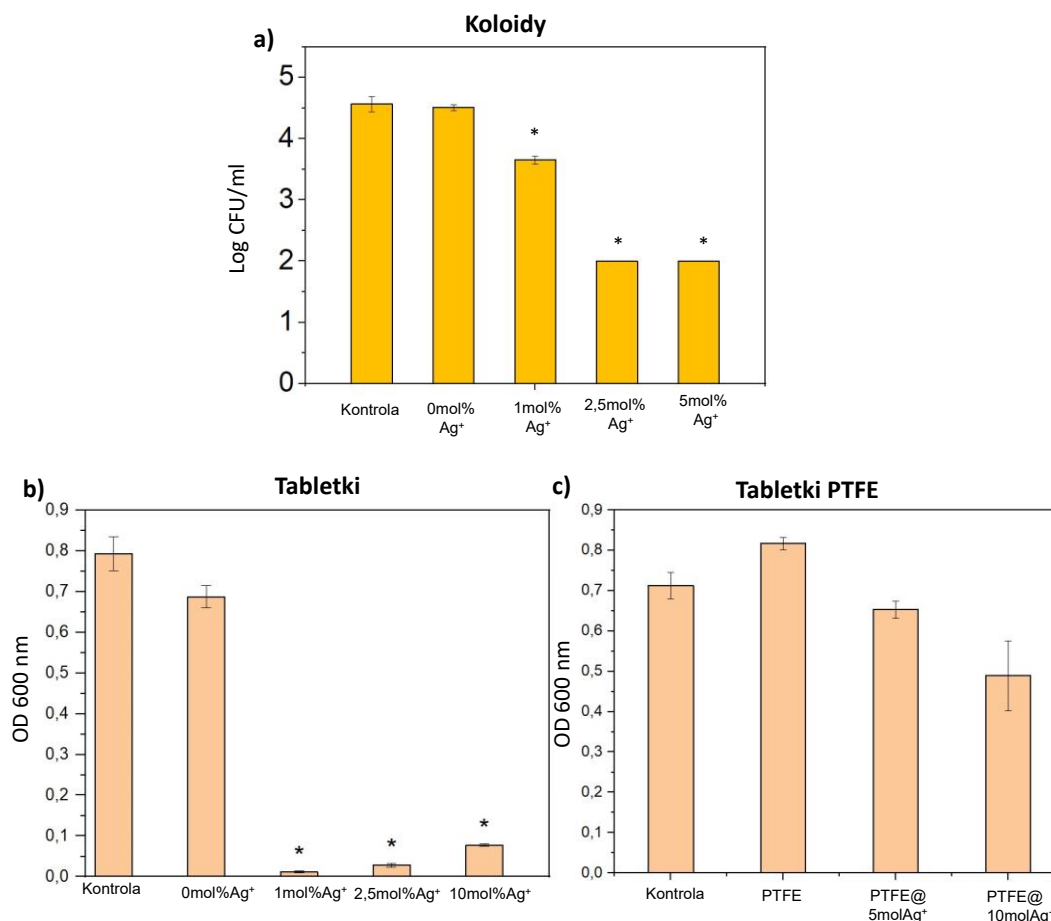
Druga seria materiałów, Zn²⁺/Sr²⁺:HAp_Si została wytworzona przez mgr Justynę Rewak-Soroczyńską i obejmowała związki, które różniły się zawartością cynku i ilością grup krzemianowych (SiO₄), które wprowadzono w miejsce grup fosforanowych (PO₄³⁻), natomiast po określeniu czystości materiałów i wstępnych testach mikrobiologicznych do właściwej części badań wybrano 4 materiały z czterema grupami SiO₄ różniące się od siebie zawartością cynku (0; 0,5; 1 i 3,5 mol%) oraz dodatkowo materiał z pięcioma grupami SiO₄ zawierający 3,5 mol% cynku. Domieszka strontu była jednakowa we wszystkich materiałach (0,2%) i była wprowadzona w celu polepszenia rozpuszczalności materiału. Apatyty z tej serii badano w formie zawiesin koloidalnych i prasowanych tabletek, natomiast pomysł na wytworzenie takich materiałów wynikał z chęci sprawdzenia czy modyfikowanie apatyty domieszkowanego jonami cynku przez substytucję grup fosforanowych grupami krzemianowymi wpływa na jego aktywność biologiczną. Badania nad apatytami krzemianowymi pozostają w kręgu zainteresowań badawczych grupy Profesora Rafała J. Wiglusza, do której należy mgr Justyna Rewak-Soroczyńska, czego owocem jest Patent (Pat.242895) potwierdzający aktywność apatytów krzemianowych domieszkowanych jonami srebra wobec patogennych grzybów. Wyniki badań wstępnych dotyczących materiałów z serii Zn²⁺/Sr²⁺:HAp_Si zostały opublikowane (Rewak-soroczynska et al. 2022).

Trzecią badaną serią były materiały Zn²⁺/Cu²⁺:HAp domieszkowane i współdomieszkowane jonami cynku i miedzi. Celem wytworzenia tej serii było sprawdzenie jak zmieniają się właściwości fizykochemiczne i biologiczne materiałów współdomieszkowanych w porównaniu z materiałami domieszkowanymi tylko jednym z jonów. W tym przypadku zbadano, podobnie jak wcześniej, koloidy i tabletki, natomiast wprowadzono jeszcze jedną formę: hydrożel, który dodawano do hodowli bakteryjnych w postaci pociętych na równe kawałki fragmentów lub eluatów z hydrożeli, czyli roztworów

powstałych przez wytrząsanie hydrożelu w soli fizjologicznej. Głównym celem przygotowania eluatów było sprawdzenie czy wzrost i przeżywalność bakterii będzie inna kiedy mają kontakt bezpośredni z nanocząstkami niż kiedy czynnikiem aktywnym są jedynie uwolnione z hydrożelu jony. Opublikowana już praca z tej części badań obejmuje obszerną charakterystykę fizykochemiczną poszczególnych form materiałów oraz oprócz badań mikrobiologicznych opisuje też cytotoksyczność badanych nanomateriałów (Sobierajska et al. 2021a).

Wymienione powyżej opublikowane prace zawierają badania mikrobiologiczne prowadzone z wykorzystaniem różnych szczepów bakteryjnych, natomiast w niniejszej rozprawie zostaną przedstawione i omówione jedynie te dotyczące *P. aeruginosa*. W większości przypadków badania właściwości antybakteryjnych testowanych nanomateriałów wykonywano określając liczebność bakterii w soli fizjologicznej w obecności nanomateriałów poprzez wyznaczenie wartości CFU/ml. Wyniki prezentowano w pracach jako logCFU/ml i odnoszono do kontroli nie traktowanej badanymi apatytami. Oczekiwany rezultatem była redukcja liczebności bakterii wyrażana w prezentowanych poniżej wynikach jako rzędy redukcji w odniesieniu do kontroli, gdzie 1-rząd to poziom redukcji wykładnika potęgi dziesiętnej w CFU/ml lub w przypadku stosowania logCFU/ml będzie to po prostu redukcja o 1-log.

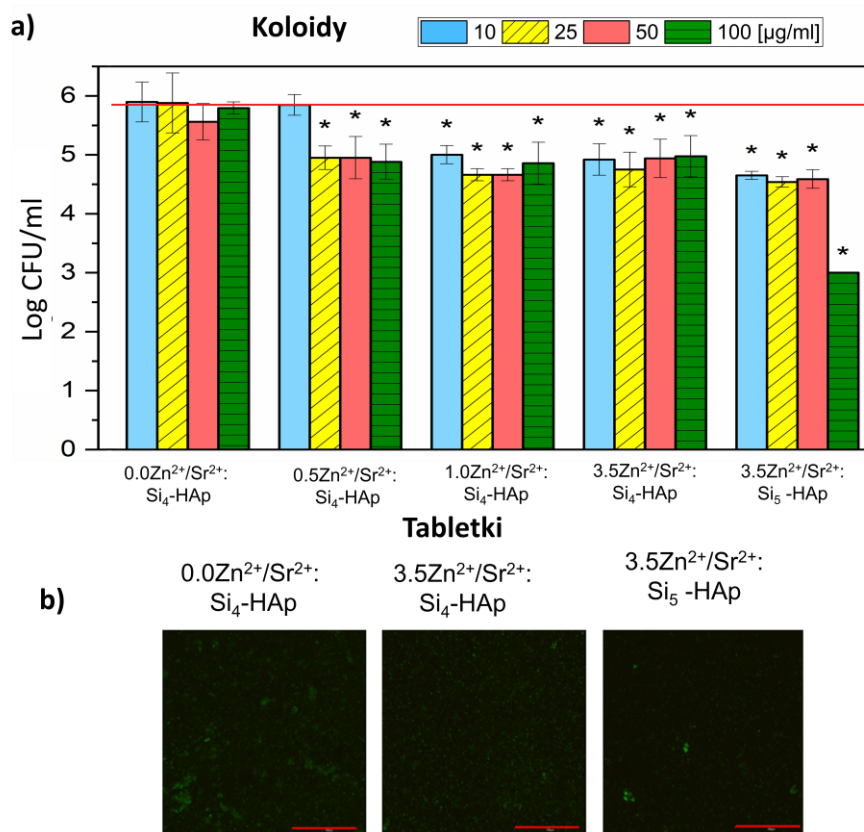
W przypadku jonów srebra (**Rycina 38.**) materiały z serii $\text{Ag}^+:\text{HAp}$, szczególnie te domieszkowane 2,5 mol% i 5 mol% jonów Ag^+ , powodowały spadek liczebności bakterii w roztworze soli fizjologicznej o ponad 2-log w przypadku materiałów domieszkowanych 2,5 i 5mol% jonów Ag^+ , natomiast w przypadku materiału o niższej domieszce (1%) obserwowano spadek liczebności bakterii o około 1-log. Warto podkreślić, że w przypadku tych materiałów do badań wybrano jedynie stężenie apatyty równe 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i skrócono czas inkubacji hodowli w obecności koloidów do 2 h, ponieważ wyższe stężenia materiału oraz dłuższy czas kontaktu skutkowały całkowitą redukcją CFU/ml bakterii w soli fizjologicznej i nie było możliwości zaobserwowania różnic w aktywności antybakteryjnej poszczególnych materiałów. W przypadku tej serii obserwowano również znaczne hamowanie wzrostu bakterii w podłożu hodowlanym LB w obecności wszystkich materiałów domieszkowanych jonami srebra, natomiast w przypadku kompozytów PTFE i apatyty (seria PTFE@ $\text{Ag}^+:\text{HAp}$) nie wykazano już takiej aktywności.



Rycina 38. Zestawienie wyników badania aktywności antybakteryjnej różnych form apatytów domieszkowanych jonami srebra: a) wpływ obecności nanocząstek w postaci zawiesiny koloidalnej na liczebność *P. aeruginosa* ATCC 27852 w soli fizjologicznej; b) wpływ obecności tabletek na wzrost bakterii w podłożu hodowlanym; c) wpływ obecności kompozytów PTFE@Ag⁺:HAp na wzrost bakterii w podłożu hodowlanym (Targonska et al. 2020)

W przypadku drugiej badanej serii Zn²⁺/Sr²⁺:HAp_Si (**Rycina 39.**) dodawanej w postaci koloidów odnotowano spadek liczebności bakterii w roztworze soli fizjologicznej o około 1-log dla wszystkich materiałów domieszkowanych jonami cynku, za wyjątkiem materiału zawierającego 0,5 mol% jonów Zn²⁺ w stężeniu 10 µg/ml, dla którego nie odnotowano różnicy w porównaniu z kontrolą. Większy spadek (o prawie 3 -log) odnotowano w przypadku materiału zawierającego 3,5 mol% jonów Zn²⁺ i modyfikowanego 5 grupami krzemianowymi, ale efekt ten był widoczny jedynie przy najwyższym z badanych stężeń – 100 µg/ml. W dalszej części badań nad tą serią wykorzystano jedynie materiał bez dodatku jonów cynku oraz materiały z jego najwyższą zawartością (3,5mol%) różniące się ilością grup krzemianowych (4 lub 5). Podczas inkubacji hodowli bakteryjnych w bulionie odżywczym w obecności tabletek wykonanych z danych materiałów nie zaobserwowano

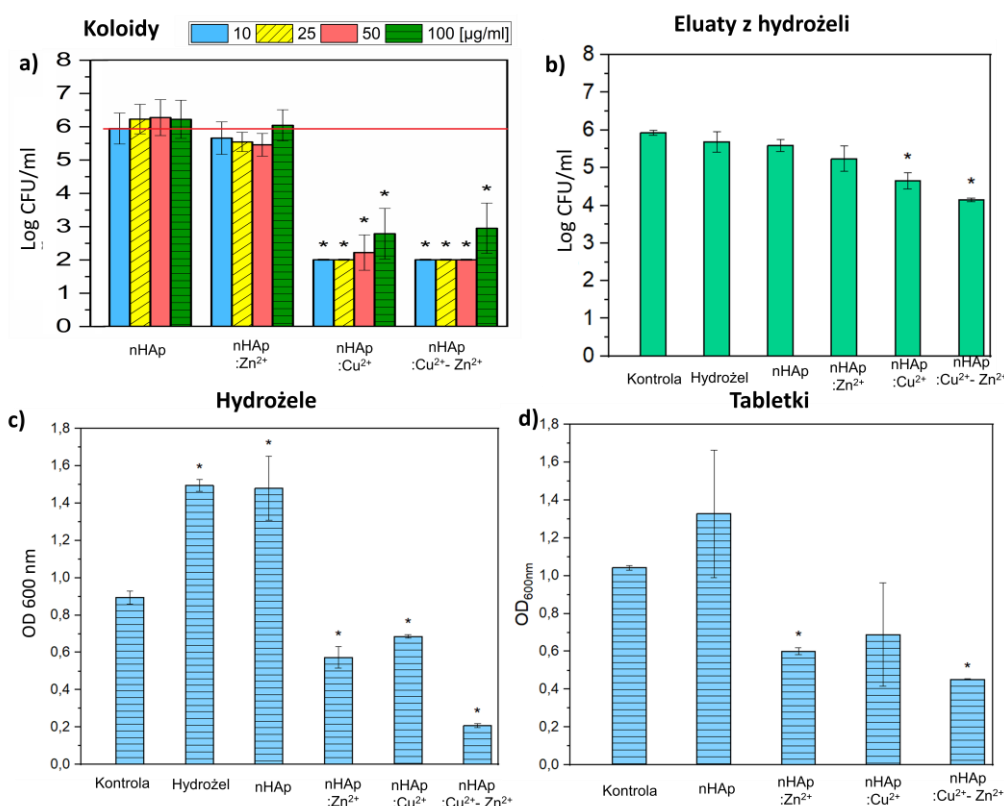
spadku zmętnienia hodowli w odniesieniu do kontroli, a mimo to utworzone na powierzchni tabletek biofilmy bakteryjne były trudne do zwizualizowania, co można zauważyć na **Rycinie 39.b**.



Rycina 39. Zestawienie wyników badania aktywności antybakteryjnej różnych form apatytów z serii Zn²⁺/Sr²⁺:HAp_Si: a) wpływ obecności nanocząstek w postaci zawiesiny koloidalnej na liczebność *P. aeruginosa* ATCC 27853 w soli fizjologicznej (czerwona linia wskazuje liczebność bakterii w kontroli) b) biofilm bakteryjny na powierzchni tabletek (Rewak-soroczynska et al. 2022)

W kolejnym etapie testowano serię apatytów, domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami miedzi i cynku (Zn²⁺/Cu²⁺:HAp). Podczas inkubacji bakterii w soli fizjologicznej w obecności zawiesin koloidalnych nanocząstek obserwowano znaczący spadek liczebności bakterii o około 4-log po dodaniu materiałów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami miedzi (**Rycina 40.**). Materiał z dodatkiem cynku (nHAP:Zn²⁺) nie powodował spadku liczebności w porównaniu z kontrolą. W przypadku materiałów z dodatkiem miedzi spadek był widoczny dla wszystkich badanych stężeń. Dodatek eluatów z hydrożeli zamiast soli fizjologicznej spowodował spadek liczebności bakterii o około 1-log i podobnie jak w przypadku koloidów było to obserwowane tylko dla materiałów z dodatkiem miedzi. Analizując wzrost bakterii w

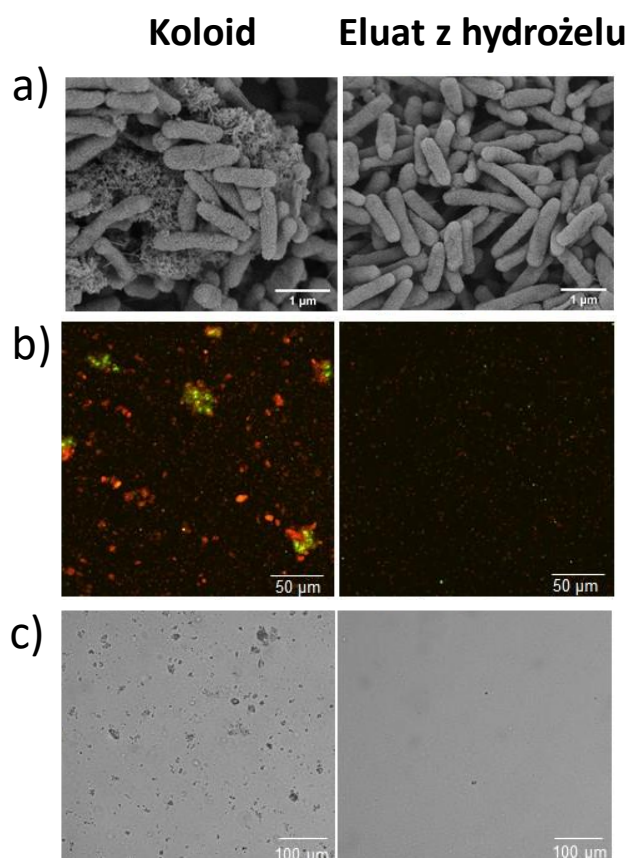
podłożu hodowlanym LB w obecności hydrożeli i tabletek (**Rycina 40.c i d**) można zaobserwować stymulację wzrostu bakterii w obecności czystego hydrożelu (bez apatyty) i hydrożelu z dodatkiem niedomieszkowanego apatyty. Podobną tendencję widać też w przypadku tabletki wytworzonej z nHAp, natomiast ze względu na duże odchylenie standardowe nie uznaje się istotności statystycznej tego wyniku. Ciekawą obserwacją jest fakt, że zarówno w przypadku hydrożeli jak i tabletek aktywność antybakteryjną wykazuje również materiał domieszkowany cynkiem, co nie miało miejsca w przypadku koloidów i eluatów. Najwyższą aktywność w obu przypadkach wykazano dla nanomateriału współdomieszkowanego jonami miedzi i cynku.



Rycina 40. Zestawienie wyników badania aktywności antybakteryjnej różnych form apatyty z serii Zn²⁺/Cu²⁺:HAp a) wpływ obecności nanocząstek w postaci zawiesiny koloidalnej na liczebność *P. aeruginosa* w soli fizjologicznej; b) wpływ obecności eluatów z hydrożeli na liczebność bakterii w soli fizjologicznej; c) wpływ obecności hydrożeli na wzrost bakterii w podłożu hodowlanym; d) wpływ obecności tabletek na wzrost bakterii w podłożu hodowlanym (Sobierajska et al. 2021a)

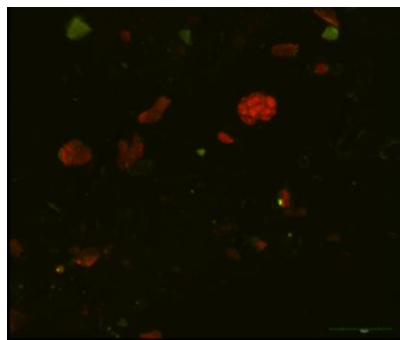
Obserwowana różnica w aktywności antybakteryjnej formy koloidowej i eluatów z hydrożeli była zastanawiająca biorąc pod uwagę fakt, że doświadczenie zostało zaprojektowane w taki sposób, żeby stężenie apatyty w koloidzie (dla wersji 100 µg/ml) odpowiadało stężeniu apatyty w hydrożelu, co zostało potwierdzone przez sprawdzenie

ilości uwalnianych jonów miedzi i cynku metodą ICP. Uzyskane wyniki potwierdziły, że ilość uwolnionych jonów z obu form jest porównywalna, co szerzej opisano w publikacji (Sobierajska et al. 2021a). Dlatego dla tej serii wykonano również analizę mikroskopową hodowli bakteryjnych inkubowanych w obecności koloidów i eluatów z hydrożeli w soli fizjologicznej dla reprezentatywnego materiału (nHAp:Cu²⁺-Zn²⁺) z zastosowaniem wybranych metod wizualizacji. Hodowle bakteryjne inkubowano w obecności różnych form materiału oraz obrazowano za pomocą mikroskopii świetlnej jasnego pola, SEM i CLSM. Uzyskane obrazy mikroskopowe SEM pokazały, że w przypadku badanych koloidów komórki bakteryjne pozostają w bezpośrednim kontakcie z nanocząstkami i ich aglomeratami, czego nie obserwuje się w przypadku eluatów z hydrożeli (**Rycina 41.a**). Obserwacje te zostały potwierdzone w mniejszym powiększeniu wykorzystując mikroskopię konfokalną z barwieniem LIVE/DEAD (**Rycina 41.b**) oraz mikroskopię jasnego pola (**Rycina 41.c**).



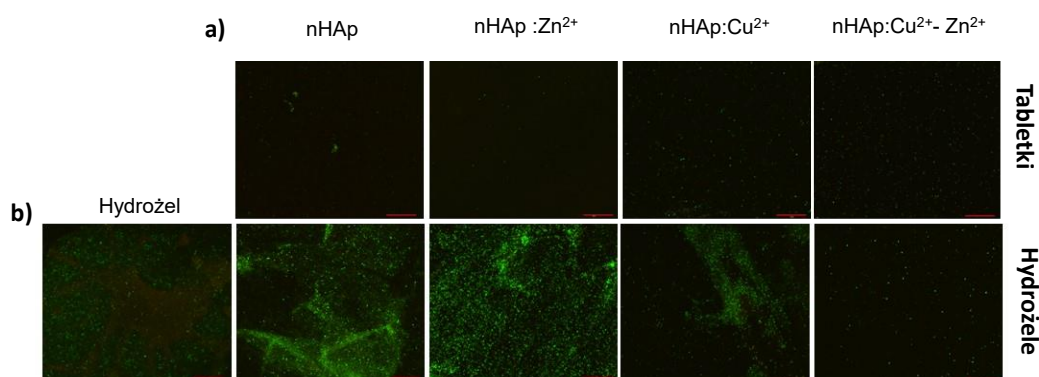
Rycina 41. Analiza mikroskopowa oddziaływań *P. aeruginosa* ATCC 2785 z koloidami nHAp:Cu²⁺-Zn²⁺ a) SEM (wyk. dr Damian Szymański, INTiBS PAN); b) CLSM z barwieniem LIVE/DEAD (wyk. własne); c) jasne pole (wyk. własne) (Sobierajska et al. 2021a)

Należy podkreślić, że większe, kolorowe skupiska o bardzo dużej intensywności widoczne w obrazie mikroskopii konfokalnej to aglomeraty hydroksyapatytu, a nie skupiska bakterii. Fluorescencję hydroksyapatytu po wzbudzeniu w mikroskopie konfokalnym opisano szerzej w innej publikacji współautorskiej mgr Justyny Rewak-Soroczyńskiej (Targonska et al. 2022). Przykładowy obraz mikroskopowy potwierdzający to zjawisko jest zamieszczony poniżej (**Rycina 42.**).



Rycina 42. Obraz mikroskopowy CLSM powierzchni implantu na bazie polilaktydu (poly(L-lactide-co-D,L-lactide) z dodatkiem hydroksyapatytu (Targonska et al. 2022)

Kontynuując badania nad serią $Zn^{2+}/Cu^{2+}:HAp$ oprócz pomiaru gęstości optycznej hodowli inkubowanych w obecności materiałów wykonano również zdjęcia mikroskopowe (CLSM, barwienie LIVE/DEAD) powierzchni tabletek i hydrożeli. Można zaobserwować, że w przypadku tabletek biofilmy na powierzchni wyglądają podobnie jak w przypadku serii $Zn^{2+}/Sr^{2+}:HAp_Si$. Z kolei w przypadku hydrożeli liczebność mikroorganizmów na powierzchni prób jest nieporównywalnie większa, co zostało dodatkowo potwierdzone za pomocą pomiaru intensywności fluorescencji w programie ImageJ. Analizy obrazów zebrane w **Tabeli 15.** wskazują, że gęstość biofilmów bakteryjnych jest w przypadku hydrożeli nawet dwukrotnie wyższa niż w przypadku tabletek, co jest szczególnie widoczne w obecności czystego nHAp oraz materiału z dodatkiem cynku. W przypadku apatytu domieszkowanego miedzią oraz współdomieszkowanego oboma jonami różnice nie są aż tak duże. Warto również podkreślić różnicę w ilości biofilmu na powierzchni poszczególnych hydrożeli, gdzie na podstawie wartości z **Tabeli 15.** można zauważyć znaczną redukcję biofilmu na powierzchni materiałów z dodatkiem miedzi.

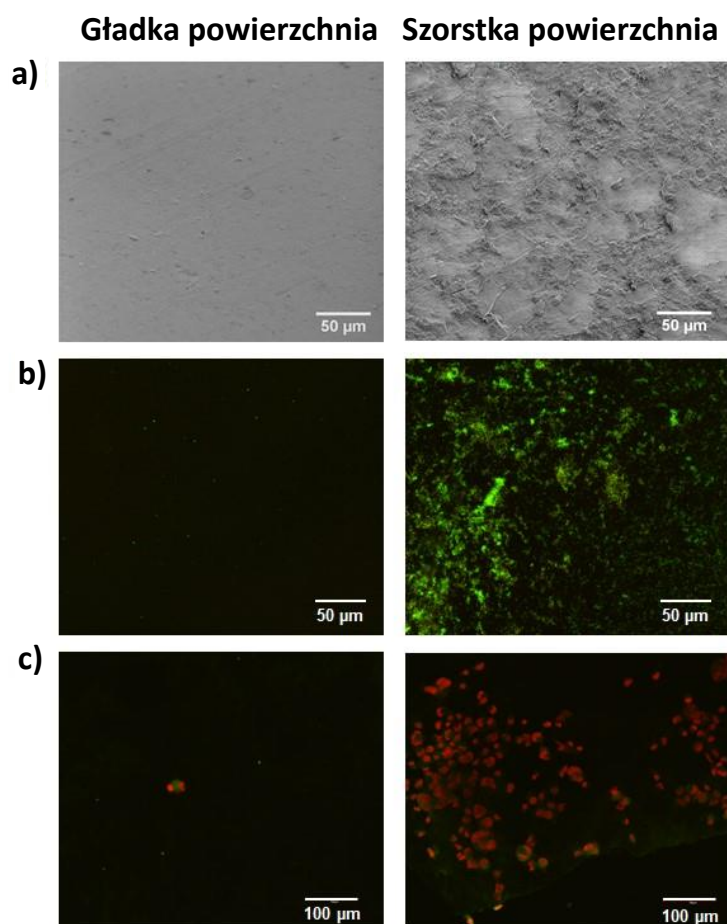


Rycina 43. Biofilm *P. aeruginosa* ATCC 27853 utworzony na ich powierzchni a) tabletek z serii $Zn^{2+}/Sr^{2+}:HAp_Si$ (Rewak-soroczynska et al. 2022), b) tabletek oraz c) hydrożeli z serii $Zn^{2+}/Cu^{2+}:HAp$ (Sobierajska et al. 2021a)

Tabela 15. Porównanie intensywności obrazów mikroskopowych biofilmów na powierzchni tabletek i hydrożeli wykonanych z materiałów z serii $Zn^{2+}/Cu^{2+}:HAp$ (wykonano w programie ImageJ)

	Tabletki	Hydrożele
Matryca	-	15,96 ±3,73
nHAp	8,75±1,85	17,96±9,01
nHAp:Zn²⁺	9,7±1,86	17,05±8,70
nHAp:Cu²⁺	7,79±1,69	10,31±4,83
nHAp:Cu²⁺-Zn²⁺	7,14±2,57	8,36±1,89

W celu sprawdzenia czy zmniejszona adhezja obserwowana na powierzchni tabletek jest związana z właściwościami chemicznymi materiału czy wynika jedynie z faktu, że ich powierzchnia jest gładka, przeprowadzono dodatkowy eksperyment. Tabletkę ($nHAp: Zn^2$) przełamano na trzy części, tak żeby odsłonić jej porowatą i szorstką wewnętrzną strukturę. Jedną część tabletki wykorzystano do wykonania obrazów SEM w celu obserwacji topografii obu powierzchni w dużym powiększeniu. Drugą część wykorzystano w badaniach mikrobiologicznych, natomiast trzecią część w hodowli komórek eukariotycznych (linia osteoblastów mysich 7F2). Wyniki uzyskane dla obu modeli badawczych potwierdziły, że adhezja komórek zarówno bakteryjnych i eukariotycznych do wierzchniej warstwy tabletki jest słaba, natomiast nie wynika to z właściwości chemicznych materiałów, ale z topografii powierzchni (**Rycina 44.**). Wskazuje na to fakt, że na szorstkim fragmencie zaobserwowano wiele komórek. Podkreślić należy również to, że w przypadku *P. aeruginosa* nie zaobserwowano martwych komórek w polu widzenia, natomiast w przypadku osteoblastów większość zadherowanych komórek była martwa (kolor czerwony).



Rycina 44. Porównanie wpływu struktury powierzchni tabletek wykonanych z hydroksyapatytu z serii $Zn^{2+}/Cu^{2+}:HAp$ ($nHAp: Zn^{2+}$) na adhezję bakterii oraz komórek eukariotycznych: a) obraz SEM (wyk. dr Damian Szymański, INTiBS PAN), b) CLSM z barwieniem LIVE/DEAD obrazujący adhezję komórek *P. aeruginosa*, (wyk. własne) c) CLSM z barwieniem LIVE/DEAD obrazujący adhezję komórek linii osteoblastów mysich 7F2 (wyk. mgr Nicole Nowak, INTiBS PAN) (Sobierajska et al. 2021a)

IV.2.2 Badania aktywności biologicznej hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+}

Ostatnią część rozprawy doktorskiej stanowiły obszernie badania nad aktywnością biologiczną hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} . Motywacją do podjęcia tego zagadnienia był fakt częstego wykorzystywania jonów lantanowców jako domieszek w nowoprojektowanych materiałach o potencjalnym zastosowaniu medycznym. Jon Eu^{3+} jest szczególnie często wprowadzany do matrycy hydroksyapatytowej ze względu na wysoką zdolność do emisji luminescencji oraz dodawany jako współdomieszka do nanomateriałów zawierających inne kationy o określonej aktywności biologicznej. Mgr Justyna Rewak-Soroczyńska jest współautorką

dwóch publikacji, w których dokonano oceny wstępnej takich materiałów (Szyszka et al. 2020; Sobierajska et al. 2021b). Ponadto w badaniach prowadzonych przez dr Katarzynę Szyszkę z INTiBS PAN (Zespół Profesora Wiglusza) wykazano, że w materiałach współdomieszkowanych jonami europu i miedzi zachodzą ciekawe zjawiska fizyczne, takie jak wygaszanie luminescencji europu (Szyszka et al. 2021). Z tego względu zdecydowano się również zbadać aktywność biologiczną takich materiałów i sprawdzić czy dodatek jonów europu może modyfikować działanie nanomateriałów domieszkowanych jonami miedzi. Uzyskane wyniki zostaną zaprezentowane i szczegółowo omówione poniżej gdyż są one jeszcze na etapie dopracowywania i przygotowywania do publikacji. Ponadto, podkreślić należy, że tematyka prowadzonych badań wpisuje się w intensywnie rozwijający się trend badań nad materiałami współdomieszkowanymi (Yilmaz et al. 2019).

W tej części rozprawy badano nanohydroksyapatyty zmodyfikowane przez wprowadzenie jonów miedzi (Cu^{2+}) i europu (Eu^{3+}) w ilości 2 mol% i 5 mol% w różnych kombinacjach. Hydroksyapatyty były otrzymywane dwiema metodami syntezy: strąceniową i hydrotermalną. Materiały otrzymane metodą strąceniową oznaczono w dalszej części rozprawy literą **P** – *precipitation*, natomiast materiały z serii hydrotermalnej literą **H** – *hydrothermal*. Jak opisano we **WSTĘPIE** metoda syntezy istotnie wpływa na właściwości fizykochemiczne otrzymanych materiałów, co z kolei może przekładać się bezpośrednio na właściwości biologiczne związków. W kolejnym etapie badań porównywano więc aktywność nanomateriałów otrzymanych obiema metodami i starano się sprawdzić czy metoda syntezy faktycznie istotnie zmienia właściwości biologiczne apatytów. Taka wiedza pozwoliłaby projektować nanomateriały o potencjalnie wyższej aktywności.

Dr Katarzyna Szyszka zsyntetyzowała 18 związków o strukturze hydroksyapatytu: 9 otrzymano metodą strąceniową i 9 metodą hydrotermalną. Wszystkie materiały zostały scharakteryzowane fizykochemicznie oraz przeprowadzono na nich podstawowe badania aktywności antybakteryjnej i ocenę cytotoksyczności wobec erytrocytów (test hemolizy i ocenę morfologii krwinek). Poniżej zestawiono wyniki doświadczeń wykonanych dla materiałów z najwyższą zawartością jonów (5 mol%) oraz matryce apatytowe niedomieszkowane (8 nanomateriałów), natomiast wyniki uzyskane dla pozostałych nanomateriałów (2mol% oraz współdomieszkowanych 2mol% i 5mol% jonów Eu^{3+} i Cu^{2+}) zamieszczono w **MATERIAŁACH DODATKOWYCH**.

W pierwszym etapie badań oznaczono za pomocą metody ICP rzeczywistą zawartość jonów europu i miedzi w nanomateriałach. Wyniki przedstawione w **Tabeli 16.** zostały przeliczone na ilość jonów [μg] w 10 mg hydroksyapatytu, ze względu na fakt, że właśnie takie stężenie (10 mg/ml) materiału zostało wybrane do wszystkich doświadczeń prezentowanych w tej części rozprawy, co zostało poprzedzone badaniami wstępnymi z wykorzystaniem innych stężeń apatyty.

Tabela 16. Stężenie jonów miedzi i europu wbudowanych oraz uwolnionych z nanohydroksyapatytów do mediów hodowlanych MOPS i DMEM (P – seria strąceniową, H- seria hydrotermalna)

	Hydroksyapatyt	Eu ³⁺ [$\mu\text{g}/10$ mg]	Cu ²⁺ [$\mu\text{g}/10\text{mg}$]		
Stężenie jonu w nanomateriale	P_5mol%Eu ³⁺	1401	-		
	H_5mol%Eu ³⁺	1300	-		
	P_5mol%Cu ²⁺	-	655		
	H_5mol%Cu ²⁺	-	516		
	P_5mol%Eu ³⁺ , 5mol%Cu ²⁺	1418	618,3		
	H_5mol%Eu ³⁺ , 5mol%Cu ²⁺	567,8	90,6		
	Hydroksyapatyt	Eu ³⁺ [mg/l]	%	Cu ²⁺ [mg/l]	%
Stężenie jonów uwolnionych w MOPS [mg/l] oraz % uwolnionego jonu	P_5mol%Eu ³⁺	5,30	0,38	-	-
	H_5mol%Eu ³⁺	3,11	0,24	-	-
	P_5mol%Cu ²⁺	-	-	20,0	3,05
	H_5mol%Cu ²⁺	-	-	40,5	7,85
	P_5mol%Eu ³⁺ , 5mol%Cu ²⁺	3,66	0,26	26,6	4,30
	H_5mol%Eu ³⁺ , 5mol%Cu ²⁺	3,87	0,68	10,4	11,48
Stężenie jonów uwolnionych w DMEM [mg/l] oraz % uwolnionego jonu	P_5mol%Eu ³⁺	6,81	0,49	-	-
	H_5mol%Eu ³⁺	23,6	1,82	-	-
	P_5mol%Cu ²⁺	-	-	73,6	11,24
	H_5mol%Cu ²⁺	-	-	99,4	19,26
	P_5mol%Eu ³⁺ , 5mol%Cu ²⁺	4,90	0,35	92,0	14,88
	H_5mol%Eu ³⁺ , 5mol%Cu ²⁺	21,4	3,77	27,6	30,46

Można zaobserwować, że w przypadku materiałów domieszkowanych jedynie dla jonów Eu^{3+} rzeczywiste stężenie wbudowanych jonów jest zbliżone w materiałach z serii P i H, podobnie wygląda sytuacja w przypadku materiałów domieszkowanych jedynie dla jonów Cu^{2+} . Materiał współdomieszkowany z serii P ($\text{P}_{5\text{mol}\% \text{Eu}^{3+}, 5\text{mol}\% \text{Cu}^{2+}}$) zawiera podobną ilość jonów europu i miedzi jak materiały zawierające tylko jeden z jonów, natomiast materiał współdomieszkowany z serii H znacznie różni się stężeniem jonów od pozostałych związków i zawiera średnio 2,5x mniej jonów Eu^{3+} i średnio 6,5x mniej jonów Cu^{2+} .

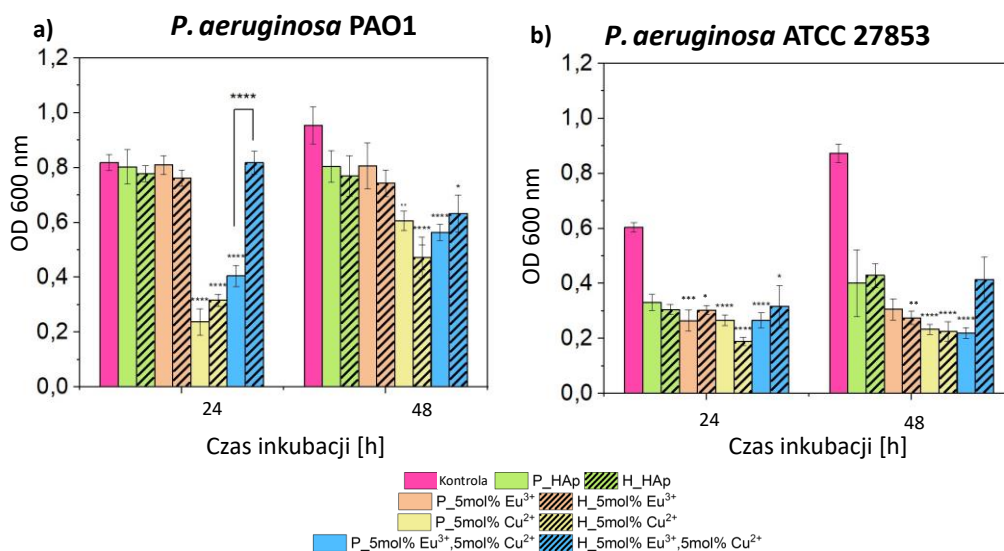
Niezwykle istotnym aspektem analizy uzyskanych apatytów w tym przypadku było również oznaczenie uwalniania jonów metali z matryc w mediach MOPS (do hodowli bakterii) oraz DMEM (do hodowli komórek eukariotycznych). Miało to na celu sprawdzenie czy ewentualne różnice w aktywności biologicznej względem bakterii i komórek eukariotycznych nie są spowodowane jedynie nierównomiernym uwalnianiem jonów, co mogłoby wynikać z właściwościami fizykochemicznymi poszczególnych związków i ich oddziaływaniami ze składnikami mediów hodowlanych. W **Tabeli 16.** porównano stężenia jonów [mg/l], które w ciągu 24 h zostały uwolnione z hydroksyapatytów do mediów hodowlanych MOPS i DMEM. Ze względu na to, że rzeczywiste wartości wbudowanych domieszek były różne i często znacznie odbiegały od zakładanej wartości mol % zdecydowano się przedstawić ilość uwolnionych jonów również jako wartość procentową w odniesieniu do zawartości domieszki w matrycy apatytowej, którą potraktowano jako 100%.

W badaniach wykazano, że stężenie uwolnionych jonów jest znacznie wyższe w medium do hodowli komórek eukariotycznych DMEM, niż w pożywce do hodowli bakterii. Można zauważyć, że w pożywce MOPS ilość uwolnionego europu jest zbliżona niezależnie od badanego materiału (3,11-5,30 mg/l) i stanowi mniej niż 1% w odniesieniu do ilości wbudowanej. Co ciekawe, materiał z najmniejszą zawartością europu uwalnia go procentowo najwięcej. Natomiast w przypadku jonów Cu^{2+} ilość uwolnionych kationów waha się od 10,4 do 40,5 mg/l, co stanowi od 3,05 do 11,48% w odniesieniu do ilości wbudowanej. Paradoksalnie, materiał zawierający najmniej miedzi ($\text{H}_{5\text{mol}\% \text{Eu}^{3+}, 5\text{mol}\% \text{Cu}^{2+}}$) uwalnia jej procentowo najwięcej. Ponadto, w przypadku jonów miedzi można zauważyć, że procentowo uwalnia się jej więcej z materiałów otrzymywanych metodą hydrotermalną, natomiast ilościowo więcej jonów (40,5 mg/l) uwalnia się z materiału $\text{H}_{5\text{mol}\% \text{Cu}^{2+}}$ niż z materiału $\text{P}_{5\text{mol}\% \text{Cu}^{2+}}$ (20,0 mg/l) w przypadku materiału domieszkowanego jedynie miedzią. Z kolei w przypadku materiału

współdomieszkowanego więcej miedzi uwalnia się z materiału P_5mol%Eu³⁺,5mol%Cu²⁺ (26,6 mg/l) niż z materiału H_5mol%Eu³⁺,5mol%Cu²⁺ (10,4 mg/l), co prawdopodobnie jest związane z niską zawartością kationów miedzi w materiale z serii H. W medium DMEM można z kolei zauważyć różnice w ilościowym uwalnianiu jonów europu (4,90-21,4 mg/l), co przekłada się na różnice procentowe (0,35-3,77%). Można zauważyć, że europ lepiej uwalnia się z materiałów otrzymanych metodą hydrotermalną, zarówno w przypadku tych domieszkowanych jedynie europem, jak i współdomieszkowanych oboma kationami. Można także zauważyć, że materiał z najmniejszą wbudowaną domieszką europu uwalnia najwięcej tego jonu (ilościowo i procentowo). W przypadku miedzi obserwuje się podobną tendencję jak w MOPS i związek z najmniejszą wbudowaną ilością Cu²⁺ uwalnia jej ilościowo najmniej, ale najwięcej procentowo. Można również zauważyć, że materiały otrzymane hydrotermalnie uwalniają procentowo więcej miedzi, podobnie jak w MOPS. Otrzymane wyniki sugerują, że ilość uwolnionych jonów nie zawsze jest wprost proporcjonalna do zawartości jonów w materiale, a wartości przedstawione w **Tabeli 16.** muszą być brane pod uwagę przy analizie aktywności antybakteryjnej i cytotoksyczności badanych materiałów.

Kolejnym etapem po analizie uwalniania jonów z testowanych nanomateriałów było badanie ich aktywności antybakteryjnej wobec szczepów *P. aeruginosa* PAO1 oraz ATCC27853. Bakterie hodowano przez 24 i 48h w obecności 10 mg/ml apatytów zarówno bez domieszek jak i zawierających wszystkie możliwe kombinacje jonów w ilości 5 mol% w podłożu MOPS o pH 6,5. Uzyskane wyniki przedstawiono na **Rycinie 45.**

Niezwykle ważnym na tym etapie było sprawdzenie czy pomiędzy seriami P i H występuje różnica w aktywności biologicznej. Z tego też względu istotne statystycznie różnice pomiędzy odpowiadającymi sobie materiałami z obu serii zaznaczono na wykresie (**Rycina 45.**), natomiast pozostałe dane uzyskane z analizy statystycznej oraz dla pozostałych materiałów zawierających 2 mol% domieszek zamieszczono w Materiałach dodatkowych (**Tabela S.5.** Rycina X).



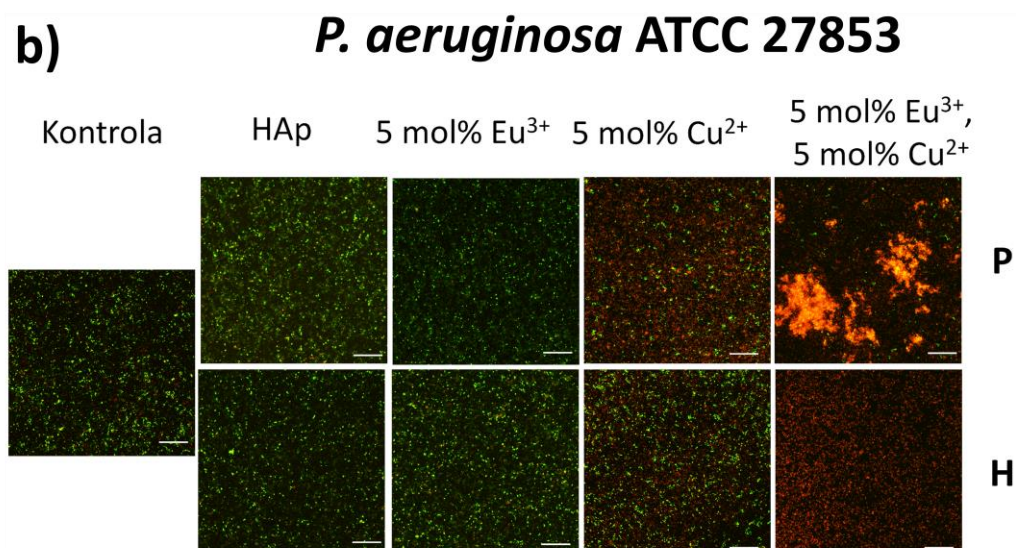
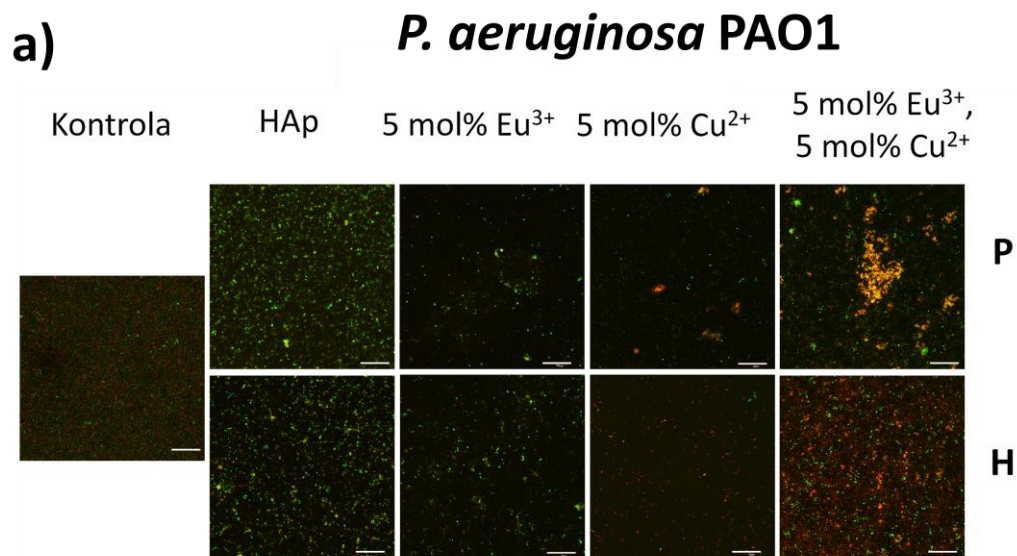
Rycina 45. Aktywność antybakteryjna nanomateriałów domieszkowanych i współdomieszkowanych Eu^{3+} i Cu^{2+} wobec: a) *P. aeruginosa* PAO1 i b) *P. aeruginosa* ATCC 27853. (P – seria strąceniową, H – seria hydrotermalna). Analiza istotności statystycznej otrzymanych wyników w porównaniu z kontrolą wzrostu zamieszczono w Materiałach dodatkowych (**Tabela S.5.**).

W przypadku szczepu PAO1 po pierwszych 24 h hodowli obserwowano istotne statystycznie zmniejszenie gęstości optycznej hodowli w porównaniu z kontrolą dla następujących związków: $\text{P}_5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$, $\text{H}_5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$, oraz $\text{P}_5\text{mol}\%\text{Eu}^{3+}, 5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$. Pozostałe materiały nie powodowały istotnego statystycznie ograniczenia wzrostu bakterii. Największe różnice statystyczne pomiędzy seriami zauważono w przypadku szczepu PAO1 w obecności materiałów współdomieszkowanych: $\text{P}_5\text{mol}\%\text{Eu}^{3+}, 5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$ i $\text{H}_5\text{mol}\%\text{Eu}^{3+}, 5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$. W przypadku szczepu ATCC 27853 wykazano z kolei istotnie statystycznie niższe OD_{600} w obecności: $\text{P}_5\text{mol}\%\text{Eu}^{3+}$, $\text{H}_5\text{mol}\%\text{Eu}^{3+}$, $\text{P}_5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$, $\text{H}_5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$, $\text{P}_5\text{mol}\%\text{Eu}^{3+}, 5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$, $\text{H}_5\text{mol}\%\text{Eu}^{3+}, 5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$. Po 48 h hodowli szczepu PAO1 istotne statystycznie różnice w porównaniu z kontrolą wykazano w obecności: $\text{P}_5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$, $\text{H}_5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$, $\text{P}_5\text{mol}\%\text{Eu}^{3+}, 5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$ i $\text{H}_5\text{mol}\%\text{Eu}^{3+}, 5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$. W przypadku szczepu ATCC 27853 po 48 h wykazano istotność statystyczną w obecności $\text{H}_5\text{mol}\%\text{Eu}^{3+}$, $\text{P}_5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$, $\text{H}_5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$, i $\text{P}_5\text{mol}\%\text{Eu}^{3+}, 5\text{mol}\%\text{Cu}^{2+}$.

Na podstawie uzyskanych wyników można wyciągnąć kilka wniosków. W przypadku szczepu PAO1 po 24 h hodowli można zauważyć aktywność materiałów domieszkowanych

jonami miedzi, za wyjątkiem apatyty H_5mol% Eu³⁺,5mol% Cu²⁺, co można powiązać z małą ilością wbudowanej i uwolnionej (ilościowo) miedzi. Po 48 h nie obserwuje się istotnych statystycznie różnic między seriami, ale można zauważyć, że w obecności niektórych materiałów np. P_5mol%Cu²⁺ gęstość optyczna hodowli jest dużo wyższa niż po pierwszej dobie. Może to świadczyć o adaptacji bakterii do obecności jonów miedzi w środowisku. W przypadku szczepu ATCC 27853 obserwuje się z kolei niższą gęstość optyczną hodowli inkubowanych w obecności wszystkich nanomateriałów, zarówno po 24 jak i 48-godzinach, natomiast nie wszystkie wyniki są uznawane za statystycznie istotne. Dlatego na podstawie danych z wykresu nie można mówić o antybakteryjnym efekcie wywoływanym przez niedomieszkowany apatyt, mimo że różnica w OD₆₀₀ wydaje się duża.

W przypadku pozostałych materiałów (Materiały dodatkowe, **Rycina S.9.**) zauważono więcej istotnych różnic pomiędzy seriami wobec szczepu PAO1 i generalnie materiały domieszkowane jonami Cu²⁺ z serii hydrotermalnej były bardziej aktywne, za wyjątkiem materiałów 5mol%Eu³⁺,2mol%Cu²⁺, gdzie nie obserwowano efektu hamowania wzrostu ani dla materiału z serii P, ani dla odpowiednika z serii H. Zaobserwowane różnice pomiędzy aktywnością antybakteryjną nanomateriałów syntetyzowanych metodą hydrotermalną i strąceniową są więc bezsporne, jednak na podstawie uzyskanych danych nie można dostrzec uniwersalnego wzorca z którego by one wynikały. W celu dalszej analizy różnic w aktywności antybakteryjnej zbadano również wpływ hydroksyapatytów (z domieszką 5 mol% oraz czystych matryc apatytowych) na tworzenie biofilmu bakteryjnego. Bakterie inkubowano 24-godziny w obecności nanomateriałów w formie sproszkowanej, a następnie przenoszono zawiesinę do dołków czystej płytki 96-dołkowej i poddawano inkubacji przez kolejne 24-godziny. Utworzony na dnie dołków biofilm obserwowano po wybarwieniu zestawem barwników fluorescencyjnych LIVE/DEAD. Na **Rycinie 46.** przedstawiono przykładowe obrazy z mikroskopii CLMS biofilmu *Pseudomonas* powstałego po wstępnej inkubacji bakterii z wybranymi nanomateriałami.



Rycina 46. Biofilmy *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 utworzone w studzienkach mikropłytek po preinkubacji kultur bakteryjnych z hydroksyapatytami (P - seria strąceniowa, H - seria hydrotermalna). Zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopu konfokalnego po zabarwieniu LIVE/DEAD (podziałka = 50 μm).

W uzyskanych obrazach można zauważyć, że różnice między seriami (P - strąceniową i H -hydrotermalną) są wyraźnie widoczne w przypadku obu szczepów, głównie w obecności nanohydroksyapatytu współdomieszkowanego Eu³⁺ i Cu²⁺. W wariacie strąceniowym bakterie tworzą duże agregaty, złożone zarówno z żywych, jak i martwych komórek (widoczne jako żółto-pomarańczowe). Takie zjawisko nie jest widoczne w wariacie hydrotermalnym. Intensywność fluorescencji uzyskanych obrazów przeanalizowano za pomocą programu ImageJ, a otrzymane dane zostały zebrane w **Tabeli 17**.

Tabela 17. Intensywność fluorescencji (kolor zielony, kolor czerwony, średnia intensywność) obrazów mikroskopowych biofilmów *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 wstępnie inkubowanych w obecności wybranych hydroksyapatytów domieszkowanych Eu^{3+} i Cu^{2+} (P – seria strąceniową, H – seria hydrotermalna). Na zielono wyróżniono najwyższą wartość zielonej fluorescencji (komórki żywe), na czerwono najwyższą wartość czerwonej fluorescencji (komórki martwe), natomiast kolorem niebieskim najwyższą średnią intensywność fluorescencji (wszystkie kolory). Analizę wykonano za pomocą programu ImageJ.

	<i>P. aeruginosa</i> PAO1			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		
	Zielony	Czerwony	Intensywność	Zielony	Czerwony	Intensywność
Kontrola	28,02 ±18,06	32,69 ±25,33	20,25 ±11,27	27,08 ±40,46	21,56 ±24,59	16,22 ±20,33
P_HAp	32,82 ±27,83	27,66 ±15,43	20,18 ±13,61	42,43 ±35,05	31,83 ±21,19	24,75 ±17,62
H_HAp	21,77 ±28,49	19,86 ±19,76	13,88 ±15,16	28,51 ±31,98	20,29 ±16,93	16,27 ±15,38
P_5mol%Eu^{3+}	13,61 ±14,69	13,77 ±8,44	9,13 ±7,24	28,16 ±29,61	14,90 ±11,52	14,35 ±12,93
H_5mol%Eu^{3+}	16,36 ±17,99	15,56 ±10,86	10,65 ±9,08	35,83 ±38,18	24,04 ±23,71	19,96 ±19,29
P_5mol%Cu^{2+}	14,36 ±10,74	13,61 ±12,38	9,33 ±7,28	25,89 ±32,89	43,60 ±44,38	23,16 ±22,67
H_5mol%Cu^{2+}	19,30 ±7,05	22,27 ±14,20	13,87 ±6,73	28,45 ±44,22	33,60 ±39,77	20,68 ±25,09
P_5mol%Eu^{3+},5mol%Cu^{2+}	26,02 ±28,49	27,22 ±37,93	17,75 ±20,94	27,53 ±32,99	58,66 ±72,39	28,73 ±33,65
H_5mol%Eu^{3+},5mol%Cu^{2+}	24,25 ±27,79	39,84 ±34,23	21,36 ±18,17	16,54 ±10,94	38,54 ±47,31	18,36 ±19,97

W wykonanej analizie można zauważyć, że w przypadku szczepu PAO1 różnice pomiędzy ilością żywych i martwych komórek w danej próbce są niewielkie, natomiast dominację komórek martwych w obrazie mikroskopowym wykazano w obecności materiału H_5mol% Eu^{3+} ,5mol% Cu^{2+} . Najwyższą zieloną fluorescencję odnotowano w obecności próby P_HAp, natomiast najwyższą czerwoną fluorescencję oraz najwyższą ogólną intensywność wykazano w obecności próby H_5mol% Eu^{3+} ,5mol% Cu^{2+} . W przypadku szczepu ATCC 27853 zauważono większą rozbieżność w ilości żywych i martwych komórek niż w przypadku szczepu PAO1 i żywe komórki dominują w próbach: kontrolnej, w obecności matryc hydroksyapatytowych z obu serii i prób 5mol% Eu^{3+} z obu serii. Z kolei we wszystkich próbach z dodatkiem jonów miedzi ilościowo dominują komórki martwe. W przypadku szczepu ATCC 27853 najwyższą zieloną fluorescencję odnotowano, podobnie jak w przypadku szczepu PAO1, w obecności P_HAp, natomiast najwyższą czerwoną fluorescencję w obecności materiału P_5mol% Eu^{3+} ,5mol% Cu^{2+} . Był to również materiał, dla którego wyznaczono najwyższą ogólną intensywność fluorescencji. Dokonane obserwacje mają jedynie charakter poglądowy, a uzyskane dane są trudne do porównania ze względu na wysokie odchylenia standardowe.

Zaprezentowane wcześniej różnice w ilości jonów uwolnionych z poszczególnych materiałów w poszczególnych mediach hodowlanych były bodźcem do postawienia kolejnego pytania badawczego: Czy zastosowanie wstępnego uwalniania jonów do pożywki może poprawić aktywność antybakteryjną badanych nanomateriałów? W tym celu przeprowadzono zmodyfikowaną wersję powyższego doświadczenia i przed dodaniem bakterii do hodowli prowadzono przez 24 h wstępne uwalnianie materiałów w podłożu. Następnie do podłoża z uwolnionymi jonami dodawano bakterie i inkubowano kolejne 24 h, po czym mierzono zmętnienie hodowli, tak jak opisano wcześniej. W **Tabeli 18.** zestawiono średnie pomiary OD₆₀₀ 24h hodowli bakteryjnych prowadzonych bezpośrednio w przygotowanych próbach zawierających apatyty oraz po uwalnianiu wstępnym czyli 24-godzinnym wytrząsaniu nanomateriałów w podłożu hodowlanym przed dodaniem bakterii. W **Tabeli 18.** przedstawiono różnicę OD₆₀₀ (Δ OD) hodowli prowadzonych w obu warunkach w celu sprawdzenia jak wcześniejsze uwalnianie wpływa na wzrost bakterii wynikający z obecności wolnych jonów.

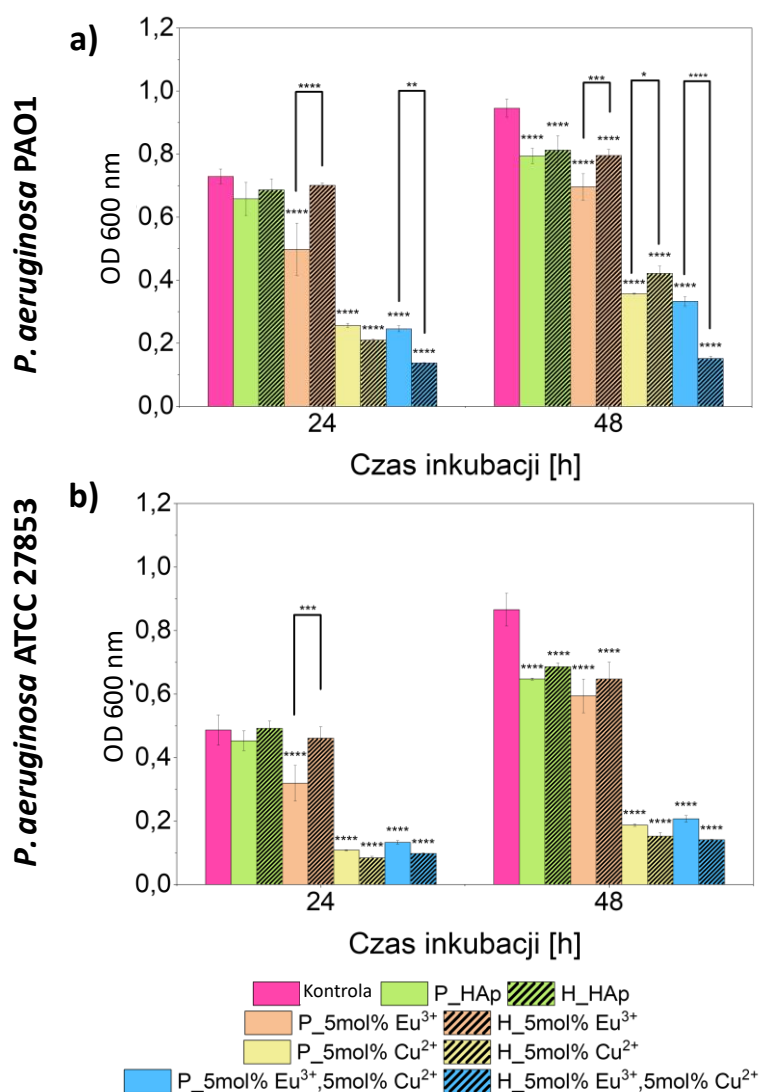
Tabela 18. Wpływ hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Eu³⁺ i Cu²⁺ (bez i z wstępnym uwalnianiem jonów do pożywki) na wzrost *P. aeruginosa* (P – seria strąceniowa, H – seria hydrotermalna). Istotne statystycznie różnice wyróżniono kolorem czerwonym (****) i różowym (***). Wyniki dla pozostałych materiałów można znaleźć w Materiałach dodatkowych w **Tabeli S.6.**

	Średnie OD ₆₀₀	Średnie OD ₆₀₀ (z wstępnym uwalnianiem) Δ OD ₆₀₀	Średnie OD ₆₀₀	Średnie OD ₆₀₀ (z wstępnym uwalnianiem) Δ OD ₆₀₀
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
P_Hap	0,80	0,81	0,33	-0,04
H_Hap	0,78	0,82	0,31	0,03
P_5mol%Eu ³⁺	0,81	0,81	0,27	0,00
H_5mol%Eu ³⁺	0,76	0,73	0,30	-0,04
P_5mol%Cu ²⁺	0,24	0,21	0,27	-0,14****
H_5mol%Cu ²⁺	0,32	0,27	0,19	-0,03
P_5mol%Eu ³⁺ ,5mol%Cu ²⁺	0,41	0,27	0,27	-0,13****
H_5mol%Eu ³⁺ ,5mol%Cu ²⁺	0,82	0,70	0,32	-0,07

Analiza istotności statystycznej wykazała, że w przypadku PAO1 największe różnice zaobserwowano w przypadku obecności hydroksyapatytu domieszkowanego P_5mol%Eu³⁺,5mol%Cu²⁺ i H_5mol%Eu³⁺,5mol%Cu²⁺. W przypadku szczepu ATCC 27853 różnice zaobserwowano jedynie w przypadku materiałów P_5mol%Cu²⁺ i P_5mol%Eu³⁺,5mol%Cu²⁺. Podobne różnice w aktywności zaobserwowano również w obecności materiałów z dodatkiem 2mol%Cu²⁺ (Materiały dodatkowe, **Tabela S.6.**), szczególnie wobec szczepu PAO1. Można na tej podstawie wywnioskować, że dodatkowe uwalnianie wstępne jonów poprawia aktywność antybakteryjną hydroksyapatytów, co widać w przypadku nanomateriałów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Cu²⁺. Analizując uzyskane wyniki można zauważyć, że większy wpływ wstępnego uwalniania wykazano dla materiałów otrzymanych metodą strąceniową. Obserwuje się jednak dosyć duże rozbieżności pomiędzy badanymi szczepami, co poniekąd potwierdza różnice we wrażliwości szczepu PAO1 i ATCC 27853 obserwowane w poprzednim doświadczeniu oraz heterogenność gatunku.

W poprzednich doświadczeniach wykazano, że wstępne uwalnianie nanomateriałów w podłożu, przed dodaniem bakterii, może poprawić ich aktywność antybakteryjną. Wykonano więc dodatkowy eksperyment, w którym hodowle bakteryjne inkubowano w eluatach powstałych po 24 h uwalnianiu nanomateriału do podłoża i usunięciu frakcji stałej poprzez wirowanie. Pozwoliło to na wprowadzenie dwóch modyfikacji jednocześnie: lepszego uwolnienia jonów z nanomateriału oraz eliminację bezpośredniego wpływ nanocząstek na komórkę bakteryjną. Otrzymane wyniki (**Rycina 47.**) wskazują, że w przypadku szczepu PAO1 obserwuje się istotny statystycznie niższe OD₆₀₀ w porównaniu z kontrolą po 24 h inkubacji w obecności: P_5mol%Eu³⁺ oraz wszystkich nanomateriałów z dodatkiem miedzi, co pokrywa się z wynikami uzyskanymi dla szczepu ATCC 27853. Po 48 h zmętnienie hodowli obu szczepów zwiększa się, natomiast jest to najbardziej zauważalne w przypadku kontroli oraz materiałów domieszkowanych jedynie jonami Eu³⁺. W przypadku nanomateriałów z miedzią widać utrzymujące się zahamowanie wzrostu obu szczepów, czego nie obserwowano podczas inkubacji bakterii w obecności nanomateriałów w formie sproszkowanej. Jest to ciekawy efekt, który można tłumaczyć tym, że eluaty zawierają określone stężenie jonów metali, które nie zmienia się w czasie (pomijając wpływ składników podłoża), natomiast w przypadku materiałów sproszkowanych układ może zmieniać się w czasie tj. jony mogą uwalniać się z matrycy, a po czasie być do niej powtórnie absorbowane, przez co zmniejsza się ich biodostępność. W przypadku obu szczepów

wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy aktywnością materiałów z obu serii. Wobec szczepu PAO1 po 24 h zaobserwowano istotnie wyższą aktywność P_5mol%Eu³⁺ i H_5mol%Eu³⁺,5mol%Cu²⁺, natomiast wobec szczepu ATCC 27853 jedynie w obecności P_5mol%Eu³⁺. Po 48 h inkubacji nie obserwowano istotnych różnic w przypadku szczepu ATCC 27853, natomiast dla PAO1 wykazano wyższą aktywność: P_5mol%Eu³⁺, P_5mol%Cu²⁺ i H_5mol%Eu³⁺,5mol%Cu²⁺. Najciekawszą obserwacją jest jednak wysoka aktywność materiału H_5mol%Eu³⁺,5mol%Cu²⁺ wobec obu szczepów, która utrzymywała się po 48 h. Odbiega to znacznie od tendencji obserwowanej dla materiału sproszkowanego, gdzie zmętnienie hodowli szczepu PAO1 po 24 h było zbliżone ze zmętnieniem kontroli.



Rycina 47. Wzrost *P. aeruginosa* PAO1 (a) i ATCC 27853 (b) w obecności eluatów powstałych po 24 h uwalnianiu nanomateriałów w pożywce (P-seria strąceniową, H-seria hydrotermalna)

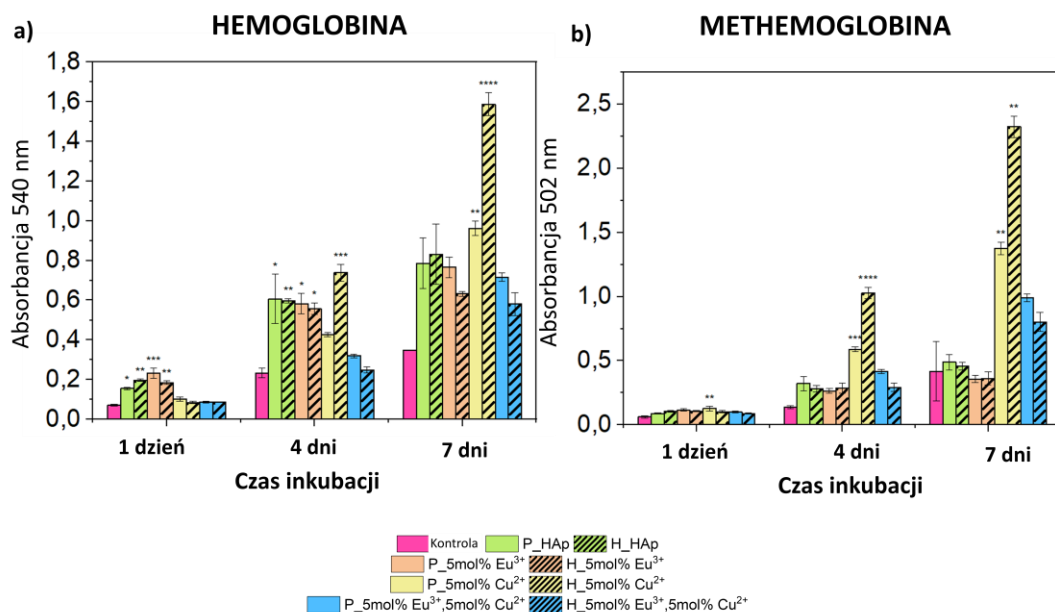
IV.2.3 Cytotoksyczność nanomateriałów na bazie hydroksyapatytu domieszkowanego jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} wobec erytrocytów i osteoblastów

Ostatnim etapem badań było oznaczenie cytotoksyczności, które stanowi dopełnienie badań nad aktywnością biologiczną testowanych hydroksyapatytów. Jest to niezwykle istotna część badań wstępnych, które powinny być wykonywane dla każdego nowego materiału. Pozwala to ocenić jego potencjalną aplikacyjność, ponieważ nawet jeśli materiał wykazywałby wysoką aktywność antybakteryjną, ale jego cytotoksyczność wobec komórek eukariotycznych byłaby znacząca byłby to czynnik wykluczający jego zastosowanie w szeroko rozumianej medycynie. Cytotoksyczność nanomateriałów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} zbadano na modelu erytrocytów oraz na modelu osteoblastów mysich. W przypadku erytrocytów oczyszczoną frakcję komórek zawieszonych w soli fizjologicznej w stosunku 1:1 (w sumie 1 ml) dodano do odważonej porcji poszczególnych nanomateriałów (10 mg) mieszając kilkakrotnie przez inwersję. Próbki pozostawiono na 1, 4 i 7 dni i po każdym z tych czasów mierzono absorbancję supernatantu w celu określenia ilości uwolnionej hemoglobiny (Rycina 49.). Czas inkubacji został wydłużony w porównaniu ze standardowymi 24 h, które stosuje się dla roztworów wodnych substancji, ze względu na wolniejsze uwalnianie jonów oraz w celu sprawdzenia czy ewentualna hemoliza krwinek zmienia się w czasie i w jaki sposób. Po upływie 7 dni obserwowano już znaczną hemolizę naturalnie zachodzącą w próbie kontrolnej, dlatego zdecydowano o zakończeniu inkubacji po tym czasie. Na **Rycinie 48.a** zamieszczono pomiary absorbancji przy długości fali 540 nm (maksimum absorpcji hemoglobiny). Po upływie 24 h widać nieznaczny wyciek hemoglobiny, natomiast statystycznie istotne różnice w porównaniu z kontrolą wykazano w obecności: P_HAp, H_HAp, P_5% Eu^{3+} oraz H_5% Eu^{3+} . Pozostałe wyniki nie różniły się istotnie od kontroli. Po 4 dniach inkubacji widać zwiększenie wycieku hemoglobiny we wszystkich badanych próbach, a istotnie różne od kontroli były te zawierające: P_HAp, H_HAp, P_5% Eu^{3+} , H_5% Eu^{3+} , i H_5mol% Cu^{2+} . Pozostałe wyniki nie różniły się istotnie od kontroli. Z kolei po 7 dniach inkubacji wykazano istotność w obecności prób: P_5mol% Cu^{2+} , oraz H_5mol% Cu^{2+} .

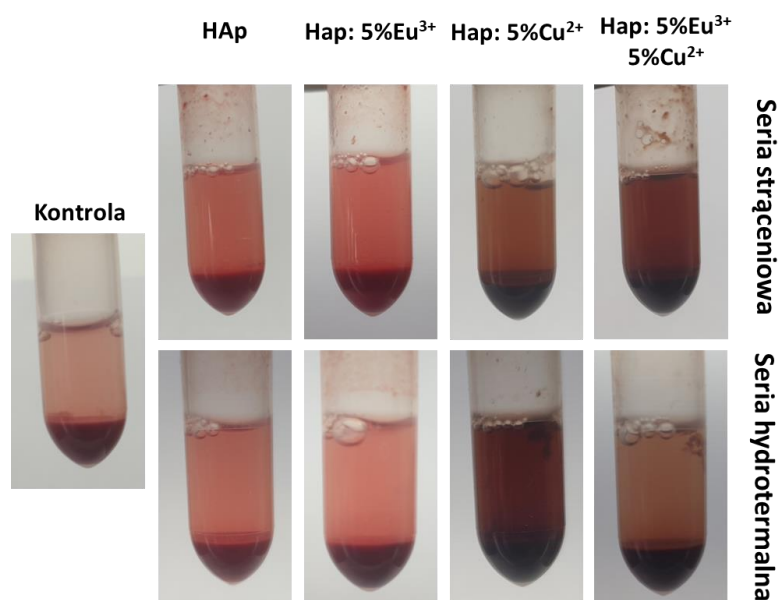
Ponadto, podczas inkubacji zaobserwowano, że w próbach z jonami Cu^{2+} pojawia się ciemne zabarwienie krwinek i supernatantu, którego nie było widać w kontroli oraz pozostałych badanych wariantach (**Rycina 49.**). Wyznaczono więc maksymalną absorpcję tych prób oraz na podstawie danych literaturowych (Zijlstra et al. 1994) ustalono, że maksimum absorpcji może wskazywać na obecność methemoglobiny ($\lambda_{\text{abs.}}=502$ nm).

Methemoglobina powstaje przez utlenienie kationu żelaza występującego w strukturze hemoglobiny z +2 do +3 stopnia, w wyniku czego nie jest możliwe już przyłączenie i transport tlenu. Zaawansowana methemoglobinemia może prowadzić do niedotlenienia, a nawet śmierci (Hajimohammadi et al. 2022). Przypadki zatrucia związkami miedzi skutkujące wystąpieniem methemoglobinemii znane są w medycynie od dawna (Chugh 1975). Z tego względu postanowiono zmierzyć absorbancję supernatantów również z wykorzystaniem drugiej długości fali (502 nm), a uzyskane wyniki zamieszczone zostały na **Rycinie 48.b**. Wykazano, że po 24 h poziom methemoglobiny jest bardzo niski i zbliżony do kontroli, natomiast analiza statystyczna wykazała istotne różnice w obecności próby P_5mol%Cu²⁺ w odniesieniu do kontroli. Po 4 dniach absorbancja prób rosła i największe różnice statystyczne wykazano w obecności: P_5mol%Cu²⁺ i H_5mol%Cu²⁺. Z kolei po 7 dniach największe zmiany w porównaniu z kontrolą odnotowano dla: P_5mol%Cu²⁺ i H_5mol%Cu²⁺. Pozostałe wyniki nie były istotne statystycznie. Porównując wyniki uzyskane dla obu pomiarów można zauważyć, że zwiększone uwalnianie hemoglobiny oraz jej utlenianie do methemoglobiny powoduje głównie materiał domieszkowany jonami miedzi H_5mol%Cu²⁺. Może to wynikać z faktu, że materiał H_5mol%Cu²⁺ uwalnia najwięcej miedzi spośród badanych materiałów, zarówno w medium MOPS jak i DMEM. Oczywiście nie wiadomo jaka ilość jonów miedzi przechodzi z apatyty do zawiesiny krwinek i jak to przebiega w czasie, natomiast można przypuszczać, że zwiększona toksyczność tego materiału jest związana z ilością uwalnianych jonów. Wyniki dla pozostałych nanomateriałów zamieszczono w Materiałach dodatkowych (**Rycina S.10.**)

Dla wybranych prób (matryc apatytowych oraz materiałów z najwyższą domieszką jonów Eu³⁺ i Cu²⁺) wykonano zdjęcia mikroskopowe rozmazów, które zamieszczono w Materiałach dodatkowych (**Rycina S.11.**). Można zaobserwować, że w porównaniu z kontrolą morfologia krwinek inkubowanych w obecności apatyty zmienia się, a w obrazach widoczne są aglomeraty nanocząstek. Nie zauważono jednak postępujących w czasie zmian ani różnic pomiędzy poszczególnymi próbami oraz pomiędzy seriami. Zaobserwowano powstawanie niewielkich aglomeratów krwinek, natomiast nie było to tak widoczne jak w przypadku jonów lantanowców dodawanych w postaci roztworów wodnych, co prawdopodobnie wynika z ich dużo niższego stężenia w nanomateriałach oraz słabego uwalniania.

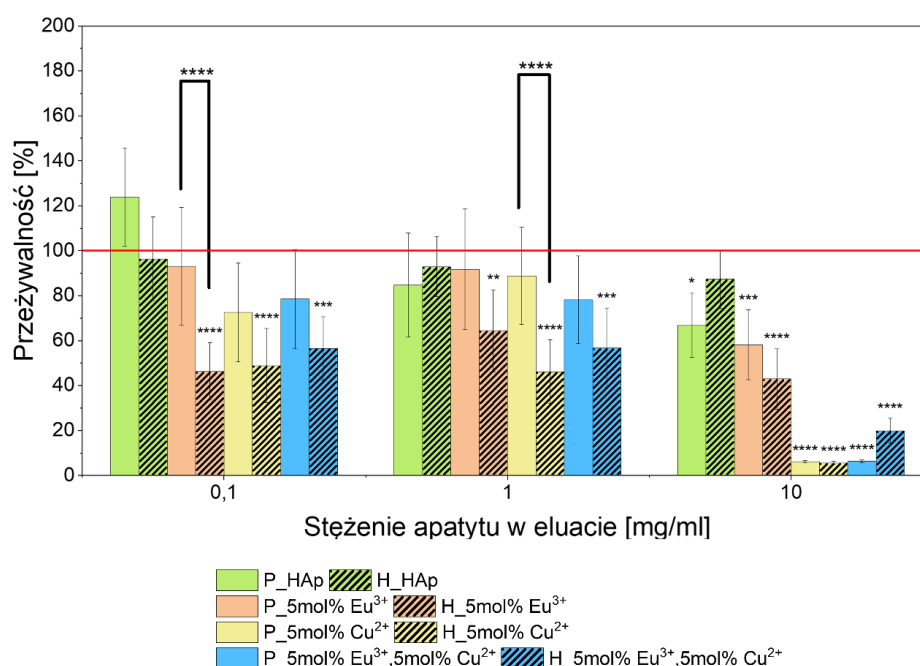


Rycina 48. Absorbancja uwolnionej a) hemoglobiny i b) methemoglobiny po inkubacji erytrocytów przez 1, 4 i 7 dni w obecności hydroksyapatytów (P- seria strąceniową, H – seria hydrotermalna). Analiza statystyczna została zamieszczona w Materiałach dodatkowych **Tabela. S.7.**)



Rycina 49. Zabarwienie supernatantów po 7 dniach inkubacji erytrocytów z badanymi nanomateriałami (P – seria strąceniową, H – seria hydrotermalna)

Cytotoksyczność nanomateriałów domieszkowanych i współdomieszkowanych 5mol% obu kationów jak również matryc hydroksyapatytowych oceniano również na modelu osteoblastów mysich 7F2. Wybór linii komórkowej wynikał z faktu, że nanomateriały na bazie hydroksyapatytów są wykorzystywane jako materiał do regeneracji tkanki kostnej. Idealny materiał powinien nie tylko nie być toksyczny, ale również stymulować proliferację komórek. Zbadanie takiego efektu wymagałoby jednak dłuższych i znacznie bardziej skomplikowanych badań. W niniejszej rozprawie doktorskiej skupiono się jedynie na określeniu cytotoksyczności poszczególnych związków. W doświadczeniu wykorzystano eluaty, ze względu na obserwowane wcześniej polepszenie działania hydroksyapatytów, które zostały poddane wstępnemu uwalnianiu. Eluaty przygotowano z użyciem medium DMEM jako eluentu. Ponieważ obserwowana toksyczność wobec bakterii była stosunkowo wysoka, zdecydowano się dodatkowo na 10x i 100x rozcieńczenie eluatów czystym medium. W sumie stosowano 3 stężenia: 10, 1 i 0,1 mg/ml. Żywotność komórek oceniono za pomocą standardowego testu MTT i porównano z kontrolą. Uzyskane wyniki przedstawiono na **Rycinie 49**.



Rycina 50. Żywotność komórek linii komórkowej osteoblastów 7F2 w obecności eluatów hydroksyapatytowych (P- seria strąceniową, H – seria hydrotermalna)

Przy najwyższym badanym stężeniu (10 mg/ml) obserwowano istotny spadek przeżywalności osteoblastów w porównaniu z kontrolą po inkubacji w obecności wszystkich

nanomateriałów za wyjątkiem H_HAp. Największe różnice wykazano dla: H_5mol%Eu³⁺ oraz wszystkich nanomateriałów z dodatkiem miedzi, dla P_5mol%Eu³⁺ i dla P_HAp. Nie wykazano natomiast istotnych różnic między seriami H i P. Zmniejszenie stężenia do 1 mg/ml znacznie zredukowało toksyczność materiałów. Istotny spadek przeżywalności komórek zaobserwowano w obecności materiałów otrzymanych metodą hydrotermalną: H_5mol%Eu³⁺, H_5%mol%Eu³⁺,5mol%Cu²⁺ i 5mol%Cu²⁺. Wykazano też istotną różnicę w cytotoksyczności pomiędzy P_5mol%Cu²⁺ i H_5mol%Cu²⁺ i wyższą toksycznością charakteryzował się materiał otrzymany hydrotermalnie. W przypadku najniższego stężenia nanomateriałów użytych do otrzymania eluatu (0,1 mg/ml) obserwowany poziom cytotoksyczności był zbliżony do obserwowanego dla stężenia 1 mg/ml. W tym stężeniu natomiast wykazano różnicę w cytotoksyczności materiałów otrzymanych metodami strąceniową i hydrotermalną, gdyż H_5 mol% Eu³⁺ wykazywał istotnie wyższą toksyczność co można wyjaśnić wykazanymi wcześniej różnicami w uwalnianiu jonów z matrycy apatytowej.

Podsumowując, w drugiej części rozprawy doktorskiej zbadano aktywność antybakteryjną hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami metali przejściowych i jonami Eu³⁺ oraz ich cytotoksyczność wobec osteoblastów i erytrocytów.

V. DYSKUSJA

P. aeruginosa jest groźnym patogenem oportunistycznym człowieka charakteryzującym się występowaniem szerokiej gamy czynników wirulencji oraz wysokiej oporności na powszechnie stosowane antybiotyki. Ponadto jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych patogenów wśród bakterii Gram-ujemnych powodujących infekcje w miejscach wszczepów (Arciola and Campoccia 2018). Rosnąca antybiotykooporność oraz rozwój implantologii wymagają stałego poszukiwania nowych rozwiązań dla materiałów implantacyjnych między innymi ich modyfikacji utrudniających namnażanie się mikroorganizmów w bezpośrednim otoczeniu. Z tego względu połączenie nanorozmiarowego hydroksyapatytu, który naturalnie występuje w organizmie człowieka jako składnik kości i zębów, oraz jonów metali o aktywności przeciwdrobnoustrojowej (jonów Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} i innych) wydaje się obiecujące. Do materiałów na bazie związków hydroksyapatytu wapnia wprowadza się również jony lantanowców (Ln^{3+}) ze względu na ich zdolność do luminescencji wykorzystywaną w bioobrazowaniu. Warto podkreślić, że implanty, które składają się głównie lub częściowo z hydroksyapatytów modyfikowanych różnymi kationami, ulegają stopniowym zmianom wywołanym m.in. przez płyny ustrojowe (Wang et al. 2019b; Cao et al. 2021). W efekcie niewielkie ilości jonów mogą być uwalniane z materiału i wpływać na namnażające się bakterie.

O ile wpływ jonów metali przejściowych bloku d układu okresowego pierwiastków (grup od 10 do 12) na komórki bakteryjne jest dosyć dobrze opisany w literaturze to niestety niewiele wiadomo o efekcie jaki wywierają jony lantanowców. Jednym z głównych celów prezentowanych badań była ocena, czy subinhibicyjne stężenia jonów lantanowców (Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , Lu^{3+}) wpływają na wirulencję *P. aeruginosa* (biofilm, wytwarzanie plicjaniny, piowerdyny, elastazy, ruch typu *swimming*, *swarming* i *twitching*). Zbadano również wpływ wybranych jonów na właściwości powierzchniowe komórki (ładunek powierzchniowy, hydrofobowość, przepuszczalność osłon) oraz określono ich cytotoksyczność na modelu erytrocytów. Dodatkowo sprawdzono wpływ obecności tych jonów na efekt antybakteryjny ciprofloksacyny i gentamycyny oraz jonów Cu^{2+} . W kolejnej części rozprawy doktorskiej przedstawiono wyniki badań aktywności antybakteryjnej nanomateriałów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami metali przejściowych i jonami lantanowców. W rozprawie doktorskiej zawarto m.in. zbiór opublikowanych już wyników ukazujących aktywność antybakteryjną różnych form (koloidy, hydrożele, tabletki)

hydroksyapatytów domieszkowanych jonami Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} . Zbadano również aktywność antybakteryjną i cytotoksyczność nanohydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami miedzi, należącej do metali przejściowych, oraz europu, należącego do szeregu lantanowców. Oceniono również wpływ metody syntezy (strąceniową/hydrotermalna) na aktywność antybakteryjną materiałów oraz testowano różne sposoby aplikacji nanocząstek (nanoformy w postaci sproszkowanej /eluaty). Badania zostały uzupełnione o opublikowane wyniki pokazujące jaki wpływ mają składniki powszechnie stosowanych podłoży mikrobiologicznych na aktywność antybakteryjną jonów metali. Pozwoliło to na uzasadnienie wyboru podłoży mikrobiologicznych stosowanych w poszczególnych częściach rozprawy doktorskiej.

Uzyskane wyniki sugerują, że wpływ, jaki jony Ln^{3+} wywierają na *P. aeruginosa* (zwiększenie produkcji biofilmów, zmiany w produkcji czynników wirulencji, zmiana właściwości powierzchniowych oraz zwiększenie wartości MIC dla ciprofloksacyny i gentamycyny) jest najprawdopodobniej związany z ich pozycją w szeregu lantanowców. Na podstawie uzyskanych wyników nie można jednak znaleźć uniwersalnego wzorca. Ze względu na podobieństwo strukturalne (wielkość promienia jonowego) jony lantanowców mogą w pewnym stopniu naśladować aktywność jonów wapnia Ca^{2+} , co wykazano we wcześniejszych badaniach (Evans 1983). To może wyjaśniać efekty obserwowane w niniejszej rozprawie. Zdolność jonów lantanowców do naśladowania aktywności jonów wapnia można było zaobserwować analizując poziom produkcji czynników wirulencji przez bakterie *P. aeruginosa* hodowane w obecności badanych jonów. Zaobserwowano znacząco zwiększoną produkcję biofilmu, gdy w hodowli obecne były jony lantanowców od Sm^{3+} do Tm^{3+} . Jony Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} oraz Yb^{3+} i Lu^{3+} wykazywały aktywność porównywalną z nietraktowaną kontrolą. Podobnie, stymulujący wpływ jonów Ca^{2+} na tworzenie biofilmu bakteryjnego został wcześniej opisany w licznych publikacjach (Körstgens et al. 2001; Sarkisova et al. 2005; Das et al. 2014). Ze względu na podobną aktywność jonów Ln^{3+} i Ca^{2+} mechanizmy działania stymulującego tworzenie biofilmu mogą być podobne. Według wcześniej opublikowanych danych przez Das i wsp. jednym z możliwych mechanizmów promujących tworzenie biofilmu było wiązanie się jonów Ca^{2+} z pozakomórkowym DNA (eDNA) (Das et al. 2014). W niniejszej rozprawie wykazano jednak, że jony lantanowców obniżają ilość wolnego eDNA w podłożu w odniesieniu do kontroli, co wydaje się być spowodowane zmniejszeniem jego uwalniania z komórki. Wskazuje na to fakt, że po dodaniu jonów lantanowców do supernatantu uzyskanego przez wirowanie próby kontrolnej

spadek stężenia eDNA był nieznaczny. Jest to tym bardziej zaskakujące, że w literaturze odnajduje się informacje o chelatowaniu kationów przez eDNA, czego nie zaobserwowano w przypadku badanych jonów Ln^{3+} (Wilton et al. 2016). Z tego względu obserwowane zwiększenie grubości biofilmów prawdopodobnie nie jest bezpośrednio zależne od ilości uwolnionego eDNA. Wiadomo również, że jon Ca^{2+} promuje powstawanie jonowych mostków krzyżowych pomiędzy bakteriami, co sprzyja agregacji komórek (Das et al. 2014; King et al. 2020). Podobny efekt był obserwowany również dla innych jonów dwuwartościowych, np. jon Mg^{2+} i był zależny przede wszystkim od stężenia jonu, a w mniejszym stopniu od siły jonowej (De Kerchove and Elimelech 2008). Wcześniejsze badania wskazują, że zwiększone stężenie wapnia może powodować powstawanie nawet 10-krotnie grubszych biofilmów niż w warunkach fizjologicznych (Sarkisova et al. 2005). Być może podobne efekty były powodowane również przez jony Ln^{3+} . Na podstawie wykonanych obrazów mikroskopowych można zauważyć, że grubość biofilmów była większa po inkubacji w obecności jonów lantanowców. Ponadto podczas wykonywania zdjęć zauważono, że bakterie adherowały nie tylko do powierzchni dołków, ale również do sąsiednich komórek, co pozwoliło na utworzenie grubych, wielowarstwowych struktur. Pozwala to wnioskować, że jony lantanowców nasilają agregację komórek w porównaniu z próbą kontrolną.

Niestety niewiele wiadomo z kolei na temat wpływu jonów Ca^{2+} na ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję biofilmu w tym *psl*. Wcześniejsze badania w obecności jonów wapnia wykazały natomiast wzrost ekspresji genu *algD*, co skutkowało zwiększoną produkcją alginianu będącego składową biofilmu (Sarkisova et al. 2005). Nie wiadomo czy inkubacja w obecności jonów Ln^{3+} wpływałaby podobnie na ilość produkowanego alginianu. Wymaga to dalszych badań w tym zakresie, co zostało już zaplanowane i rozpoczęte.

Możliwe jest również, że intensywnie przylegające komórki widoczne w CLSM i po barwieniu CV nie były w rzeczywistości biofilmami, lecz aglomeratami komórkowymi nie otoczonymi macierzą polisacharydową, co wymagałoby sprawdzenia innymi niż zastosowane w niniejszej rozprawie technikami. Potwierdzałyby to wspomniane i obserwowane wcześniej powstawanie jonowych mostków krzyżowych pomiędzy bakteriami, co może sprzyjać agregacji komórek (Das et al. 2014; King et al. 2020). Jedną z technik, które mogłyby być zostać zastosowane w dalszych badaniach jest oznaczenie ilości oraz składu EPS wykorzystując metody analityczne oraz proteomiczne (Azeredo et al.

2017). Innym rozwiązaniem jest zastosowanie metody wizualizacji składników macierzy biofilmu poprzez barwienie Sypro Ruby, którego użycie zostało opisane w rozdziale o wpływie obecności jonów Eu^{3+} na aktywność jonów Cu^{2+} . W przypadku jonów lantanowców, gdzie obserwowana adhezja komórek bakteryjnych była bardzo duża, trudno byłoby jednak zaobserwować czy komórki faktycznie otoczone są macierzą zewnątrzkomórkową, ponieważ barwnik ten wiąże się z białkami, ale nie jest na tyle specyficzny, żeby wybarwić tylko białka znajdujące się poza komórkami (Azeredo et al. 2017). W przypadku uzyskanych w niniejszej rozprawie wyników barwienie za pomocą Sypro Ruby nie pozwoliłoby precyzyjnie ocenić czy badane szczepy produkują składniki macierzy zewnątrzkomórkowej pod wpływem obecności jonów lantanowców. Z tego też względu badania należałoby uzupełnić o analizy ekspresji genów, których produkty są zaangażowane w formowanie biofilmów w tym geny *algD*, *algL*, *algU* (związane z syntezą alginianu), *pslA*, *pslD* (związane z syntezą Psl), *pelA*, *pelF* (związane z syntezą Pel), *rhIR* (związany z syntezą białka regulatorowego RhlR, pod kontrolą, którego pozostaje wiele czynników wirulencji) oraz *ppyR* (związany z syntezą regulatora Psl i piowerdyny) (Kamali et al. 2020; Karballaei Mirzahosseini et al. 2020). Niestety, analiza ekspresji genów pod wpływem działania jonów metali jest problematyczna ze względu na trudności w wyizolowaniu czystej, nieuszkodzonej frakcji RNA o wysokim stopniu integralności. Wynika to z faktu, że jony, szczególnie dwu- i trójwartościowe (w tym jony lantanowców) powodują nieenzymatyczną hydrolizę kwasów nukleinowych i prowadzą do fragmentacji nici (Komiyama et al. 1999; Forconi and Herschlag 2009). Z tego względu zbadanie wpływu wysokich stężeń jonów lantanowców (0,5MIC) na ekspresję genów wymaga dostosowania protokołów doświadczalnych, na przykład poprzez dodanie chelatorów (np. EDTA), które zwiążą wolne kationy. Nie ma jednak w tym przypadku pewności, że kationy nie pozostaną zintegrowane ze strukturami komórkowymi i w trakcie izolacji RNA, wbudują się w kwasy nukleinowe, niszcząc ich strukturę. Zaplanowane doświadczenia w tym zakresie wyjaśnią nasuwające się wątpliwości.

Właściwości powierzchniowe komórki, takie jak hydrofobowość i ładunek, również są niezwykle istotne podczas adhezji bakterii do różnych powierzchni (Ferreira Maillard et al. 2021). Wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie wskazują, że jony lantanowców mogą powodować nieznaczne zwiększenie hydrofobowości, co było szczególnie widoczne w przypadku ksylenu, który spośród badanych rozpuszczalników charakteryzuje się najmniejszą rozpuszczalnością w wodzie. Najwyższe powinowactwo do ksylenu

obserwowano w hodowlach inkubowanych w obecności jonów Er^{3+} i (Yb^{3+}) . W przypadku pozostałych rozpuszczalników (octanu etylu i chloroformu) nie zaobserwowano zmian w porównaniu z kontrolą, podobnie jak w przypadku pomiarów kąta zwilżania i SFE (energii swobodnej powierzchni). Może to potwierdzać, że jony lantanowców wpływały na hydrofobowość komórki *P. aeruginosa* w niewielkim stopniu.

Kolejnym parametrem warunkującym oddziaływanie bakterii z różnymi powierzchniami jest ładunek powierzchniowy. Pomiar potencjałów zeta wskazuje, że po inkubacji z jonami lantanowców ładunek powierzchniowy komórki wzrastał (stawał się mniej ujemny), natomiast może to być efektem przyłączenia dodatnio naładowanych jonów do ujemnie naładowanych grup funkcyjnych struktur znajdujących się na powierzchni komórki (karboksylowej, fosforanowej, hydroksylowej czy imidazolowej, a także grup aminowych) jak opisano we wcześniejszych publikacjach (Halder et al. 2015). Adsorpcja jonów metali do ujemnie naładowanej powierzchni komórki bakteryjnej została opisana m.in. dla jonów Cu^{2+} (Kőnig-Péter et al. 2019). Z kolei ciekawą obserwacją był fakt, że próby kontrolne wykazywały dwa piki na wykresie potencjału zeta, natomiast w przypadku hodowli z jonami lantanowców był tylko jeden pik, co zostało potwierdzone dla obu badanych szczepów. Może to sugerować, że w przypadku prób kontrolnych bakterie były mniej jednorodne i występowały w nich komórki o różnym potencjale zeta, natomiast dodatek jonów lantanowców powodował ujednoczenie ładunków w próbie. W literaturze możemy odnaleźć informacje, że komórki bakteryjne, które zostały uwolnione z biofilmów charakteryzują się bardziej ujemnym potencjałem zeta niż komórki wolnopływające (Ferreira Maillard et al. 2021). Zjawisko to można odnieść do tego, które zostało zaobserwowane w prezentowanych badaniach. Przyczyny większej homogenności prób inkubowanych w obecności jonów lantanowców mogą być dwie: (1) zadherowane do powierzchni polistyrenu komórki mogą nie być w istocie biofilmami oraz (2) utworzony biofilm może być tak stabilny, że mogło nie dochodzić do uwalniania komórek, a wszystkie bakterie w zawieszynie mogły być w istocie komórkami wolnopływającymi, które nie brały udziału w tworzeniu biofilmu. Wymaga to jednak dalszych badań i zweryfikowania tej hipotezy z wykorzystaniem innych technik. Zakładając jednak, że jony lantanowców działają podobnie do jonów wapnia druga opcja wydaje się być bardziej prawdopodobna. Za tym wytłumaczeniem przemawiają również wspomniane wcześniej trudności w oderwaniu komórek bakteryjnych od dna płytki, nawet po zastosowaniu ultradźwięków. Co więcej literatura sugeruje, że neutralizacja ładunku powierzchniowego może być powiązana ze

zwiększeniem przepuszczalności osłon komórkowych i destabilizacją błony zewnętrznej (Halder et al. 2015; Ferreyra Maillard et al. 2021). Nie zostało to jednak zaobserwowane dla jonów lantanowców w niniejszej rozprawie, ponieważ otrzymane wyniki wskazują, że obecność jonów lantanowców zmniejszała przepuszczalność osłon komórkowych, co może z kolei tłumaczyć niskie stężenia wolnego eDNA w hodowlach bakteryjnych, które nie wynikało z jego bezpośredniego wiązania z jonami Ln^{3+} . Prowadzone wcześniej badania sugerują ponadto, że jony dwuwartościowe, szczególnie jony Ca^{2+} wpływają nie tylko na początkową adhezję bakterii, ale również na kolejne stadia powstawania biofilmu. Może to być związane z nasilaniem dimeryzacji alginianu poprzez tworzenie wiązań krzyżowych, co prowadzi do utworzenia trójwymiarowej macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto w formowanie biofilmu zaangażowane są różne białka EPS, których aktywność zmienia się pod wpływem obecności jonów Ca^{2+} (Wang et al. 2019a).

Oprócz biofilmu, po poddaniu *P. aeruginosa* działaniu jonów lantanowców zmieniała się także produkcja innych czynników wirulencji. Niestety, analiza ilości produkowanych czynników wirulencji była trudna ze względu na heterogenność badanych szczepów bakteryjnych. W próbach kontrolnych (bez jonów lantanowców) szczep *P. aeruginosa* ATCC 27853 produkował mniej piocyjaniny w porównaniu ze szczepem PAO1. W próbach hodowanych z jonami lantanowców produkcja piocyjaniny była obniżona w hodowlach szczepu PAO1, podczas gdy w hodowlach szczepu ATCC 27853 była podwyższona. Natomiast wzrost poziomu produkcji piocyjaniny przez szczep ATCC 27853 powinien być potwierdzony analizą genetyczną, ponieważ bakterie te produkują naturalnie niewiele tego metabolitu i pomiary spektrofotometryczne mogą nie być wystarczająco czułe. Co ciekawe, w literaturze opisano wzrost produkcji piocyjaniny po dodaniu do podłoża hodowlanego jonów Ca^{2+} (Sarkisova et al. 2005; King et al. 2020). Sarkisova i wsp. (2005) opisali dwu- do trzykrotnie większą produkcję piocyjaniny w podłożu obfitującym w jony Ca^{2+} i potwierdzili obserwację analizami proteomicznymi, które ujawniły zwiększoną ilość białka PhzB (*Phenazine biosynthesis protein*) (Sarkisova et al. 2005). W przypadku jonów Ln^{3+} zmniejszenie poziomu produkcji piocyjaniny w supernatancie pohodowlanym może wynikać z uszczelnienia osłon komórkowych i ze słabszego uwalniania barwnika do podłoża. Wykorzystanie wyłącznie metod spektroskopowych nie pozwala niestety ocenić, czy zmniejszona fluorescencja w przypadku drugiego metabolitu, piowerdyny, była wynikiem ograniczenia jej produkcji lub uwalniania z komórki, wygaszania fluorescencji w wyniku kompleksowania/chelatowania piowerdyny jonami Ln^{3+} czy też kombinacji obu

tych czynników. W związku z tym, aby wyjaśnić zaobserwowany mechanizm należy również zbadać ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w produkcję i uwalnianie tego sideroforu. Wzrost produkcji piowerdyny pod wpływem jonów wapnia był wcześniej opisywany (zwiększenie ekspresji genów *pvd* jak również genu *PA2412* odpowiedzialnego za syntezę piowerdyny) (Guragain et al. 2016; King et al. 2020)

W badaniach prezentowanych w niniejszej rozprawie odnotowano umiarkowane zwiększenie poziomu produkcji elastazy, jednak było ono widoczne głównie podczas analizy RVF, gdzie najwyższe wartości ($RVF > 2.0$) odnotowano po uzupełnieniu podłoża hodowlanego jonami Eu^{3+} , Dy^{3+} i Er^{3+} (szczep PAO1) oraz jonami Tm^{3+} i Lu^{3+} (szczep ATCC 27853). Wcześniejsze badania wykazały, że produkcję elastazy zwiększało uzupełnienie podłoża hodowlanego jonami Ca^{2+} . Ilość elastazy, jak również białka LasB (proteazy zewnątrzkomórkowej) oceniano uprzednio za pomocą testu ELISA (Olson and Ohman 1992; King et al. 2020). Ponadto w pracy Guragain i wsp. (2016) opisano również zwiększoną ekspresję genu *lasI* zaangażowanego w regulację ekspresji tego czynnika wirulencji (Guragain et al. 2016). Z dokonanych obserwacji wynika, iż pomimo strukturalnego podobieństwa (wielkość promienia jonowego) pomiędzy jonami Ca^{2+} i Ln^{3+} ich wpływ na *P. aeruginosa* nie zawsze jest taki sam. Jony lantanowców wydają się naśladować jony wapnia w przypadku stymulacji wytwarzania biofilmu; możliwe jednak, że w proces ten zaangażowane są różne mechanizmy, a adhezja komórek nie jest zależna od aginianu i polisacharydów. Główną różnicą pomiędzy jonami lantanowców a jonem wapnia zaobserwowano w przypadku piocyjany, której produkcja była stymulowana przez jon Ca^{2+} (Sarkisova et al. 2005), a obniżana przez jony Ln^{3+} . Wyniki uzyskane dla elastazy są zgodne z tendencją, która została wcześniej odnotowana dla jonu Ca^{2+} (Olsen 2015; Guragain et al. 2016).

W niniejszej rozprawie określono również wpływ jonów lantanowców na ruch typu *swimming*, *swarming* i *twitching*. W przypadku *swimming motility* obserwowano obniżenie zdolności do ruchu, co było widoczne u obu szczepów, natomiast w przypadku *twitching motility* obserwowano obniżenie ruchliwości jedynie u szczepu ATCC 27853. Z kolei analiza fenotypów wzrostu typu *swarming* wskazuje, że u obu szczepów następowała zmiana z fenotypu *circular* w kierunku *flower-like* oraz pojawiało się intensywnie zielone zabarwienie. Zmiany były najbardziej widoczne w obecności ceru (Ce^{3+}). Według teorii Kerchove i Elimelech (2008) jony dwuwartościowe inaczej wpływają na ruchliwe (*motile*) komórki *P. aeruginosa* niż na komórki nieruchliwe (*nonmotile*), na przykład szczepy PAO1

z delecją genów odpowiedzialnych za syntezę rzęski *fliC* i *pilA*. W przypadku szczepów nieruchliwych jony dwuwartościowe odgrywają niezwykle istotną rolę w adhezji bakterii do podłoża, w przeciwieństwie do oddziaływań elektrostatycznych. Badacze tłumaczą to silnymi oddziaływaniami zachodzącymi pomiędzy strukturami powierzchniowymi komórek bakteryjnych a tymi jonami. W przypadku szczepów ruchliwych (*motile*) jony dwuwartościowe nie odgrywają bezpośredniej roli w adhezji, natomiast stymulują *swimming motility* (De Kerchove and Elimelech 2008). Ponadto zaobserwowano, że wpływ na *swimming*, *swarming* i *twitching motility* był słabszy, kiedy inkubowano hodowle bakteryjne w obecności jonów lantanowców przed dodaniem ich na płytki agarowe z dodatkiem Ln^{3+} . Wskazuje to na możliwość istnienia mechanizmów adaptacyjnych w stosunku do subinhibicyjnych stężeń jonów lantanowców.

Istotną częścią niniejszej rozprawy doktorskiej było również zbadanie wpływu obecności jonów lantanowców na aktywność antybakteryjną antybiotyków. Wykazano, że w przypadku ciprofloksacyny wartości MIC wzrastały głównie po dodaniu do pożywki lekkich i niektórych ciężkich jonów lantanowców (Ce^{3+} - Dy^{3+}), natomiast wartości MIC gentamycyny rosły po dodaniu ciężkich jonów (Gd^{3+} - Lu^{3+}). Analogicznie antagonistyczną aktywność jonów Ca^{2+} wobec gentamycyny udowodniono w wielu wcześniejszych pracach (Davis and Iannetta 1973; Zimelis and Jackson 1973; Kenny et al. 1980). Wykazano na przykład, że zmniejszenie przepuszczalności osłon komórkowych u *P. aeruginosa* eksponowanego na gentamycynę może być wynikiem stabilizacji ściany komórkowej spowodowanej usztywnieniem błony lipoproteinowej (Zimelis and Jackson 1973; Martin and Beveridge 1986). Zmniejszenie przepuszczalności osłon komórkowych przez jony lantanowców potwierdzone w niniejszej rozprawie było szczególnie widoczne w przypadku hodowli z dodatkiem jonów Er^{3+} i Yb^{3+} , co szło w parze ze wzrostem MIC gentamycyny. Ponadto, wcześniej opisano, że siła antagonistycznego działania jonu Ca^{2+} różni się pomiędzy szczepami *P. aeruginosa* i nie była obserwowana dla innych bakterii Gram-ujemnych, jak *Klebsiella* czy *E. coli* (Davis and Iannetta 1973). Na podstawie tych badań można przypuszczać, że zmiany wartości MIC mogły nie być wynikiem bezpośredniej interakcji lantanowca z gentamycyną, a raczej mogą być wynikiem zmian przepuszczalności osłon komórkowych, co utrudniało wnikanie leku do komórki i skutkowało zwiększeniem MIC. Hipoteza ta jednak musi zostać zweryfikowana w dalszych badaniach. W przypadku ciprofloksacyny efekt antagonistyczny mógł mieć inną przyczynę, ponieważ istnieje wiele badań opisujących tworzenie kompleksów pomiędzy ciprofloksacyną a różnymi kationami,

w tym jonami wapnia i lantanowców (Zupančič et al. 2001; Mishra and Sharma 2008; Uivarosi 2013; Cuprys et al. 2018). Jednak niewiele jest doniesień opisujących aktywność przeciwbakteryjną takich kompleksów. Istniejące dane sugerują, że zmniejszenie aktywności przeciwbakteryjnej ciprofloksacyny nie wynikało z interakcji bakteria-kation, lecz było efektem tworzenia mniej aktywnych chelatów antybiotyków-metal (Ma et al. 1997). Tłumaczy to obserwowane w niniejszych badaniach różnice pomiędzy aktywnością ciprofloksacyny i gentamycyny w obecności lantanowców ($FIC > 4.0$ gentamycyny w obecności jonów od Gd^{3+} do Lu^{3+} oraz $FIC > 4.0$ ciprofloksacyny w obecności jonów od Ce^{3+} do Gd^{3+}). Z dokonanych obserwacji wynika, że oba mechanizmy hamowania aktywności antybiotyków (bezpośrednie oddziaływanie jon-komórka i tworzenie kompleksów pomiędzy jonami lantanowców a antybiotykami) nie są uzależnione od miejsca w szeregu lantanowców, choć oba wydają się być typowe dla aktywności jonów Ca^{2+} . Należałoby przeprowadzić więcej analiz wyjaśniających to zjawisko. Badanie wpływu jonów lantanowców na efekt antybakteryjny antybiotyków jest istotne ze względu na możliwość ich potencjalnego wykorzystania jako domieszek w nanomateriałach przeznaczonych do zastosowań implantologicznych, gdzie antybiotykoterapia jest wdrażana jako standardowa procedura.

Ponadto potencjalne środki przeciwbakteryjne lub przeciwwirusowe powinny być zawsze badane pod kątem ich cytotoksyczności wobec komórek eukariotycznych. Toksyczność jonów lantanowców była wcześniej badana, a liczne publikacje opisują wpływ jonów lantanowców na erytrocyty, który był ściśle związany ze stężeniem Ln^{3+} (Cheng et al. 1999; Alexy et al. 2011; Rim et al. 2013; Kumar et al. 2016). W badaniach prezentowanych w niniejszej rozprawie zastosowane stężenia jonów lantanowców były wysokie, znacznie przekraczając oczekiwany poziom tolerancji, stąd nie zauważono różnic pomiędzy jonami lantanowców, jak również pomiędzy zastosowanymi stężeniami. Z wcześniej opublikowanych danych wynika, że w niższych stężeniach jony lantanowców były w stanie wywołać odwracalną hemolizę, co oznacza, że po dodaniu chelatorów, takich jak EDTA, erytrocyty wracały do normalnej postaci. Autorzy wskazują, że możliwą przyczyną powyższego zjawiska jest fakt, że Ln^{3+} wiążą się z powierzchnią komórek poprzez oddziaływanie elektrostatyczne, gdzie indukują tworzenie się „porów”, jednak na tym etapie mogą być usunięte przez czynniki chelatujące (Wang et al. 1999). Inne badania sugerują, że jony lantanowców zmniejszają deformację komórek i pod tym względem lżejsze jony Ln^{3+} były bardziej aktywne (Alexy et al. 2011). W wyższych stężeniach jony

lantanowców indukują fuzję erytrocytów (Evans 1983), co jest dobrze widoczne również w niniejszych badaniach. Jedną z przyczyn aglutynacji erytrocytów może być również zmiana potencjału zeta wywołana zmianą składu jonowego w ich otoczeniu (Halder et al. 2015).

Jak już wcześniej wspomniano jony lantanowców mogą być wykorzystywane jako domieszki oraz współdomieszki w nanomateriałach. Dodatkowo związki takie mogą być modyfikowane przez podstawienie jonów wapnia jonami metali przejściowych, o potwierdzonej aktywności antybakteryjnej. Takie nanomateriały pozwoliłyby na połączenie cech antybakteryjnych z możliwością bioobrazowania. W ramach przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej badań wstępnych przetestowano aktywność jonów Ag^+ , Cu^{2+} oraz Zn^{2+} , zarówno w formie roztworów wodnych jak i nanomateriałów domieszkowanych tymi jonami. Niestety badania nad aktywnością antybakteryjną jonów metali stanowią duże wyzwanie ze względu na niemożność zastosowania standardowych metod i protokołów, które z powodzeniem stosuje się przy badaniu innych substancji antybakteryjnych. Wynika to z faktu, że składniki podłoży mikrobiologicznych, szczególnie składniki organiczne oraz fosforany, oddziałują chemicznie z dodanymi jonami, powodując powstanie kompleksów lub wytrącenie nierozpuszczalnych osadów. W konsekwencji, jony metali tracą częściowo swoją aktywność, co można zaobserwować porównując ich stężenia MIC w poszczególnych podłożach (Li et al. 2011; Rathnayake et al. 2013; Rewak-Soroczynska et al. 2022a). Często dochodzi również do zmiany pH podłoża, co może prowadzić do zmienionego wzrostu i metabolizmu bakterii (Hasman et al. 2009; Rewak-Soroczynska et al. 2022a). Ze względu na stosunkowo wysoką aktywność antybakteryjną jonów Ag^+ opisane wyżej efekty mogą mieć mniejsze znaczenie niż w przypadku jonów dwu- i trójwartościowych (Li et al. 2011; Rathnayake et al. 2013; Rewak-Soroczynska et al. 2022a). Badania aktywności antybakteryjnej jonów metali przejściowych (Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+}) w różnych podłożach mikrobiologicznych: pełnych (LB, MHB, TSB, BHI) i minimalnych (MOPS, M9, M63, podłoże Davisa) pozwoliło wyselekcjonować dwa podłoża, który były stosowane w większości doświadczeń w niniejszej rozprawie. Spośród podłoży pełnych wybrano MHB, w którym wartości MIC badanych jonów wobec szczepów *P. aeruginosa* były stosunkowo niskie. Ponadto jest to podłoże rekomendowane do testowania aktywności antybiotyków, zgodnie z wytycznymi EUCAST (https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/media_preparation). Biorąc pod uwagę fakt, że wartości MIC w podłożach pełnych były stosunkowo wysokie zdecydowano się, szczególnie w badaniach z udziałem apatytów domieszkowanych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} , na wykorzystanie

podłoża minimalnego MOPS. Spośród badanych było to podłoże, w którym aktywność antybakteryjna jonów metali przejściowych była stosunkowo wysoka i nie obserwowano wytrącania się osadów w takim stopniu jak w pozostałych mediach (Rewak-Soroczynska et al. 2022a). Generalnie w podłożach minimalnych wyznaczone wartości MIC były dużo niższe niż w podłożach pełnych, co zostało już wcześniej opisane (Calomiris et al. 1984; Tarawneh et al. 2019). Należy jednak pamiętać, że podłoża minimalne nie zawierają wszystkich niezbędnych składników zapewniających optymalny wzrost mikroorganizmów (Parija 2009; Rathnayake et al. 2013), dlatego w doświadczeniach wykorzystujących medium MOPS wydłużono czas inkubacji do 48 h, aby uzyskać odpowiednio wysokie zmętnienie hodowli. Ze względu na potencjalne interakcje jonów metali z solami fosforanowymi zdecydowano się w większości badań prezentowanych w niniejszej rozprawie wykorzystywać roztwór soli fizjologicznej zamiast standardowego roztworu PBS, który był używany jedynie kiedy w stosowanym protokole podkreślono taką konieczność.

Kolejnym wyzwaniem było wystandaryzowanie metod badania nanomateriałów. Rekomendowane w literaturze metody często wiążą się z wieloma ograniczeniami. Przykładowo, czasem ciężko jest odróżnić czy zmętnienie pożywki powstało w wyniku rozproszenia nanocząstek, czy jest spowodowane namnożeniem się bakterii. Z tego powodu niemożliwe jest zmierzenie gęstości optycznej hodowli, stosując jako próbę ślepą jedynie czyste podłoże. W przypadku badań nanomateriałów próbę ślepą powinna stanowić zawiesina nanocząstek w medium, natomiast należy podkreślić, że takie układy są niestabilne w czasie i szybko opadają na dno dołka lub tworzą aglomeraty (Hoseinzadeh et al. 2017).

Materiały apatytowe domieszkowane jonami metali przejściowych są intensywnie badane od wielu lat (Kolmas et al. 2014; Tite et al. 2018; Yilmaz et al. 2019; Franco et al. 2022). W niniejszej rozprawie zaprezentowano wyniki badań aktywności nanomateriałów przeprowadzonych z wykorzystaniem różnych technik. Badano na przykład zawiesiny koloidalne nanocząstek w soli fizjologicznej i sprawdzano jak taki układ wpływa na liczebność mikroorganizmów. Pomimo obserwowanej aktywności antybakteryjnej, szczególnie dla hydroksyapatytów domieszkowanych jonami Ag^+ i Cu^{2+} , należy brać pod uwagę fakt, że badania prowadzone w roztworze soli fizjologicznej mają minimalne przełożenie na warunki *in vivo*, co opisano we wcześniejszych pracach Zespołu Profesora Wiglusza (Targonska et al. 2020; Sobierajska et al. 2021a; Rewak-Soroczynska et al. 2022). Z kolei stosując podłoża mikrobiologiczne nie obserwowano żadnych efektów

antybakteryjnych dla stężeń hydroksyapatytów równych 100 µg/ml. Z tego względu w badaniach z wykorzystaniem nanomateriałów domieszkowanych jonami miedzi i europu zwiększono stężenie nanocząstek do 10 mg/ml. Wciąż nie pozwoliło to na wyznaczenie stężeń MIC, ale obserwowano mniejszą gęstość optyczną w hodowlach, szczególnie w obecności nanomateriałów z dodatkiem jonów miedzi, niż w hodowli kontrolnej.

Oprócz nanomateriałów w formie sproszkowanej wykorzystano również hydrożele oraz tabletki, które zostały wytworzone na bazie wybranych nanomateriałów. Pozwoliło to m.in. na porównanie zdolności do tworzenia się biofilmów bakteryjnych na różnych powierzchniach. Badania wykazały, że bakterie chętniej przyczepiały się do hydrożeli niż do tabletek, co było zastanawiające. Natomiast dokładniejsze analizy wykazały, że było to spowodowane nie właściwościami chemicznymi tabletek, ale zbyt gładką strukturą ich powierzchni, ponieważ na chropowatym fragmencie liczebność drobnoustrojów była znacznie większa, co dokładnie opisano w opublikowanej pracy współautorskiej (Sobierajska et al. 2021a). Obniżenie adhezji drobnoustrojów na wygładzonych powierzchniach zostało wcześniej opisane w literaturze i znalazło zastosowanie na przykład przy wytwarzaniu materiałów stomatologicznych (Ionescu et al. 2012; Song et al. 2015).

Porównywano również liczebność bakterii w obecności koloidów oraz eluatów z hydrożeli wykonanych z materiału z serii Zn^{2+}/Cu^{2+} :HAp. Można było zaobserwować, że w przypadku koloidu bakterie pozostawały w bezpośrednim kontakcie z aglomeratami nanocząstek, natomiast w przypadku eluatu za efekt antybakteryjny w głównej mierze odpowiadały uwolnione z materiału jony, dlatego dla koloidów wykonanych z HAp domieszkowanych Cu^{2+} efekt antybakteryjny był silniejszy niż dla eluatów (Sobierajska et al. 2021a). Interesujące jest także, że w przypadku serii Zn^{2+}/Cu^{2+} :HAp materiały domieszkowane jedynie jonami cynku nie powodowały istotnej redukcji CFU/ml, natomiast w przypadku serii Zn^{2+}/Sr^{2+} :HAp_Si obserwowano taką aktywność, nawet dla najniższych domieszek Zn^{2+} . W związku z wykazaniem we wcześniejszej publikacji współautorskiej brakiem aktywności jonów strontu Sr^{2+} (Szyszka et al. 2020) przypuszcza się, że w tym przypadku efekt antybakteryjny wynikał z substytucji grup fosforanowych grupami krzemianowymi SiO_4^{3-} (Rewak-soroczynska et al. 2022). Mechanizm odpowiadający za ten efekt nie jest jednak wyjaśniony. Apatyty krzemianowe wykazują działanie regeneracyjne wobec tkanki kostnej i chrzęstnej ze względu na wysoką bioaktywność (Shi et al. 2021). Główną rolą jonów strontu w badanych materiałach było zwiększenie rozpuszczania apatytów (Ravi et al. 2012) oraz poprawa ich właściwości mechanicznych (Shi et al. 2021).

Spośród badanych hydroksyapatytów domieszkowanych jonami metali przejściowych najwyższą aktywnością charakteryzowały się materiały z serii $\text{Ag}^+:\text{HAp}$ o czym świadczyła konieczność obniżenia stężenia materiałów w koloidach do 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ponieważ stężenia 50 i 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ powodowały całkowitą redukcję CFU/ml. W przypadku kompozytów z polimerem PTFE aktywność antybakteryjna nie była już tak duża, co wynikało ze zmniejszonej zawartości jonów Ag^+ i ich utrudnionego uwalniania (Targonska et al. 2020). Aktywność antybakteryjna i antybiofilmowa apatytów domieszkowanych jonami srebra wobec *P. aeruginosa* została wielokrotnie opisana w literaturze (Fielding et al. 2012; Tite et al. 2018; Kamonwannasit et al. 2020; Zawisza et al. 2020; MubarakAli et al. 2023). Jako jeden z mechanizmów aktywności takich materiałów wymienia się hamowanie aktywności poryny błony zewnętrznej OprF (Zhao et al. 2022). Również aktywność apatytów domieszkowanych jonami cynku (Venkatasubbu et al. 2011; Tank et al. 2014; Alioui et al. 2019) oraz miedzi (Simon et al. 2019; Kamonwannasit et al. 2020) wobec *P. aeruginosa* była wielokrotnie badana.

W kolejnej części rozprawy doktorskiej badano aktywność antybakteryjną jonów Cu^{2+} w połączeniu z jonami Eu^{3+} , co stanowiło syntezę badań nad aktywnością jonów lantanowców oraz wybranych jonów metali przejściowych bloku d układu okresowego pierwiastków. Niestety, wpływ jonów lantanowców na aktywność jonów miedzi nie był już tak prosty do interpretacji jak w przypadku antybiotyków. Obliczone wartości frakcyjnych stężeń hamujących (FIC) wskazywały na brak interakcji pomiędzy jonami, a analizując wartości skumulowanych OD_{600} widać było, że wzrost prób inkubowanych w obecności samych jonów Cu^{2+} nie różnił się znacznie od wzrostu prób z dodatkiem jonów Cu^{2+} i jonów Eu^{3+} . Można jednak zauważyć, że w przypadku wyższych stężeń miedzi (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,5MIC) dodatek europu praktycznie nie zmieniał jej aktywności, natomiast w przypadku niższych stężeń (12,5 oraz 6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dodatek jonów Eu^{3+} mógł zwiększać jej aktywność. Widoczne było to również na wykresach zmian gęstości optycznej w czasie, gdzie obserwowano, że dodatek europu mógł w niewielkim stopniu opóźnić wzrost i zmniejszać ostateczną gęstość hodowli po 48 h inkubacji. Zaobserwowano również, że w podłożu z dodatkiem jonów Eu^{3+} pojawiały się wytrącenia w postaci płatkowatych osadów, do których przyczepiały się komórki bakteryjne. Takie struktury nie były obserwowane w przypadku obecności samych jonów Cu^{2+} . Było to o tyle ciekawe, że strąty pojawiały się dopiero po kilkugodzinnym wytrząsaniu hodowli, dlatego zdecydowano się obejrzeć je w powiększeniu przy wykorzystaniu mikroskopu świetlnego oraz mikroskopu konfokalnego. Obserwacja pod

mikroskopem potwierdziła, że komórki bakteryjne przyczepiały się do osadów będących najprawdopodobniej nierozpuszczalnymi solami europu. Literatura opisuje przypadki wiązania jonów żelaza czy lantanu przez LPS, co skutkowało wytrąceniem osadów zawierających związki tych metali (Shephard et al. 2008). Może to wyjaśniać dlaczego osady pojawiały się jedynie po dodaniu bakterii do podłoża i były widoczne dopiero po osiągnięciu przez hodowlę odpowiedniej gęstości optycznej. Sugeruje to, że nie były one jedynie platformami, do których przyczepiały się komórki bakteryjne, ale powstawały z połączenia elementów komórkowych (LPS) z jonami metali.

Oprócz badania wpływu jonów Eu^{3+} na aktywność jonów Cu^{2+} w postaci roztworów oba kationy zostały wprowadzone do matrycy nanohydroksyapatytowej podczas syntezy metodą strąceniową i hydrotermalną. Analizy ICP wykazały, że zawartość wbudowanej domieszki znacznie się różniła w poszczególnych seriach, szczególnie w przypadku materiałów współdomieszkowanych oboma kationami, gdzie w związku otrzymanym metodą strąceniową wbudowało się prawie trzykrotnie więcej jonów Eu^{3+} i prawie siedmiokrotnie więcej jonów Cu^{2+} . Z kolei analizy uwalniania jonów do wybranych mediów wykazały, że materiały z serii hydrotermalnej uwalniały więcej jonów niż materiały z serii strąceniowej, biorąc pod uwagę % uwolnionych jonów w odniesieniu do ilości wbudowanej. Próbując znaleźć przyczynę tych różnic należy odwołać się do właściwości fizykochemicznych materiałów z obu serii. Analiza dyfraktogramów (**Rycina S.1.**) wskazuje, że materiały otrzymane metodą hydrotermalną charakteryzowały się wyższą krystalicznością niż materiały z serii strąceniowej. Ponadto pomimo większego rozmiaru ziaren wykazywały niższą tendencję do tworzenia agregatów, co można było zaobserwować na zdjęciu wykonanym techniką mikroskopii elektronowej SEM (**Rycina S.2.**). Może to stanowić wyjaśnienie lepszego uwalniania jonów z materiałów otrzymanych hydrotermalnie.

W ocenie wpływu nanocząstek na wzrost bakterii wykazano, że związki domieszkowane i współdomieszkowane jonami Cu^{2+} ograniczały wzrost hodowli w porównaniu z kontrolą. Obserwowane różnice pomiędzy seriami były natomiast zależne od ilości uwolnionej miedzi i na przykład materiał domieszkowany 5 mol% jonów Cu^{2+} otrzymany hydrotermalnie działał dużo lepiej wobec szczepu PAO1 niż wersja strąceniowa, ale uwalniał też ilościowo dwukrotnie więcej miedzi. Z kolei w przypadku materiału współdomieszkowanego europem i miedzią (5 mol% jonów Eu^{3+} , 5 mol% jonów Cu^{2+}) materiał otrzymany hydrotermalnie był mniej aktywny, ale ilość uwolnionej miedzi była

ponad dwukrotnie niższa. Wydaje się więc, że aktywność antybakteryjna obu serii była zbliżona, a wpływ jonów Eu^{3+} na aktywność jonów Cu^{2+} nie był znaczący. Obserwowano jednak, że po upływie 48 h gęstość hodowli bakteryjnych zwiększała się i różnice przestawały być tak duże. Z kolei w przypadku szczepu ATCC 27853 nie obserwowano istotnych różnic w przypadku materiałów domieszkowanych jonami Cu^{2+} , natomiast ciekawe jest to, że wszystkie hodowle, nawet te z dodatkiem czystego hydroksyapatytu, miały mniejszą gęstość optyczną niż hodowla kontrolna. Wskazuje to na inhibicyjny wpływ samych nanocząstek na tempo wzrostu bakterii. Interesującą jest również obserwacja, że po uwolnieniu jonów z materiałów do podłoża i dodania ich do hodowli bakteryjnych w postaci eluatów efekt antybakteryjny w przypadku szczepu PAO1 utrzymywał się także po 48 h. Może to być związane tym, że gdy w hodowli pozostawał nanomateriał mogło dochodzić do ponownej adsorpcji uwolnionych wcześniej jonów przez matrycę, w wyniku czego wraz z upływem czasu aktywność antybakteryjna była słabsza, co nie miało miejsca w przypadku eluatów (Garley et al. 2019; Ramdani et al. 2020). Efekt ten nie był natomiast identyczny kiedy jony zostały uwolnione do podłoża podczas 24 h uwalniania wstępnego, ale matryca pozostawała w hodowli. Uwalnianie wstępne miało na celu sprawdzenie czy istnieje różnica w efektywności działania nanocząstek apatyty, który miał wcześniej kontakt z podłożem. Taka przedłużona inkubacja materiału w pożywce prawdopodobnie pozwoliła na uwolnienie większej ilości jonów z hydroksyapatytów. Natomiast w przypadku materiałów nie poddanych wstępnej inkubacji uwalnianie jonów do podłoża zaczynało się dopiero „w sąsiedztwie” komórki bakteryjnej, dlatego ich stężenie mogło być niższe, podobnie jak obserwowana aktywność antybakteryjna. Przykładem może być materiał współdomieszkowany 5 mol% jonów Eu^{3+} i 5mol% jonów Cu^{2+} otrzymany hydrotermalnie, który po wcześniej inkubacji w podłożu działał istotnie lepiej wobec PAO1 ($\text{OD}_{600} = 0,7$) niż materiał bez wcześniejszego uwalniania ($\text{OD}_{600} = 0,82$). Obserwowany efekt wciąż jednak był dużo słabszy od odpowiadającego mu eluatu (OD_{600} około 0,2). Wskazuje to na istotność sposobu przygotowania materiału do badań. Ciekawe jest również to, że w przypadku wcześniej opisanego serii $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$ wykazano, że wyższą aktywność antybakteryjną miały koloidy, a nie eluaty z hydrożeli, pomimo porównywalnej ilości uwalnianych jonów (Sobierajska et al. 2021a). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że w przypadku tej serii materiały zawieszano w roztworze soli fizjologicznej za pomocą ultradźwięków (koloid), co pozwoliło na równomierne rozproszenie cząstek i rozbitcie aglomeratów, a w konsekwencji łatwiejsze uwalnianie jonów z matrycy dzięki zwiększeniu powierzchni kontaktu nanocząstek z elutentem (Vikash and Kumar 2020). Natomiast HAp

domieszkowane i współdomieszkowane jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} nie były poddawane działaniu ultradźwięków. Drugą różnicą było zastosowane stężenie. W przypadku materiałów $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$ wykorzystywano stężenia nanomateriałów równe maksymalnie 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, natomiast w przypadku materiałów z dodatkiem jonów Eu^{3+} i Cu^{2+} było to już 10 mg/ml . Trzecią różnicą natomiast było środowisko w jakim prowadzono doświadczenie (roztwór soli fizjologicznej dla $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$ i podłoże minimalne MOPS dla HAp z dodatkiem Eu^{3+} i Cu^{2+}). Te różnice sprawiają, że nie można wprost odnieść do siebie wyników uzyskanych dla tych grup materiałów i wyjaśnić dlaczego w serii $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$ lepiej działają nanocząstki (koloid), natomiast dla serii z dodatkiem jonów Eu^{3+} i Cu^{2+} - eluaty. Co ciekawe, literatura opisuje efekt antybakteryjny hydroksyapatytów domieszkowanych wyłącznie jonami Eu^{3+} w stężeniu 1 mg/ml wobec *P. aeruginosa*, natomiast podobnie jak w niniejszej rozprawie obserwowano jedynie zmniejszone OD_{600} w porównaniu z kontrolą, a nie całkowite zahamowanie wzrostu (Iconaru et al. 2013). W opublikowanych pracach zespołu Profesora Rafała Wiglusza badano niższe stężenia apatytów domieszkowanych jonami Eu^{3+} i nie wykazano ich aktywności antybakteryjnej (Wiglusz et al. 2015b; Sobierajska and Wiglusz 2019; Szyszka et al. 2020).

Analizując wpływ nanomateriałów na formowanie biofilmu można z kolei zauważyć, że związki domieszkowane jonami Cu^{2+} powodowały zabicie znacznej części komórek (czerwona fluorescencja), co było widoczne w przypadku obu szczepów. Nie były również widoczne znaczące różnice pomiędzy seriami a bakterie w obrazach mikroskopowych pozostawały rozproszone. Natomiast w przypadku materiału współdomieszkowanego było widać, że bakterie tworzyły duże, przestrzenne agregaty, złożone z zarówno żywych jak i martwych komórek, co było widoczne jedynie w przypadku serii strąceniowej. Co ciekawe, agregaty komórek nie były widoczne w hodowlach z dodatkiem materiału domieszkowanego wyłącznie jonami Eu^{3+} . Nie jest jasne dlaczego ten efekt był obserwowany głównie w serii strąceniowej, pomimo że z tych materiałów uwalnia się więcej jonów miedzi. Potwierdza to jednak hipotezę, że jony europu mają wpływ na aktywność antybakteryjną jonów miedzi, jeśli są dodane jako współdomieszki do nanomateriałów apatytowych. Przyczyną tworzenia się aglomeratów bakterii (*clumps*) mógł być niedobór substancji odżywczych (podłoże minimalne) lub stres oksydacyjny (obecność jonów metali). Mogło to prowadzić do wykształcenia się mechanizmów ochronnych polegających na agregacji komórek bakteryjnych. Takie agregaty mogły przyczepiać się do powierzchni nieożywionej tworząc mikrokolonie. W dalszym etapie do tych komórek mogły przyczepiać

się kolejne tworząc rozbudowane przestrzennie układy (Di Martino 2018). Można więc wnioskować, że powstawanie dużych agregatów komórkowych było objawem wysokiej toksyczności materiałów wobec komórek *P. aeruginosa*.

Ostatnim etapem było zbadanie cytotoksyczności hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Cu^{2+} i Eu^{3+} wobec linii komórkowej osteoblastów mysich. W tym przypadku zamiast nanomateriałów w formie sproszkowanej wykorzystano eluaty, ze względu na ich wysoką efektywność wobec bakterii. W przypadku testowania cytotoksyczności hydroksyapatytów używając eluatów, należy jednak brać pod uwagę możliwość wystąpienia „fałszywej” cytotoksyczności, jak opisano w artykule Klimek i wsp. (2016) (Klimek et al. 2016). Według autorów spadek żywotności linii komórkowych może wynikać z wychwytywania przez HAP z medium hodowlanego kluczowych do funkcjonowania komórki jonów: Ca^{2+} , Mg^{2+} i HPO_4^{2-} . Po inkubacji komórek w takim zubożonym medium przeżywalność komórek może spadać, ale nie jest to skutek cytotoksyczności nanomateriału tylko zmiany składu podłoża. Jeśli taki efekt się pojawi należy zastosować suplementację medium tymi jonami już po usunięciu HAP, a przed dodaniem go do komórek (Klimek et al. 2016). W niniejszej rozprawie nie zastosowano jednak tej modyfikacji, ponieważ zmiana składu jonowego podłoża znacznie wpływa na aktywność jonów metali ze względu na zachodzące interakcje ze składnikami pożywki, co opisano w publikacji Rewak-Soroczyńskiej i wsp. (2022) (Rewak-Soroczynska et al. 2022a). Przy analizie uzyskanych wyników należy jednak brać pod uwagę możliwość wystąpienia „fałszywej” cytotoksyczności i pomiary dla materiałów domieszkowanych powinny być odnoszone nie tylko do kontroli, ale również do niedomieszkowanego HAP. Analizując wyniki prezentowane w tej rozprawie można zaobserwować, że przeżywalność komórek po inkubacji w obecności eluatów była niższa w przypadku serii hydrotermalnej, natomiast te różnice nie zawsze były istotne statystycznie. W przypadku eluatów o najwyższym stężeniu apatyty (10 mg/ml) obserwowano wysoką toksyczność wszystkich materiałów z dodatkiem miedzi, natomiast w niższych stężeniach toksyczność była na średnim poziomie. Interesującą obserwacją jest wykazana cytotoksyczność otrzymanego hydrotermalnie materiału domieszkowanego wyłącznie jonami Eu^{3+} , która była na poziomie podobnym do materiałów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Cu^{2+} . Było to o tyle zaskakujące, że w przypadku badań antybakteryjnych nie odnotowano aktywności tego związku. Może to wynikać z faktu, że uwalnianie jonów europu (Eu^{3+}) do medium DMEM było w przypadku tego związku ponad 7-krotnie wyższe niż w medium MOPS, gdzie ilość

uwolnionych jonów europu w serii strąceniowej była w obu podłożach porównywalna. Dodatkowo seria hydrotermalna uwalniała ponad 3-krotnie więcej jonów Eu^{3+} w DMEM niż seria strąceniowa, co wyjaśnia różnice w toksyczności wobec komórek eukariotycznych. Ilość uwolnionych jonów miedzi ze związków domieszkowanych jonami Cu^{2+} z obu serii do DMEM była zbliżona, natomiast w przypadku związków współdomieszkowanych z serii strąceniowej uwalniało się ponad trzy razy więcej jonów Cu^{2+} . Odwrotnie było w przypadku jonów europu, który uwalniał się lepiej w serii hydrotermalnej. Cytotoksyczność hydroksyapatytów domieszkowanych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} jest stosunkowo dobrze scharakteryzowana. W dostępnych danych literaturowych w przypadku HAp:Eu^{3+} obserwowano wysoką kompatybilność wobec linii komórkowych MG-63 (komórki kostniakomięsaka), HeLa (komórki raka szyjki macicy) i HEK 293 (ludzkie komórki embrionalne nerki) oraz stosunkowo niską toksyczność wobec linii komórkowej fibroblastów HGF-1 (Tite et al. 2018). W przypadku materiałów domieszkowanych jonami Cu^{2+} odnotowana cytotoksyczność była zdecydowanie wyższa i już domieszka 1% jonów wywoływała niekorzystne efekty wobec fibroblastów mysich, ludzkich monocytów i ludzkich osteoblastów (Li et al. 2010; Tite et al. 2018). Jednak istnieją również doniesienia o pozytywnym wpływie hydroksyapatytów domieszkowanych jonami miedzi na osteoblasty oraz o regeneracyjnym potencjale kompozytów na bazie takich nanomateriałów (Ai et al. 2020; Arcos and Vallet-Regí 2020). Niską toksyczność wobec linii komórkowych wykazywały również niedomieszkowane apatyty (Szymonowicz et al. 2017). W przypadku hydroksyapatytów o ich toksyczności decydowało głównie zastosowane stężenie materiału (Baskar et al. 2017).

Drugim modelem, który wykorzystano do zbadania cytotoksyczności były erythrocyty baranie. W teście hemolizy nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy seriami, ale można było zaobserwować, że związki domieszkowane jedynie miedzią, szczególnie z serii hydrotermalnej, powodowały znaczny wyciek hemoglobiny z erythrocytów, z kolei w przypadku związków współdomieszkowanych nie było to już tak widoczne. Ponadto w przypadku nanomateriałów z dodatkiem jonów Cu^{2+} obserwowano przekształcenie się hemoglobiny do methemoglobiny, co objawiało się ciemnym zabarwieniem krwinek i supernatantu występującym po kilku dniach inkubacji. Methemoglobina jest pochodną hemoglobiny, w której wartościowość jonu żelaza zmienia się z +2 do +3, co uniemożliwia przyłączenie i transport tlenu, a w konsekwencji może prowadzić do niedotlenienia organizmu (Hajjimohammadi et al. 2022). Ogólnie można było zaobserwować, że wygląd

erytrocytów po inkubacji w obecności materiałów apatytowych zmienia się, nie zaobserwowano natomiast istotnych zmian morfologii erytrocytów pomiędzy materiałami ani pomiędzy seriami. Nie odnotowano również tak dużej aglutynacji krwinek, tak jak to miało miejsce w przypadku subinhibicyjnych stężeń jonów lantanowców. Warto jednak zwrócić uwagę na fakt, że niedomieszkowane hydroksyapatyty również powodowały hemolizę oraz zmiany w morfologii, co było szczególnie widoczne po dłuższej inkubacji (4 i 7 dni). Zgodnie z wcześniej publikowanymi danymi nanokryształy HAp mogą uszkadzać błony komórkowe erytrocytów prowadząc do wycieku hemoglobiny. Zależy to od czasu inkubacji, stężenia materiału i jego właściwości fizykochemicznych. W badaniach prowadzonych przez Elferinka i wsp. wykazano, że już 30 minutowa inkubacja erytrocytów w obecności 0,5 mg HAp powodowała uwolnienie hemoglobiny na poziomie przewyższającym 60%. Wyższe stężenia (10 mg/ml) wywoływały z kolei prawie całkowitą hemolizę (około 90%). Te badania były jednak prowadzone na erytrocytach ludzkich, które są bardziej podatne na uszkodzenia niż erytrocyty baranie (odpowiednio 72% i 16% uwalnianej hemoglobiny) (Elferink 1986). Wpływ stężenia na aktywność hemolityczną hydroksyapatytów badali również Palanivelu i Kumar, którzy wykazali, że stężenie 250 µg/ml HAp może powodować hemolizę na poziomie około 10%, natomiast stężenie 1 mg/ml już blisko 20% (Palanivelu and Ruban Kumar 2014). We wcześniej prowadzonych badaniach w zespole Profesora Rafała Wiglusza wykazano bezpieczeństwo stosowania nanomateriałów apatytowych w stężeniach do 0,1 mg/ml (Targonska et al. 2020; Sobierajska et al. 2021a; Nowak et al. 2022; Rewak-soroczynska et al. 2022). Kolejnym parametrem wpływającym na aktywność hemolityczną hydroksyapatytów może być również stosunek powierzchni cząstek do ich masy oraz poziom krystaliczności. Co ciekawe w tej samej pracy nie wykazano wpływu rozmiaru cząstek, stosunku Ca:P ani ładunku powierzchniowego cząstek (potencjału zeta) na właściwości hemolityczne (Wiessner et al. 1988). Źródła literaturowe opisują również poprzedzającą hemolizę agregację erytrocytów ludzkich podczas inkubacji w obecności hydroksyapatytu (Elferink 1986).

Niniejsza rozprawa doktorska opisuje jak obecność jonów lantanowców oraz jonów metali przejściowych, w formie wolnej oraz związanych w matrycy hydroksyapatytowej wpływa na wzrost i wirulencję bakterii *P. aeruginosa*. Wykazano, że jony Ln^{3+} mogą nasilać formowanie biofilmów, co może wynikać ze zmiany właściwości powierzchniowych komórek. Obserwowane efekty (zmniejszenie uwalniania eDNA i piocyjaniny oraz zmniejszenie wrażliwości na antybiotyki) mogą być wynikiem zmiany przepuszczalności

osłon komórkowych. Jony lantanowców mogą wpływać również na ruch bakterii typu *swimming*, *swarming* i *twitching*. Wyniki doświadczeń sugerują, że mogą istnieć mechanizmy adaptacji bakterii wobec wysokich stężeń jonów lantanowców. Pomimo, że wpływ obecności jonów europu na aktywność antybakteryjną jonów miedzi nie został wykazany, w przypadku nanomateriałów współdomieszkowanych tymi jonami, obserwuje się ciekawe efekty, np. zmianę morfologii biofilmów. Efekty cytotoksyczne wykazano głównie dla nanomateriałów z dodatkiem jonów Cu^{2+} . Pomimo, że wydaje się, że materiały z serii hydrotermalnej wykazują wyższą aktywność antybakteryjną i cytotoksyczność niż materiały z serii straceniowej, to ich efekty biologiczne wynikają głównie z ilości wbudowanych i uwalnianych do podłoża jonów.

Wiele efektów obserwowanych w niniejszej rozprawie wymaga potwierdzenia poprzez wykonanie dodatkowych badań z zastosowaniem technik, w tym molekularnych i genetycznych. Pozwoli to na wyjaśnienie mechanizmów odpowiadających za obserwowane zmiany zachodzące pod wpływem jonów lantanowców oraz testowanych nanomateriałów. Uzyskane wyniki pozwalają na wnioskować, że pomimo, że obecność jonów lantanowców istotnie wpływa na wirulencję i właściwości powierzchniowe komórek *P. aeruginosa* to mogą być one wykorzystywane jako domieszki w nanomateriałach o potencjalnym zastosowaniu w implantologii. Przemawia za tym zwłaszcza fakt, że ich stężenia w hydroksyapatytach są dużo niższe niż stężenia 0,5MIC, dla których obserwowano efekty przedstawione w niniejszej rozprawie.

VI. WNIOSKI

1. Jony lantanowców (od Ce^{3+} do Lu^{3+}) wykazują zbliżoną aktywność antybakteryjną wobec szczepów wzorcowych i klinicznych *P. aeruginosa*, na co wskazuje jednakowa wartość MIC (500 $\mu\text{g/ml}$), natomiast w stężeniach subinhibicyjnych (0,5 i 0,25MIC) nie wpływają istotnie na zahamowanie wzrostu bakterii.
2. Jony lantanowców w stężeniu 0,5MIC nasilają przyleganie bakterii do powierzchni płytek polistyrenowych oraz zwiększają grubość biofilmów. Intensywność tego zjawiska jest uzależniona od pozycji metalu w szeregu lantanowców (liczby atomowej) oraz od wielkości promienia jonowego.
3. Jony lantanowców wpływają na zmniejszenie przepuszczalności osłon komórkowych, co skutkuje spadkiem poziomu pirocyjaniny oraz eDNA w hodowli a także spadkiem wrażliwości bakterii na antybiotyki (gentamycynę i ciprofloksacynę) w obecności Ln^{3+} .
4. Jony lantanowców w stężeniach subinhibicyjnych wykazują toksyczność wobec erytrocytów poprzez wpływanie na morfologię i zlepianie komórek. Nie obserwuje się natomiast wycieku hemoglobiny, co również może wynikać ze zmiany przepuszczalności błony komórkowej, tak jak ma to miejsce w przypadku komórek bakteryjnych.
5. Na podstawie otrzymanych wyników nie określono czy hydrofobowość komórek istotnie zmienia się pod wpływem obecności jonów lantanowców, natomiast wykazano ich istotny wpływ na ładunek powierzchniowy (potencjał zeta), który wzrastał pod wpływem dodatku Ln^{3+} .
6. Jony lantanowców powodują zmniejszenie zdolności bakterii do ruchu typu *swimming* i *twitching* oraz zmieniają fenotyp stref wzrostu typu *swarming*. Określenie jaki mechanizm jest za to odpowiedzialny wymaga jednak dalszych badań.
7. Aktywność antybakteryjna jonów metali może zmieniać się w zależności od składników podłoża hodowlanego. W podłożach minimalnych wartości MIC są znacznie niższe niż w podłożach pełnych.
8. Obecność jonów Eu^{3+} nie wpływa na aktywność antybakteryjną jonów Cu^{2+} , gdy znajdują się w formie roztworów wodnych, natomiast dodatek jonów Eu^{3+} modyfikuje aktywność antybakteryjną hydroksyapatytów domieszkowanych jonami Cu^{2+} .

9. Jony Eu^{3+} dodane do podłoża powodują wytrącanie się osadu w kształcie płatków, do których adherują bakterie.
10. Aktywność antybakteryjna nanomateriałów zależy od ich formy, stężenia i warunków doświadczenia, takich jak zastosowane podłoże oraz fakt czy zostało przeprowadzone wstępne uwalnianie, które poprawia aktywność antybakteryjną.
11. Adhezja do tabletek wykonanych ze sprasowanych materiałów o strukturze apatytu jest słaba, co wynika głównie z ich gładkiej powierzchni, a nie z właściwości chemicznych materiału.
12. Aktywność antybakteryjna oraz cytotoksyczność nanomateriałów zależy przede wszystkim od ilości uwolnionych z matrycy jonów. Zauważono, że materiały otrzymane metodą hydrotermalną są bardziej aktywne wobec bakterii oraz wykazują większą toksyczność niż materiały otrzymane metodą strąceniową. Wynika to z ilości wbudowanych i uwolnionych jonów.
13. Ilość jonów uwolniona do medium DMEM znacznie przewyższa ilości jonów uwolnionych do podłoża MOPS, co może tłumaczyć wyższą cytotoksyczność materiałów wobec osteoblastów i erytrocytów niż wobec komórek bakteryjnych.
14. Obecność nanomateriałów współdomieszkowanych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} powoduje tworzenie aglomeratów bakteryjnych, natomiast w obecności materiałów domieszkowanych tylko jednym jonem komórki tworzą biofilmy, w których są bardziej równomiernie zadherowane do powierzchni płytki titracyjnej.
15. Wszystkie badane nanomateriały nasilają uwalnianie hemoglobiny z erytrocytów, a efekt ten postępuje w czasie. Materiały domieszkowane jonami miedzi powodują dodatkowo przekształcenie hemoglobiny do methemoglobiny.

VII. LITERATURA

1. Adams KF, Johnson G, Hornowski KE, Lineberger TH (1979) The effect of copper on erythrocyte deformability. A possible mechanism of hemolysis in acute copper intoxication. *550:279–287*
2. Ai F, Chen L, Yan J, Yang K, Li S, Duan H, Cao C, Li W, Zhou K (2020) Hydroxyapatite scaffolds containing copper for bone tissue engineering. *J Sol-Gel Sci Technol 95:168–179*. <https://doi.org/10.1007/s10971-020-05285-0>
3. Alexy T, Baskurt OK, Nemeth N, Uyklu M, Wenby RB, Meiselman HJ (2011) Effect of lanthanides on red blood cell deformability and response to mechanical stress: Role of lanthanide ionic radius. *Biorheology 48:173–183*. <https://doi.org/10.3233/BIR-2011-0589>
4. Alioui H, Bouras O, Bollinger JC (2019) Toward an efficient antibacterial agent: Zn- and Mg-doped hydroxyapatite nanopowders. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng 54:315–327*. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1550292>
5. Aminov RI (2010) A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol 1:1–7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
6. Amoroso AJ, Pope SJA (2015) Using lanthanide ions in molecular bioimaging. *Chem Soc Rev 44:4723–4742*. <https://doi.org/10.1039/c4cs00293h>
7. Andronescu E, Surugiu A, Badea ML, Ciobanu CS, Iosif A (2016) Antimicrobial Activity of Europium Doped Hydroxyapatite Powders After Immersion in Sbf Solution. *UPB Sci Bull, Ser B 78:147–154*
8. Arciola CR, Campoccia D (2018) Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol 16*. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0019-y>
9. Arcos D, Vallet-Regí M (2020) Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants. *J Mater Chem B 8:1781–1800*. <https://doi.org/10.1039/c9tb02710f>
10. Argüello JM, Raimunda D, Padilla-Benavides T (2013) Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front Cell Infect Microbiol 4:1–14*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00073>
11. Atlas RM (2004) *Handbook of Microbiological Media, Third Edit.* CRC Press, Bosa Roca, United States
12. Azam MW, Khan AU (2019) Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today 24:350–359*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>
13. Azelmad K, Hamadi F, Mimouni R, El boulandi A, Amzil K, Latrache H (2018) Physicochemical characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from catering substratum surface and investigation of their theoretical adhesion. *Surfaces and Interfaces 12:26–30*. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2018.04.004>

14. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, Desvaux M, Di Bonaventura G, Hébraud M, Jaglic Z, Kačániová M, Knøchel S, Lourenço A, Mergulhão F, Meyer RL, Nychas G, Simões M, Tresse O, Sternberg C (2017) Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* 43:313–351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
15. Bakht M, Alizadeh SA, Rahimi S, Kazemzadeh Anari R, Rostamani M, Javadi A, Peymani A, Marashi SMA, Nikkhahi F (2022) Phenotype and genetic determination of resistance to common disinfectants among biofilm-producing and non-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from clinical specimens in Iran. *BMC Microbiol* 22:1–16. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02524-y>
16. Bankier C, Matharu RK, Cheong YK, Ren GG, Cloutman-Green E, Ciric L (2019) Synergistic Antibacterial Effects of Metallic Nanoparticle Combinations. *Sci Rep* 9:3–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52473-2>
17. Baskar K, Anusuya T, Devanand Venkatasubbu G (2017) Mechanistic investigation on microbial toxicity of nano hydroxyapatite on implant associated pathogens. *Mater Sci Eng C* 73:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.060>
18. Begg SL (2019) The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens. *Biochem Soc Trans* 47:77–87. <https://doi.org/10.1042/BST20180275>
19. Behzadi P, Baráth Z, Gajdács M (2021) It's not easy being green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics* 10:1–29. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010042>
20. Bertini I, Gelis I, Katsaros N, Luchinat C, Provenzani A (2003) Tuning the affinity for lanthanides of calcium binding proteins. *Biochemistry* 42:8011–8021. <https://doi.org/10.1021/bi034494z>
21. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich L V., White RL (2002) Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44:363–366. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00473-X](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00473-X)
22. Braud A, Geoffroy V, Hoegy F, Mislin GLA, Schalk IJ (2010) Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environ Microbiol Rep* 2:419–425. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00126.x>
23. Brzyska W (1996) Lantanowce i aktynowce, Wydanie dr. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa
24. Burkes S, McCleskey CS (1947) Lanthanum Toxicity to Bacteria. 417–424
25. Busscher HJ, Weerkamp AH, van Der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J (1984)

- Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol* 48:980–983. <https://doi.org/10.1128/aem.48.5.980-983.1984>
26. Calomiris JJ, Armstrong JL, Seidler RJ (1984) Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. *Appl Environ Microbiol* 47:1238–1242. <https://doi.org/10.1128/aem.47.6.1238-1242.1984>
 27. Cao J, Lian R, Jiang X, Rogachev A V. (2021) In vitro degradation assessment of calcium fluoride-doped hydroxyapatite coating prepared by pulsed laser deposition. *Surf Coatings Technol* 416:127177. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2021.127177>
 28. Cerioli M, Batailler C, Conrad A, Roux S, Perpoint T, Becker A, Triffault-Fillit C, Lustig S, Fessy MH, Laurent F, Valour F, Chidiac C, Ferry T (2020) *Pseudomonas aeruginosa* Implant-Associated Bone and Joint Infections: Experience in a Regional Reference Center in France. *Front Med* 7:1–7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.513242>
 29. Chen G, Liang H (2020) A novel c-di-GMP signal system regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Cell* 7:160–161. <https://doi.org/10.15698/MIC2020.06.720>
 30. Chen L, Al-Bayatee S, Khurshid Z, Shavandi A, Brunton P, Ratnayake J (2021) Hydroxyapatite in oral care products—a review. *Materials (Basel)* 14. <https://doi.org/10.3390/ma14174865>
 31. Cheng Y, Liu M, Li R, Wang C, Bai C, Wang K (1999) Gadolinium induces domain and pore formation of human erythrocyte membrane: an atomic force microscopic study. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1421:249–260. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00125-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00125-X)
 32. Chugh KS (1975) Methemoglobinemia in Acute Copper Sulfate Poisoning. *Ann Intern Med* 82:226
 33. Ciobanu CS, Iconaru SL, Chifiriuc MC, Costescu A, Le Coustumer P, Predoi D (2013) Synthesis and antimicrobial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles. *Biomed Res Int* 2013:916218. <https://doi.org/10.1155/2013/916218>
 34. Ciobanu G, Maria Bargan A, Luca C (2015) New cerium(IV)-substituted hydroxyapatite nanoparticles: Preparation and characterization. *Ceram Int* 41:12192–12201. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.06.040>
 35. Coffey B, Anderson G (2014) Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. In: Filloux A, Ramos J-M (eds) *Pseudomonas Methods and Protocols*. Humana Press, New York, p 634
 36. Crespo LM, Novak TS, Freedman JC (1987) Calcium, cell shrinkage, and prolytic state of

- human red blood cells. *Am J Physiol - Cell Physiol* 252. <https://doi.org/10.1152/ajpccell.1987.252.2.c138>
37. Cuprys A, Pulicharla R, Lecka J, Brar SK, Drogui P, Surampalli RY (2018) Ciprofloxacin-metal complexes –stability and toxicity tests in the presence of humic substances. *Chemosphere* 202:549–559. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.117>
 38. Damien E, Revell PA (2004) Coralline hydroxyapatite bone graft substitute: A review of experimental studies and biomedical applications. *J Appl Biomater Biomech* 2:65–73. <https://doi.org/10.1177/228080000400200201>
 39. Das T, Manefield M (2012) Pyocyanin Promotes Extracellular DNA Release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046718>
 40. Das T, Sehar S, Koop L, Wong YK, Ahmed S, Siddiqui KS, Manefield M (2014) Influence of calcium in extracellular DNA mediated bacterial aggregation and biofilm formation. *PLoS One* 9:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091935>
 41. Davis SD, Iannetta A (1973) Relative antagonism in vitro of calcium in serum to the bactericidal activities of gentamicin and tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* 19:243–253. <https://doi.org/10.1159/000221461>
 42. De Kerchove AJ, Elimelech M (2008) Calcium and magnesium cations enhance the adhesion of motile and nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* on alginate films. *Langmuir* 24:3392–3399. <https://doi.org/10.1021/la7036229>
 43. Del Pozo JL, Patel R (2007) The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther* 82:204–209. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100247>
 44. Di Martino P (2018) Bacterial adherence: much more than a bond. *AIMS Microbiol* 4:563–566. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.563>
 45. Dlamini ZC, Langa RLS, Aiyegoro OA, Okoh AI (2019) Safety Evaluation and Colonisation Abilities of Four Lactic Acid Bacteria as Future Probiotics. *Probiotics Antimicrob Proteins* 11:397–402. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9430-y>
 46. Doll K, Jongstaphongpun KL, Stumpp NS, Winkel A, Stiesch M (2016) Quantifying implant-associated biofilms: Comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. *J Microbiol Methods* 130:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.016>
 47. Dorotkiewicz-Jach A, Augustyniak D, Olszak T, Drulis-Kawa Z (2015) Modern Therapeutic Approaches Against *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Curr Med Chem* 22:1642–1664. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150417122531>
 48. Dorotkiewicz-Jach A, Markwitz P, Drulis-Kawa Z (2021) The in vitro anti-pseudomonal activity of Cu²⁺, strawberry furanone, gentamicin, and lytic phages alone and in

- combination: Pros and cons. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22189830>
49. Elferink JGR (1986) Crystal-induced membrane damage: Hydroxyapatite crystal-induced hemolysis of erythrocytes. *Biochem Med Metab Biol* 36:25–35. [https://doi.org/10.1016/0885-4505\(86\)90103-9](https://doi.org/10.1016/0885-4505(86)90103-9)
 50. Evans CH (1983) Interesting and useful biochemical properties of lanthanides. *Trends Biochem Sci* 8:445–449. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(83\)90032-4](https://doi.org/10.1016/0968-0004(83)90032-4)
 51. Ferreyra Maillard APV, Espeche JC, Maturana P, Cutro AC, Hollmann A (2021) Zeta potential beyond materials science: Applications to bacterial systems and to the development of novel antimicrobials. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1863. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183597>
 52. Fielding GA, Roy M, Bandyopadhyay A, Bose S (2012) Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *Acta Biomater* 8:3144–3152. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.004>
 53. Forconi M, Herschlag D (2009) Metal ion-based RNA cleavage as a structural probe., 1st edn. Elsevier Inc.
 54. Fowler L, Engqvist H, Öhman-Mägi C (2019) Effect of copper ion concentration on bacteria and cells. *Materials (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/ma12223798>
 55. Francesko A, Petkova P, Tzanov T (2019) Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. *Curr Med Chem* 25:5782–5797. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170920161246>
 56. Franco D, Calabrese G, Guglielmino SPP, Conoci S (2022) Metal-Based Nanoparticles: Antibacterial Mechanisms and Biomedical Application. *Microorganisms* 10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091778>
 57. Fricker SP (2006) The therapeutic application of lanthanides. *Chem Soc Rev* 35:524–533. <https://doi.org/10.1039/b509608c>
 58. Galdino ACM, Viganor L, De Castro AA, Da Cunha EFF, Mello TP, Mattos LM, Pereira MD, Hunt MC, O’Shaughnessy M, Howe O, Devereux M, McCann M, Ramalho TC, Branquinha MH, Santos ALS (2019) Disarming *Pseudomonas aeruginosa* virulence by the inhibitory action of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based compounds: Elastase B (lasB) as a chemotherapeutic target. *Front Microbiol* 10:1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01701>
 59. Garley A, Hoff SE, Saikia N, Jamadagni S, Baig A, Heinz H (2019) Adsorption and Substitution of Metal Ions on Hydroxyapatite as a Function of Crystal Facet and Electrolyte pH. *J Phys Chem C* 123:16982–16993. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b02808>

60. Garner JP, Heppell PSJ (2005) Cerium nitrate in the management of burns. *Burns* 31:539–547. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2005.01.014>
61. Garza-Cervantes JA, Chávez-Reyes A, Castillo EC, García-Rivas G, Ortega-Rivera OA, Salinas E, Ortiz-Martínez M, Gómez-Flores SL, Peña-Martínez JA, Pepi-Molina A, Treviño-González MT, Zarate X, Cantú-Cárdenas ME, Escarcega-Gonzalez CE, Morones-Ramírez JR (2017) Synergistic antimicrobial effects of silver/transition-metal combinatorial treatments. *Sci Rep* 7:1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01017-7>
62. Giamarellou H, Antoniadou A (2001) Antipseudomonal antibiotics. *Med Clin North Am* 85:19–42. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(05\)70303-5](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(05)70303-5)
63. Giannousi K, Lafazanis K, Arvanitidis J, Pantazaki A, Dendrinou-Samara C (2014) Hydrothermal synthesis of copper based nanoparticles: Antimicrobial screening and interaction with DNA. *J Inorg Biochem* 133:24–32. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.12.009>
64. Gimeno M, Pinczowski P, Pérez M, Giorello A, Martínez MÁ, Santamaría J, Arruebo M, Luján L (2015) A controlled antibiotic release system to prevent orthopedic-implant associated infections: An in vitro study. *Eur J Pharm Biopharm* 96:264–271. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.007>
65. Guła G, Dorotkiewicz-Jach A, Korzekwa K, Valvano MA, Drulis-Kawa Z (2018) Complex Signaling Networks Controlling Dynamic Molecular Changes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *Curr Med Chem* 26:1979–1993. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180912110151>
66. Guragain M, King MM, Williamson KS, Pérez-Osorio AC, Akiyama T, Khanam S, Patrauchan MA, Franklin MJ (2016) The *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 two-component regulator CarSR regulates calcium homeostasis and calcium-induced virulence factor production through its regulatory targets CarO and CarP. *J Bacteriol* 198:951–963. <https://doi.org/10.1128/JB.00963-15>
67. Ha DG, Kuchma SL, O'Toole GA (2014a) Plate-based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol Biol* 1149:67–72. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_8
68. Ha DG, Kuchma SL, O'Toole GA (2014b) Plate-based assay for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. pp 59–65
69. Hajimohammadi S, Gharibi S, Pourbarkhordar V, Mousavi SR, Salmani Izadi H (2022) Acute poisoning of copper sulfate: a case report and review literature. *Egypt J Intern Med*

34. <https://doi.org/10.1186/s43162-022-00168-y>
70. Halder S, Yadav KK, Sarkar R, Mukherjee S, Saha P, Haldar S, Karmakar S, Sen T (2015) Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *Springerplus* 4:1–14. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1476-7>
71. Hasegawa M, Ohmagari H, Tanaka H, Machida K (2022) Luminescence of lanthanide complexes: From fundamental to prospective approaches related to water- and molecular-stimuli. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev* 50:100484. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2022.100484>
72. Hasman H, Bjerrum MJ, Christiansen LE, Bruun Hansen HC, Aarestrup FM (2009) The effect of pH and storage on copper speciation and bacterial growth in complex growth media. *J Microbiol Methods* 78:20–24. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.03.008>
73. Henderson PJF, Maher C, Elbourne LDH, Eijkelkamp BA, Paulsen IT, Hassan KA (2021) Physiological Functions of Bacterial “multidrug” Efflux Pumps. *Chem Rev* 121:5417–5478. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01226>
74. Hobman JL, Crossman LC (2015) Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J Med Microbiol* 64:471–497. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.023036-0>
75. Hoegy F., Mislin GLA, Schalk IJ (2014) Pyoverdine and Pyochelin Measurements. In: Filloux A., Ramos JL. *Pseudomonas Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*
76. Hoff JC, Akin EW (1986) Microbial Resistance to Disinfectants: Mechanisms and Significance. 69:7–13. <https://doi.org/10.1289/ehp.86697>
77. Hoseinzadeh E, Makhdoumi P, Taha P, Hossini H, Pirsaeheb M, Omid Rastegar S, Stelling J (2017) A review of available techniques for determination of nano-antimicrobials activity. *Toxin Rev* 36:18–32. <https://doi.org/10.1080/15569543.2016.1237527>
78. Huszczyński SM, Lam JS, Khursigara CM (2020) The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. *Pathogens* 9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010006>
79. Iconaru SL, Motelica-Heino M, Predoi D (2013) Study on europium-doped hydroxyapatite nanoparticles by fourier transform infrared spectroscopy and their antimicrobial properties. *J Spectrosc* 1. <https://doi.org/10.1155/2013/284285>
80. Ionescu A, Wutscher E, Brambilla E, Schneider-Feyrer S, Giessibl FJ, Hahnel S (2012) Influence of surface properties of resin-based composites on in vitro *Streptococcus mutans* biofilm development. *Eur J Oral Sci* 120:458–465. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2012.00983.x>

81. Jain SN, Vishwanatha T, Reena V, Divyashree BC, Sampath A, Siddhalingeswara KG, Venugopal N, Ramesh I (2011) Antibiotic Synergy Test: Checkerboard Method on Multidrug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. *Int Res J Pharm* 2:196–198
82. Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S (2014) Pyocyanin: Production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol* 30:1159–1168. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1552-5>
83. Jiang Y, Yuan Z, Huang J (2019) Substituted hydroxyapatite: a recent development. *Mater Technol* 00:1–12. <https://doi.org/10.1080/10667857.2019.1664096>
84. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S (2021) *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int J Mol Sci* 22:1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
85. Kamali E, Jamali A, Ardebili A, Ezadi F, Mohebbi A (2020) Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Res Notes* 13:4–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4890-z>
86. Kamonwannasit S, Futralan CM, Khemthong P, Butburee T, Karaphun A, Phatai P (2020) Synthesis of copper-silver doped hydroxyapatite via ultrasonic coupled sol-gel techniques: structural and antibacterial studies. *J Sol-Gel Sci Technol* 96:452–463. <https://doi.org/10.1007/s10971-020-05407-8>
87. Karballaei Mirzahosseini H, Hadadi-Fishani M, Morshedi K, Khaledi A (2020) Meta-Analysis of Biofilm Formation, Antibiotic Resistance Pattern, and Biofilm-Related Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Clinical Samples. *Microb Drug Resist* 26:815–824. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0274>
88. Kenny MA, Pollock HM, Minshew BH, Casillas E, Schoenknecht FD (1980) Cation components of Mueller-Hinton agar affecting testing of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 17:55–62. <https://doi.org/10.1128/AAC.17.1.55>
89. Khan I, Saeed K, Khan I (2019) Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab J Chem* 12:908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
90. Kim M, Weigand M, S O, Hatt J, Krishnan R, Tezel U, Pavlostathis S, Konstantinidis K (2018) Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol* 84:1–37. <https://doi.org/doi:10.1128/aem.01201-18>
91. King M, Kayastha B, Franklin M, Patrauchan M (2020) Calcium Regulation of Bacterial Virulence. In: Md. Shahidul Islam (ed) *Calcium Signaling*, Second Edition, Second Edi.

Springer Nature Switzerland, pp 1–540

92. Kırmusaoglu S (2019) The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. *Antimicrob Antibiot Resist Antibiofilm Strateg Act Methods* 1–17. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84411>
93. Klasen HJ (2000) Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 26:117–130
94. Klimek K, Belcarz A, Pazik R, Sobierajska P, Han T, Wiglusz RJ, Ginalska G (2016) “false” cytotoxicity of ions-adsorbing hydroxyapatite - Corrected method of cytotoxicity evaluation for ceramics of high specific surface area. *Mater Sci Eng C* 65:70–79. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.105>
95. Kolmas J, Groszyk E, Kwiatkowska-Różycka D (2014) Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties. *Biomed Res Int* 2014:1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/178123>
96. Komiyama M, Takeda N, Shigekawa H (1999) Hydrolysis of DNA and RNA by lanthanide ions: Mechanistic studies leading to new applications. *Chem Commun* 1443–1451. <https://doi.org/10.1039/a901621j>
97. Kondaveeti S, Bueno PV de A, Carmona-Ribeiro AM, Esposito F, Lincopan N, Sierakowski MR, Petri DFS (2018) Microbicidal gentamicin-alginate hydrogels. *Carbohydr Polym* 186:159–167. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.044>
98. Kónig-Péter A, Kilar F, Pernyeszi T (2019) Copper(II) biosorption characteristics of lyophilized and thermally treated *Pseudomonas* cells. *Environ Eng Manag J* 18:455–464. <https://doi.org/10.30638/eemj.2019.043>
99. Körstgens V, Flemming HC, Wingender J, Borchard W (2001) Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci Technol* 43:49–57. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0338>
100. Kumar A, Ali M, Ningthoujam RS, Gaikwad P, Kumar M, Nath BB, Pandey BN (2016) The interaction of actinide and lanthanide ions with hemoglobin and its relevance to human and environmental toxicology. *J Hazard Mater* 307:281–293. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.029>
101. Kurincic M, Jersek B, Klancnik A, Mozina SS, Fink R, Drazic G, Raspor P, Bohinc K (2016) Effects of natural antimicrobials on bacterial cell hydrophobicity, adhesion, and zeta potential. *Arh Hig Rada Toksikol* 67:39–45. <https://doi.org/10.1515/aiht-2016-67-2720>
102. LaBauve AE, Wargo, Matthew J (2015) Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protoc Microbiol* May:1–11. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06e01s25.Growth>

103. Lara HH, Garza-Treviño EN, Ixtapan-Turrent L, Singh DK (2011) Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *J. Nanobiotechnology* 9:30
104. Le Fur M, Beyler M, Le Poul N, Lima LMP, Le Mest Y, Delgado R, Platas-Iglesias C, Patinec V, Tripier R (2016) Improving the stability and inertness of Cu(II) and Cu(I) complexes with methylthiazolyl ligands by tuning the macrocyclic structure. *Dalt Trans* 45:7406–7420. <https://doi.org/10.1039/c6dt00385k>
105. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ (2013) Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol* 11:371–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>
106. Li B, Webster TJ (2018) Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. *J Orthop Res* 36:22–32. <https://doi.org/10.1002/jor.23656>
107. Li M, Kang ET, Chua KL, Neoh KG (2019) Sugar-powered nanoantimicrobials for combating bacterial biofilms. *Biomater Sci* 7:2961–2974. <https://doi.org/10.1039/c9bm00471h>
108. Li M, Zhu L, Lin D (2011) Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: Mechanism and the influence of medium components. *Environ Sci Technol* 45:1977–1983. <https://doi.org/10.1021/es102624t>
109. Li Y, Ho J, Ooi CP (2010) Antibacterial efficacy and cytotoxicity studies of copper (II) and titanium (IV) substituted hydroxyapatite nanoparticles. *Mater Sci Eng C* 30:1137–1144. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.06.011>
110. Li Z, Lu S, Li X, Chen Z, Xueyuan C (2023) Lanthanide Upconversion Nanoplatforms for Advanced Bacteria-Targeted Detection and Therapy. *Adv Opt Mater* 2202386:1–19. <https://doi.org/10.1002/adom.202202386>
111. Liao C, Huang X, Wang Q, Yao D, Lu W (2022) Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 12:1–17. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758>
112. Liu Q, Feng W, Li F (2014) Water-soluble lanthanide upconversion nanophosphors: Synthesis and bioimaging applications in vivo. *Coord Chem Rev* 273–274:100–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.004>
113. Liu Q, Sun Y, Yang T, Feng W, Li C, Li F (2011) Sub-10 nm hexagonal lanthanide-doped NaLuF₄ upconversion nanocrystals for sensitive bioimaging in vivo. *J Am Chem Soc* 133:17122–17125. <https://doi.org/10.1021/ja207078s>
114. Liu Z, Gan L, Liu D, Rong H, Feng Y, Liu D-E (2022) Advances in the study of adhesion

behavior between bacteria and material interfaces. *Authorea* 1–20

115. Ma HHM, Chiu FCK, Li RC (1997) Mechanistic investigation of the reduction in antimicrobial activity of ciprofloxacin by metal cations. *Pharm. Res.* 14:366–370
116. Mahdavinia GR, Karimi MH, Soltaniniya M, Massoumi B (2019) In vitro evaluation of sustained ciprofloxacin release from κ -carrageenan-crosslinked chitosan/hydroxyapatite hydrogel nanocomposites. *Int J Biol Macromol* 126:443–453. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.240>
117. Manaargadoo-Catin M, Ali-Cherif A, Pougna JL, Perrin C (2016) Hemolysis by surfactants - A review. *Adv Colloid Interface Sci* 228:1–16. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.10.011>
118. Martin NL, Beveridge TJ (1986) Gentamicin interaction with *Pseudomonas aeruginosa* cell envelope. *Antimicrob Agents Chemother* 29:1079–1087. <https://doi.org/10.1128/AAC.29.6.1079>
119. Martin RB, Richardson FS (1979) Lanthanides as probes for calcium in biological systems. *Q Rev Biophys* 12:181–209. <https://doi.org/10.1017/S0033583500002754>
120. Mishra P, Sharma RK (2008) Gentamicin complexes of cobalt(II), nickel(II), cadmium(II) and tin(II). *Main Gr Chem* 7:83–95. <https://doi.org/10.1080/10241220802197469>
121. Misra SN, Gagnani MA, Indira DM, Shukla RS (2004) Biological and clinical aspects of lanthanide coordination compounds. *Bioinorg Chem Appl* 2:155–192. <https://doi.org/10.1155/S1565363304000111>
122. Mittapally S, Taranum R, Parveen S (2018) Metal ions as antibacterial agents. *J Drug Deliv Ther* 8:411–419. <https://doi.org/10.22270/jddt.v8i6-s.2063>
123. Mocanu A, Cadar O, Frangopol PT, Petean I, Tomoaia G, Paltinean GA, Racz CP, Horovitz O, Tomoaia-Cotisel M (2021) Ion release from hydroxyapatite and substituted hydroxyapatites in different immersion liquids: In vitro experiments and theoretical modelling study. *R Soc Open Sci* 8. <https://doi.org/10.1098/rsos.201785>
124. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA (2017) *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
125. MubarakAli D, Arunachalam K, Lakshmanan M, Badar B, Kim JW, Lee SY (2023) Unveiling the Anti-Biofilm Property of Hydroxyapatite on *Pseudomonas aeruginosa*: Synthesis and Strategy. *Pharmaceutics* 15:1–9. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020463>
126. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR (2019) Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front*

Microbiol 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>

127. Mutalik C, Lin IH, Krisnawati DI, Khaerunnisa S, Widodo, Hsiao YC, Kuo TR, Khafid M (2022) Antibacterial Pathways in Transition Metal-Based Nanocomposites: A Mechanistic Overview. *Int J Nanomedicine* 17:6821–6842. <https://doi.org/10.2147/IJN.S392081>
128. Nowak N, Czekanowska D, Reeks JM, Wiglusz RJ (2022) Structural, Spectroscopic, and Biological Characterization of Novel Rubidium(I) and Europium(III) Co-Doped Nano-Hydroxyapatite Materials and Their Potential Use in Regenerative Medicine. *Nanomaterials* 12. <https://doi.org/10.3390/nano12244475>
129. Ofudje EA, Adeogun AI, Idowu MA, Kareem SO (2019) Synthesis and characterization of Zn-Doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies. *Heliyon* 5:e01716. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01716>
130. Ogurusu T, Wakabayashi S, Shigekawa M (1991) Functional Characterization of Lanthanide Binding Sites in the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase: Do Lanthanide Ions Bind to the Calcium Transport Site? *Biochemistry* 30:9966–9973. <https://doi.org/10.1021/bi00105a022>
131. Olsen I (2015) Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34:877–886
132. Olson JC, Ohman DE (1992) Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions. *J Bacteriol* 174:4140–4147. <https://doi.org/10.1128/jb.174.12.4140-4147.1992>
133. Palanivelu R, Ruban Kumar A (2014) Synthesis, characterization, in vitro anti-proliferative and hemolytic activity of hydroxyapatite. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 127:434–438. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.02.106>
134. Panlilio H, Rice C V. (2021) The role of extracellular DNA in the formation, architecture, stability, and treatment of bacterial biofilms. *Biotechnol Bioeng* 118:2129–2141. <https://doi.org/10.1002/bit.27760>
135. Parija SC (2009) *Textbook of Microbiology & Immunology*. Elsevier India
136. Poole K (2017) At the Nexus of Antibiotics and Metals: The Impact of Cu and Zn on Antibiotic Activity and Resistance. *Trends Microbiol* 25:820–832. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.04.010>
137. Pormohammad A, Turner RJ (2020) Silver antibacterial synergism activities with eight other metal(Loid)-based antimicrobials against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* 9:1–19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120853>
138. Predoi D, Iconaru SL, Predoi MV, Motelica-heino M, Guegan R, Buton N Evaluation of Antibacterial Activity of Zinc-Doped Hydroxyapatite Colloids and Dispersion Stability

Using Ultrasounds. <https://doi.org/10.3390/nano9040515>

139. Priyadarshini B, Anjaneyulu U, Vijayalakshmi U (2017) Preparation and characterization of sol-gel derived Ce⁴⁺ doped hydroxyapatite and its in vitro biological evaluations for orthopedic applications. *Mater Des* 119:446–455. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.01.095>
140. Puram S, Rawat K, Tyagi A, Verma AK, Bohidar HB (2015) Physical, antimicrobial and cytotoxic characterisation of LaF₃:Eu³⁺ ion doped nanocrystals. *Int J Nanoparticles* 8:184–200. <https://doi.org/10.1504/IJNP.2015.071756>
141. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, Liang H, Song X, Wu M (2022) *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 7:1–27. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
142. Ramdani A, Taleb Z, Guendouzi A, Kadeche A, Herbache H, Mostefai A, Taleb S, Deratani A (2020) Mechanism study of metal ion adsorption on porous hydroxyapatite: Experiments and modeling. *Can J Chem* 98:79–89. <https://doi.org/10.1139/cjc-2019-0315>
143. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M (2015) The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *Biomed Res Int* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
144. Rathnayake IVN, Megharaj M, Krishnamurti GSR, Bolan NS, Naidu R (2013) Heavy metal toxicity to bacteria - Are the existing growth media accurate enough to determine heavy metal toxicity? *Chemosphere* 90:1195–1200. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.036>
145. Ravi ND, Balu R, Sampath Kumar TS (2012) Strontium-substituted calcium deficient hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, characterization, and antibacterial properties. *J. Am. Ceram. Soc.* 95:2700–2708
146. Ressler A, Žužić A, Ivanišević I, Kamboj N, Ivanković H (2021) Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review. *Open Ceram* 6. <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2021.100122>
147. Rewak-Soroczynska J, Dorotkiewicz-Jach A, Drulis-Kawa Z (2022a) Culture Media Composition Influences the Antibacterial Effect of Silver, Cupric, and Zinc Ions against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomolecules*. 2022 Jul 9;12(7):963. doi: 10.3390/biom12070963
148. Rewak-Soroczynska J, Dorotkiewicz-Jach A, Wiglusz RJ (2022b) Przegląd badań aktywności biologicznych jonów lantanowców. In: Danielewska A, Maciąg M (eds) *Postępy*

w naukach przyrodniczych: stan obecny i perspektywy. Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., Lublin, 162–167

149. Rewak-soroczynska J, Nowak N, Targonska S, Piecuch A (2022) The Study of Nanosized Silicate-Substituted Hydroxyapatites Co-Doped with Sr²⁺ and Zn²⁺ Ions Related to Their Influence on Biological Activities. 6229–6246
150. Rewak-soroczynska J, Sobierajska P, Targonska S, Piecuch A, Grosman L, Rachuna J, Wasik S, Arabski M, Ogorek R, Wiglusz RJ (2021) New approach to antifungal activity of fluconazole incorporated into the porous 6-anhydro- α -l-galacto- β -d-galactan structures modified with nanohydroxyapatite for chronic-wound treatments—in vitro evaluation. *Int J Mol Sci* 22:1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22063112>
151. Rim KT, Koo KH, Park JS (2013) Toxicological evaluations of rare earths and their health impacts to workers: A literature review. *Saf Health Work* 4:12–26. <https://doi.org/10.5491/SHAW.2013.4.1.12>
152. Rizzo G, Lo Presti M, Giannini C, Sibillano T, Milella A, Guidetti G, Musio R, Omenetto FG, Farinola GM (2021) Bombyx mori Silk Fibroin Regeneration in Solution of Lanthanide Ions: A Systematic Investigation. *Front Bioeng Biotechnol* 9:1–15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.653033>
153. Rosenberg M (1984) Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* 22:289–295. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb00743.x>
154. Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, Marvig RL, Haagenen JAJ, Sommer LM, Molin S, Johansen HK (2021) *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nat Rev Microbiol* 19:331–342. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00477-5>
155. Rudawska A, Jacniacka E (2009) Analysis for determining surface free energy uncertainty by the Owen-Wendt method. *Int J Adhes Adhes* 29:451–457. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2008.09.008>
156. Rust L, Messing C, Iglewski B (1994) Elastase assays. *Methods Enzym* 235:554–62. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35170-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35170-8).
157. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A (2013) Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater* 9:7591–7621. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>
158. Sarkisova S, Patrauchan MA, Berglund D, Nivens DE, Franklin MJ (2005) Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas*

- aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 187:4327–4337. <https://doi.org/10.1128/JB.187.13.4327-4337.2005>
159. Shah AR, Kennedy PM (2018) The Aging Face. *Med Clin North Am* 102:1041–1054. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.06.006>
 160. Shephard J, McQuillan AJ, Bremer PJ (2008) Mechanisms of cation exchange by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and PAO1 wbpL, a strain with a truncated lipopolysaccharide. *Appl Environ Microbiol* 74:6980–6986. <https://doi.org/10.1128/AEM.01117-08>
 161. Shi H, Zhou Z, Li W, Fan Y, Li Z, Wei J (2021) Hydroxyapatite based materials for bone tissue engineering: A brief and comprehensive introduction. *Crystals* 11:1–18. <https://doi.org/10.3390/cryst11020149>
 162. Simon AT, Dutta D, Chattopadhyay A, Ghosh SS (2019) Copper Nanocluster-Doped Luminescent Hydroxyapatite Nanoparticles for Antibacterial and Antibiofilm Applications. *ACS Omega* 4:4697–4706. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03076>
 163. Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H (2017) Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology* 15:1–20. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>
 164. Sobek JM, Talburt DE (1968) Effects of the rare earth cerium on *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 95:47–51. <https://doi.org/10.1128/jb.95.1.47-51.1968>
 165. Sobierajska P, Dorotkiewicz-Jach A, Zawisza K, Okal J, Olszak T, Drulis-Kawa Z, Wiglusz RJ (2018) Preparation and antimicrobial activity of the porous hydroxyapatite nanoceramics. *J Alloys Compd* 748:179–187. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.03.162>
 166. Sobierajska P, Nowak N, Rewak-Soroczynska J, Targonska S, Lewińska A, Grosman L, Wiglusz RJ (2021a) Investigation of topography effect on antibacterial properties and biocompatibility of nanohydroxyapatites activated with zinc and copper ions: In vitro study of colloids, hydrogel scaffolds and pellets. *Mater Sci Eng C* 134. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112547>
 167. Sobierajska P, Pozniak B, Tikhomirov M, Miller J, Mrowczynska L, Piecuch A, Rewak-Soroczynska J, Dorotkiewicz-Jach A, Drulis-Kawa Z, Wiglusz RJ (2021b) Multifunctionality of nanosized calcium apatite dual-doped with Li⁺ /Eu³⁺ ions related to cell culture studies and cytotoxicity evaluation in vitro. *Biomolecules* 11. <https://doi.org/10.3390/biom11091388>
 168. Sobierajska P, Wiglusz RJ (2019) Influence of Li⁺ ions on the physicochemical properties of nanocrystalline calcium-strontium hydroxyapatite doped with Eu³⁺ ions. *New J Chem*

43:14908–14916. <https://doi.org/10.1039/c9nj03003d>

169. Song F, Koo H, Ren D (2015) Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. *J Dent Res* 94:1027–1034. <https://doi.org/10.1177/0022034515587690>
170. Switzer ME (1978) The lanthanide ions as probes of calcium ion binding sites in biological systems. *Sci Prog* 65:19–30
171. Sykes JE (2014) Gram-negative Bacterial Infections. In: *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier Inc., pp 355–363
172. Szymonowicz M, Korczynski M, Dobrzynski M, Zawisza K, Mikulewicz M, Karuga-Kuzniewska E, Zywicka B, Rybak Z, Wiglusz RJ (2017) Cytotoxicity evaluation of high-temperature annealed nanohydroxyapatite in contact with fibroblast cells. *Materials (Basel)* 10. <https://doi.org/10.3390/ma10060590>
173. Szyszka K, Rewak-Soroczynska J, Dorotkiewicz-Jach A, Ledwa KA, Piecuch A, Giersig M, Drulis-Kawa Z, Wiglusz RJ (2020) Structural modification of nanohydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ related to Eu^{3+} and Sr^{2+} ions doping and its spectroscopic and antimicrobial properties. *J Inorg Biochem* 203:110884. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110884>
174. Szyszka K, Targońska S, Lewińska A, Watras A, Wiglusz RJ (2021) Quenching of the Eu^{3+} luminescence by Cu^{2+} ions in the nanosized hydroxyapatite designed for future bio-detection. *Nanomaterials* 11:1–17. <https://doi.org/10.3390/nano11020464>
175. Tank KP, Chudasama KS, Thaker VS, Joshi MJ (2014) Pure and zinc doped nanohydroxyapatite : Synthesis , characterization , antimicrobial and hemolytic studies. *J Cryst Growth* 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2014.01.062>
176. Tarawneh A Al, Qaralleh H, Al-limoun MO, Khleifat KM (2019) Effect of Copper Chemical Form on The Growth of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burned Patients and on Its Cu Uptake. *J basic appl Res biomed* 5:107–114
177. Targonska S, Dobrzynska-Mizera M, Wujczyk M, Rewak-Soroczynska J, Knitter M, Dopierala K, Andrzejewski J, Wiglusz RJ (2022) New way to obtain the poly(L-lactide-co-D,L-lactide) blend filled with nanohydroxyapatite as biomaterial for 3D-printed bone-reconstruction implants. *Eur Polym J* 165:110997. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.110997>
178. Targonska S, Rewak-Soroczynska J, Piecuch A, Paluch E, Szymanski D, Wiglusz RJ (2020) Preparation of a New Biocomposite Designed for Cartilage Grafting with Antibiofilm Activity. *ACS Omega* 5:24546–24557. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03044>
179. Teitzel GM, Parsek MR (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic

- Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 69:2313–2320. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003>
180. Terzioğlu E, Arslan M, Balaban BG, Çakar ZP (2022) Microbial silver resistance mechanisms: recent developments. World J Microbiol Biotechnol 38:1–17. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03341-1>
181. Texier AC, Andrés Y, Illemassene M, Le Cloirec P (2000) Characterization of lanthanide ions binding sites in the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Sci Technol 34:610–615. <https://doi.org/10.1021/es990668h>
182. Tite T, Popa AC, Balescu LM, Bogdan IM, Pasuk I, Ferreira JMF, Stan GE (2018) Cationic substitutions in hydroxyapatite: Current status of the derived biofunctional effects and their in vitro interrogation methods. Materials (Basel) 11:1–62. <https://doi.org/10.3390/ma11112081>
183. Turnbull L, Whitchurch CB (2014) Motility assay: Twitching motility. Methods Mol Biol 1149:73–86. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_9
184. Uivarosi V (2013) Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: An update. Molecules 18:11153–11197. <https://doi.org/10.3390/molecules180911153>
185. Vaidya M, McBain AJ, Banks CE, Whitehead KA (2019) Single and combined antimicrobial efficacies for nine metal ion solutions against *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Enterococcus faecium*. Int Biodeterior Biodegrad 141:39–43. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.06.017>
186. Vaidya MY, McBain AJ, Butler JA, Banks CE, Whitehead KA (2017) Antimicrobial Efficacy and Synergy of Metal Ions against *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Planktonic and Biofilm Phenotypes. Sci Rep 7:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05976-9>
187. Venkatasubbu GD, Ramasamy S, Ramakrishnan V (2011) Investigations on Zinc Doped Nanocrystalline Hydroxyapatite. Int. J. Nanosci. Nanotechnol. 2:1–23
188. Vikash, Kumar V (2020) Ultrasonic-assisted de-agglomeration and power draw characterization of silica nanoparticles. Ultrason Sonochem 65:105061. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105061>
189. Vimbela G V., Ngo SM, Frazee C, Yang L, Stout DA (2017) Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. Int J Nanomedicine 12:3941–3965. <https://doi.org/10.2147/IJN.S134526>
190. Visca P, Imperi F, Lamont IL (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. Trends Microbiol 15:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.004>

191. Wakabayashi T, Ymamamoto A, Kazaana A, Nakano Y, Nojiri Y, Kashiwazaki M (2016) Antibacterial, Antifungal and Nematicidal Activities of Rare Earth Ions. *Biol Trace Elem Res* 174:464–470. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0727-y>
192. Wang K, Li R, Cheng Y, Zhu B (1999) Lanthanides - The future drugs? *Coord Chem Rev* 190–192:297–308. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00072-7)
193. Wang L, Hu C (2017) The antimicrobial activity of nanoparticles : present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine*, 12:1227–1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>.
194. Wang T, Flint S, Palmer J (2019a) Magnesium and calcium ions: roles in bacterial cell attachment and biofilm structure maturation. *Biofouling* 35:959–974. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1674811>
195. Wang Y, Li X, Chen M, Zhao Y, You C, Li Y, Chen G (2019b) In Vitro and in Vivo Degradation Behavior and Biocompatibility Evaluation of Microarc Oxidation-Fluoridated Hydroxyapatite-Coated Mg-Zn-Zr-Sr Alloy for Bone Application. *ACS Biomater Sci Eng* 5:2858–2876. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00564>
196. Wenhua L, Ruming Z, Zhixiong X, Xiangdong C, Ping S (2003) Effects of La³⁺ on growth, transformation, and gene expression of *Escherichia coli*. *Biol Trace Elem Res* 94:167–177. <https://doi.org/10.1385/BTER:94:2:167>
197. Wiessner J, Mandel G, Halverson P, Mandel N (1988) The effect of hydroxyapatite crystallinity on hemolysis. *Calcif Tissue Int* 42:210–219. <https://doi.org/10.1007/BF02553746>
198. Wiglusz RJ, Drulis-Kawa Z, Pazik R, Zawisza K, Dorotkiewicz-Jach A, Roszkowiak J, Nedelec JM (2015a) Multifunctional lanthanide and silver ion co-doped nano-chlorapatites with combined spectroscopic and antimicrobial properties. *Dalt Trans*. <https://doi.org/10.1039/c5dt00046g>
199. Wilton M, Wong MJQ, Tang L, Liang X, Moore R, Parkins MD, Lewenza S, Dong TG (2016) Chelation of membrane-bound cations by extracellular DNA activates the type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 84:2355–2361. <https://doi.org/10.1128/IAI.00233-16>
200. Wretlind B, Pavlovskis O.R. (1983) *Pseudomonas aeruginosa* Elastase and Its Role in *Pseudomonas* Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 5 (Supplement_5), S998–S1004. [doi:10.1093/clinids/5.supplement](https://doi.org/10.1093/clinids/5.supplement)
201. Wu V, Tang S, Uskokovic V (2018) Biological and Medical Applications of Materials and Interfaces Calcium Phosphate Nanoparticles as Intrinsic Inorganic Antimicrobials : The

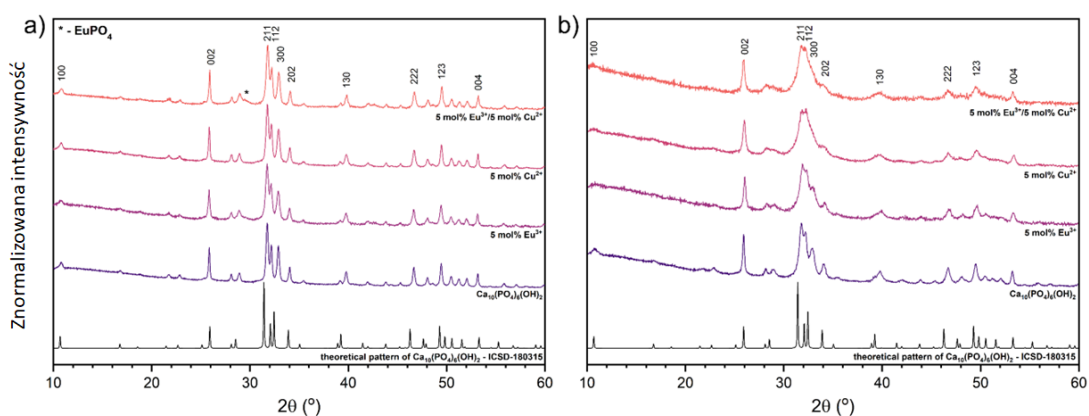
- Antibacterial Effect Calcium Phosphate Nanoparticles as Intrinsic Inorganic Antimicrobials : The Antibacterial Effe. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b12784>
202. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S (2015) *Pseudomonas aeruginosa*. In: Molecular Medical Microbiology: Second Edition. Elsevier Ltd, pp 753–767
 203. Yang H, Zhang L, Xu KW (2009) Effect of storing on the microstructure of Ag/Cu/HA powder. *Ceram Int* 35:1595–1601. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2008.09.012>
 204. Yilmaz B, Alshemary AZ, Evis Z (2019) Co-doped hydroxyapatites as potential materials for biomedical applications. *Microchem J* 144:443–453. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.10.007>
 205. Zawisza K, Sobierajska P, Nowak N, Kedziora A, Korzekwa K, Pozniak B, Tikhomirov M, Miller J, Mrowczynska L, Wiglusz RJ (2020) Preparation and preliminary evaluation of bio-nanocomposites based on hydroxyapatites with antibacterial properties against anaerobic bacteria. *Mater Sci Eng C* 106:110295. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110295>
 206. Zhang X, Song G, Qiao H, Lan J, Wang B, Yang H, Ma L, Wang S, Wang Z, Lin H, Han S, Kang S, Chang X, Huang Y (2020) Novel ternary vancomycin/strontium doped hydroxyapatite/graphene oxide bioactive composite coatings electrodeposited on titanium substrate for orthopedic applications. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 603:125223. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125223>
 207. Zhao Y, Wee CY, Zhang H, Yang Z, Wang WEJ, Thian ES (2022) Silver-substituted hydroxyapatite inhibits *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F: A potential antibacterial mechanism. *Biomater Adv* 134:112713. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2022.112713>
 208. Zijlstra WG, Buursma A, Falke HE, Catsburg JF (1994) Spectrophotometry of hemoglobin: absorption spectra of rat oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. *Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem* 107:161–166. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90238-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90238-0)
 209. Zimelis VM, Jackson GG (1973) Activity of Aminoglycoside Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*: Specificity and Site of Calcium and Magnesium Antagonism. *J. Infect. Dis.* 127:663–669. <https://doi.org/10.1093/infdis/127.6.663>
 210. Zupančič M, Turel I, Bukovec P, White AJP, Williams DJ (2001) Synthesis and characterization of two novel zinc(II) complexes with ciprofloxacin. Crystal structure of [C₁₇H₁₉N₃O₃F]₂ · [ZnCl₄] · 2H₂O. *Croat Chem Acta* 74:61–74

VIII. MATERIAŁY DODATKOWE

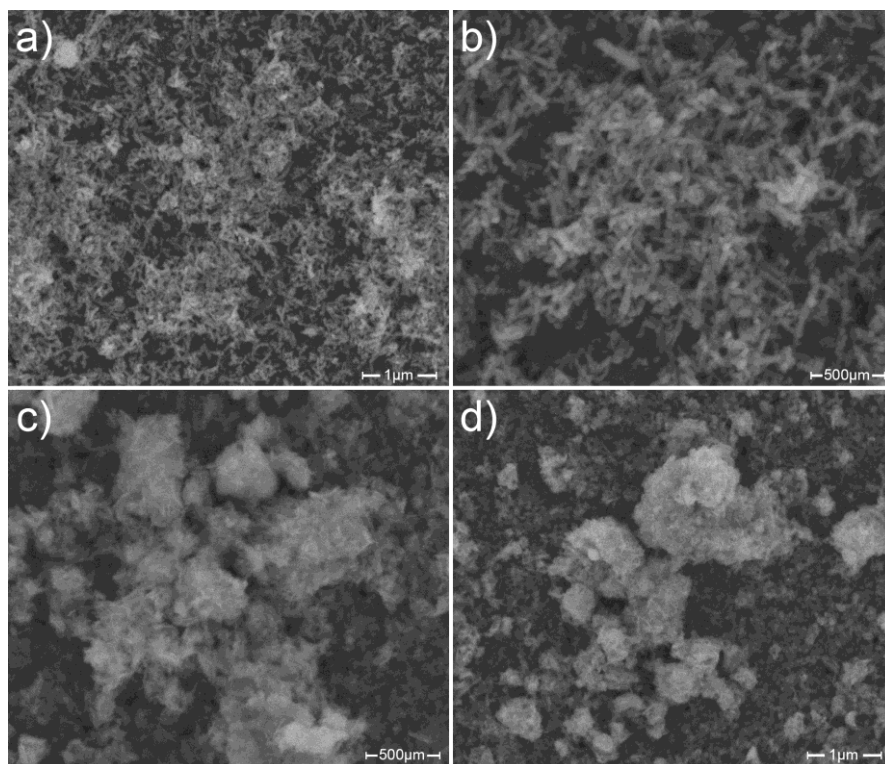
Tabela S.1. Charakterystyka wrażliwości na antybiotyki szczepów *P. aeruginosa* (Sobierajska et al. 2018; Rewak-Soroczynska et al. 2022a)

<i>P. aeruginosa</i>	Źródło szczepu	Antybiotyki															
		TIC	PIP	CAZ	GM	TOB	TIM	TZP	FEP	CFP	CTX	ME	IPM	BANKOM	AK	NET	PIW
ATCC 27853	Szczep referencyjny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA01	Szczep referencyjny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15/3	Nagłośnia	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82/3	Oskrzela	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/5	Tchawica	MDR	R	R	R	-	-	R	R	-	R	R	R	R	R	-	-
14/3	Rurka intubacyjna	MDR	R	-	-	R	R	R	-	-	R	R	-	R	-	-	R

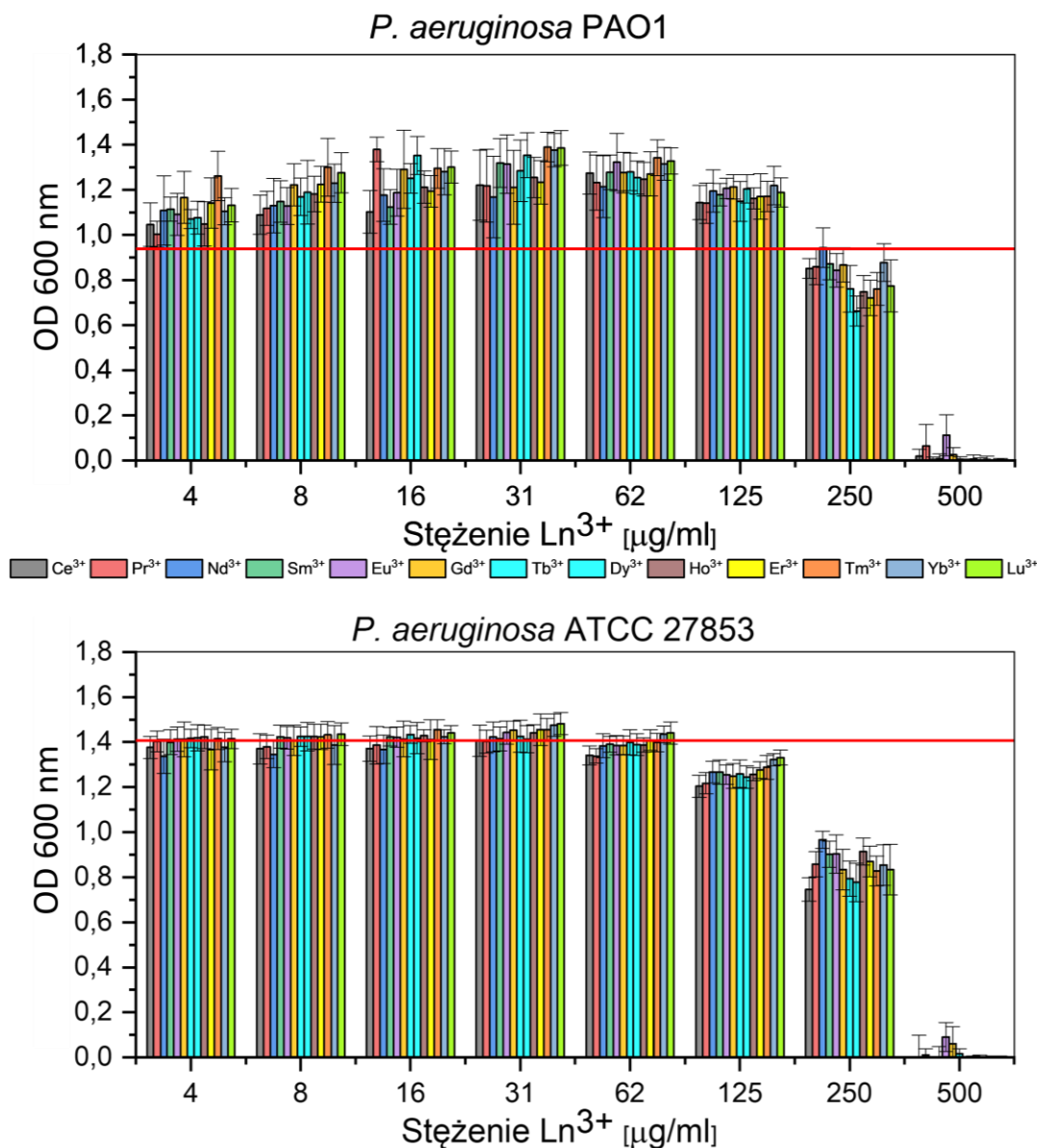
S – szczepy wrażliwe (ang. *sensitive*); MDR – szczepy wieloelkooporne (ang. *multidrug-resistant*); (-) brak oporności; R oporność (ang. *resistance*) wg EUCAST Clinical breakpoints - breakpoints and guidance (https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) tikarcylina (TIC) 75 mg, piperacylina (PIP) 100 mg, ceftazydim (CAZ) 30 mg, gentamycyna (GM) 10 mg, tobramycyna (TOB) 10 mg, tykarcylina/kwas klawulanowy (TIM) 75/10 mg, piperacylina/tazobaktam (TZP) 100/10 mg, cefepim (FEP) 30 mg, cefoperazon (CFP) 75 mg, cefotaksym (CTX) 30 mg, imipenem (IPM) 10 mg, meropenem (MEM) 10 mg, aztreonam (ATM) 30 mg, amikacyna (AK) 30 mg, netilmicyna (NET) 30 mg, ciprofloksacyna (CIP) 5 mg (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MD, USA)



Rycina S.1 Dyfraktogramy (XRD) uzyskane dla hydroksyapatytów otrzymanywanych metodą hydrotermalną (a) oraz współstrąceniową (b) domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Eu³⁺ i Cu²⁺



Rycina S.2. Obrazy SEM wykonane dla materiałów hydroksyapatytowych współdomieszkowanych 5 mol% Eu^{3+} i 5 mol% Cu^{2+} uzyskanych metodą hydrotermalną (a, b) i współstrącaniową (c, d)



Rycina S.3. Wpływ Ln^{3+} (stężenie 4-500 $\mu\text{g/ml}$) na wzrost *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853; linia czerwona - kontrolna wzrostu (bez jonów lantanowców)

Tabela S.2. Analiza statystyczna wyników przedstawionych na **Rycinie S.3.** powyżej

Stężenie e [$\mu\text{g/ml}$]	PAO1												
	Ce^{3+}	Pr^{3+}	Nd^{3+}	Sm^{3+}	Eu^{3+}	Gd^{3+}	Tb^{3+}	Dy^{3+}	Ho^{3+}	Er^{3+}	Tm^{3+}	Yb^{3+}	Lu^{3+}
500	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
250	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
125	**	*	**	**	**	**	*	*	ns	*	ns	**	ns
62,5	***	***	**	****	***	***	***	**	***	***	***	***	***
31,25	**	**	*	****	***	*	***	*	***	**	***	*	***
16	ns	***	**	ns	**	***	***	***	**	**	**	***	***

8	ns	ns	*	*	ns	**	*	*	*	***	**	**	**
4	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
ATCC 27853													
500	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	*	*	*	****	*	***	*	*	*	*	****	*	*
250	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	***	***	**
	*	*	*	***	***	***	***	***	**	***	***	***	**
125	***	***	**	**	**	**	**	**	**	*	*	ns	ns
	*	***	**	**	**	**	**	**	**	*	*	ns	ns
62,5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
31,25	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
16	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
4	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

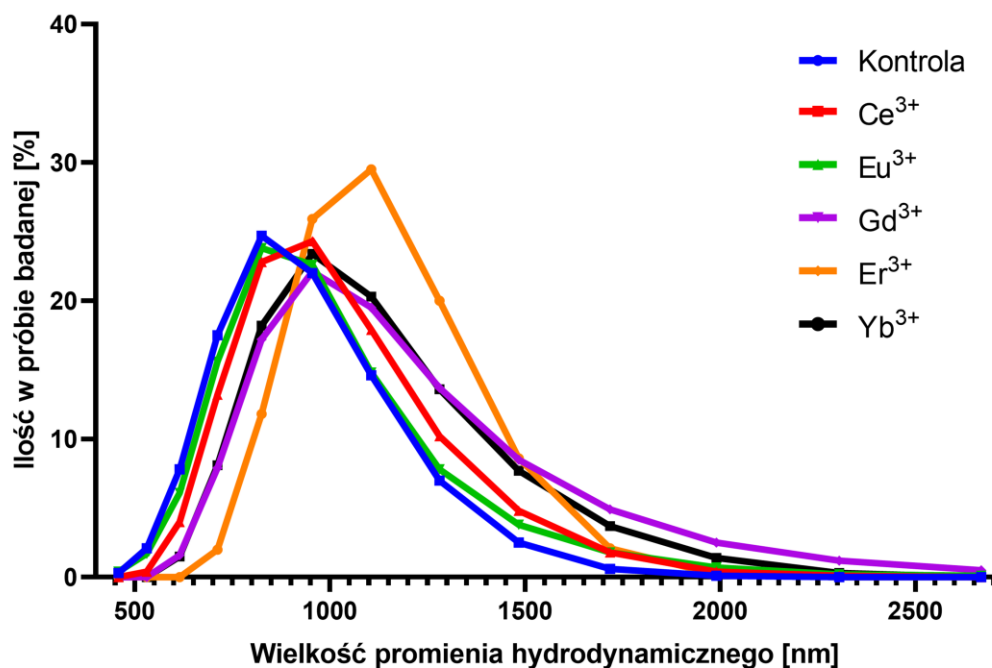
Tabela S.3. Stężenie eDNA ($\mu\text{g/ml}$) w hodowlach *P. aeruginosa* inkubowanych w obecności jonów lantanowców. W drugiej części tabeli pokazano zamieszczono stężenia eDNA w supernatancie pochodzonym, do którego jony lantanowców wprowadzono po odwirowaniu komórek bakteryjnych.

	Kontrola	Ce³⁺	Eu³⁺	Gd³⁺	Er³⁺	Yb³⁺
PAO1						
Ln³⁺ dodane do hodowli	16,16±0,71	1,01±0,27	-0,04±0,21	0,81±0,58	0,94±0,74	3,66±0,85
ATCC 27853						
	9,71±0,21	0,43±0,61	-0,06±0,23	1,02±0,23	-0,04±0,42	2,86±0,28
PAO1						
Ln³⁺ dodane po hodowli	26,86±0,57	23,66±2,83	25,86±1,13	26,46±1,41	23,96±0,14	24,46±2,26
ATCC 27853						
	21,96±0,71	20,06±2,26	19,96±0,71	20,46±0,57	20,76±1,27	18,96±0,99

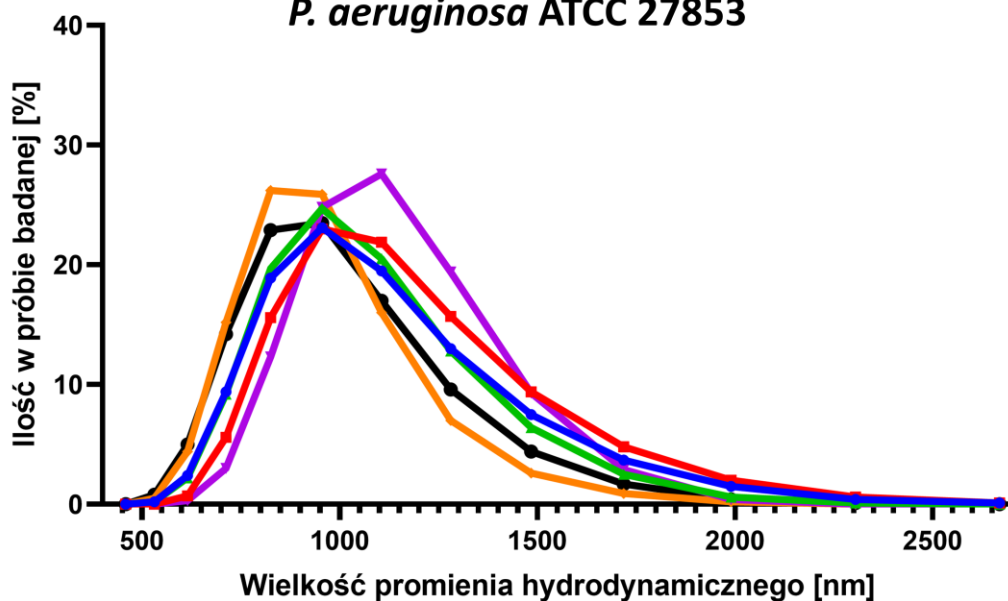
Tabela S.4. Wielkość promienia hydrodynamicznego (dominanta) oraz współczynnik polidispersyjności PDI wyznaczone dla *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 hodowanych w obecności jonów lantanowców

	Dominanta wielkości promienia hydrodynamicznego [nm]		Współczynnik polidispersyjności PDI	
	PAO1	ATCC 27853	PAO1	ATCC 27853
Kontrola	584,21	686,46	0,31±0,07	0,21±0,01
Ce³⁺	637,71	976,27	0,21±0,05	0,27±0,05
Eu³⁺	518,64	728,89	0,41±0,08	0,39±0,02
Gd³⁺	721,70	721,55	0,23±0,08	0,18±0,03
Er³⁺	990,36	601,47	0,21±0,01	0,35±0,14
Yb³⁺	751,41	530,42	0,45±0,07	0,28±0,01

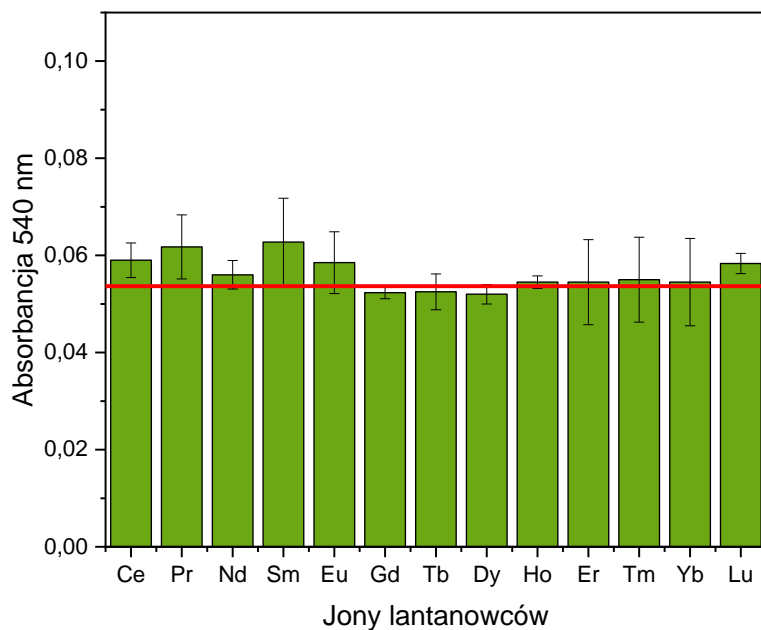
P. aeruginosa PAO1



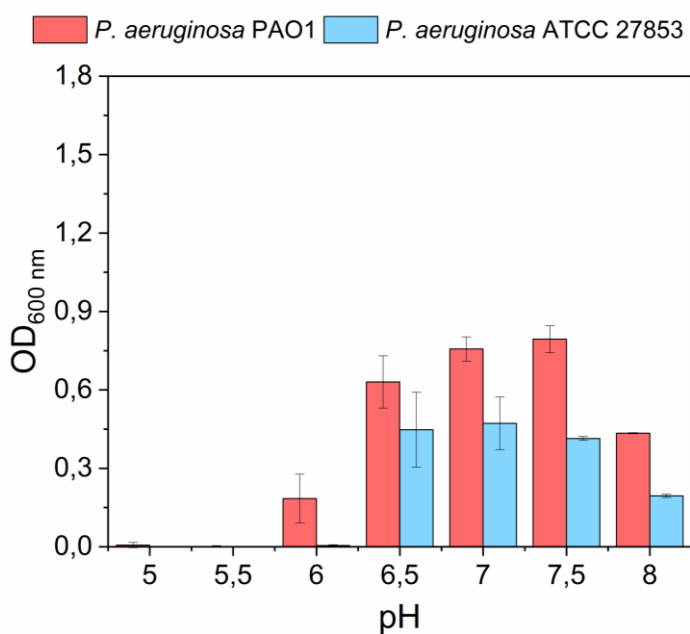
P. aeruginosa ATCC 27853



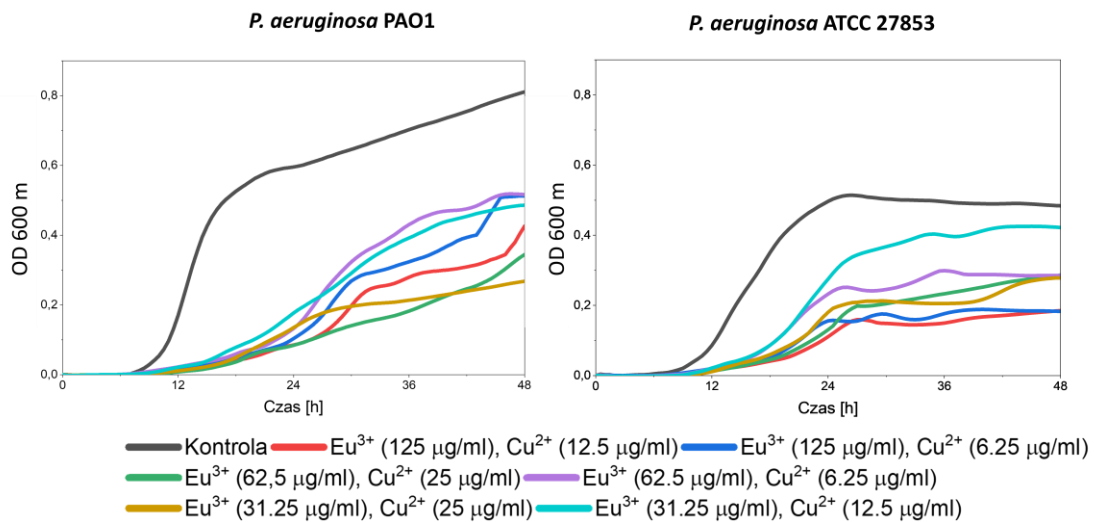
Rycina S.4. Udział procentowy obiektów o określonej wielkości promienia hydrodynamicznego [nm] w próbie badanej wyznaczony dla *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 hodowanych w obecności jonów lantanowców



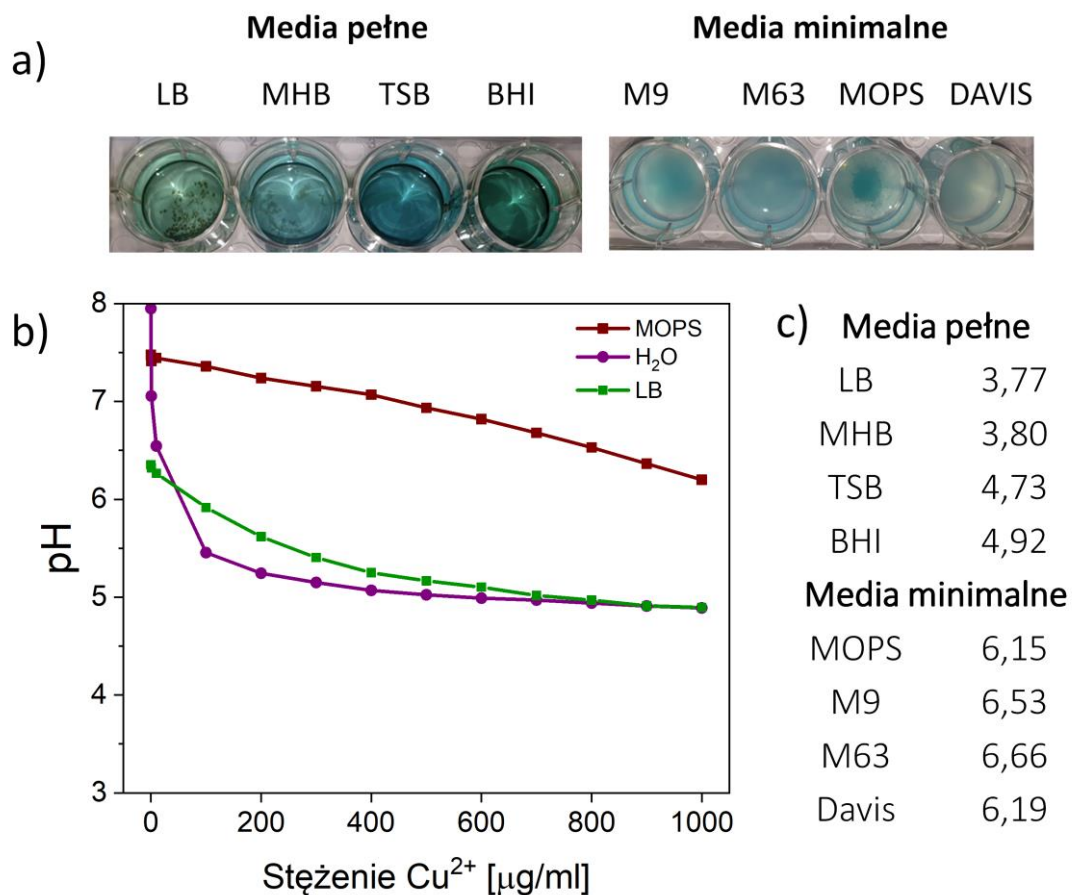
Rycina S. 5. Pomiar absorbancji (maksimum absorpcji dla hemoglobiny) supernatantu po zwirowaniu frakcji erytrocytów. Czerwona linia wskazuje pomiar wykonany dla próby kontrolnej, w której roztwory jonów lantanowców (250 $\mu\text{g/ml}$) zostały zastąpione wodą destylowaną.



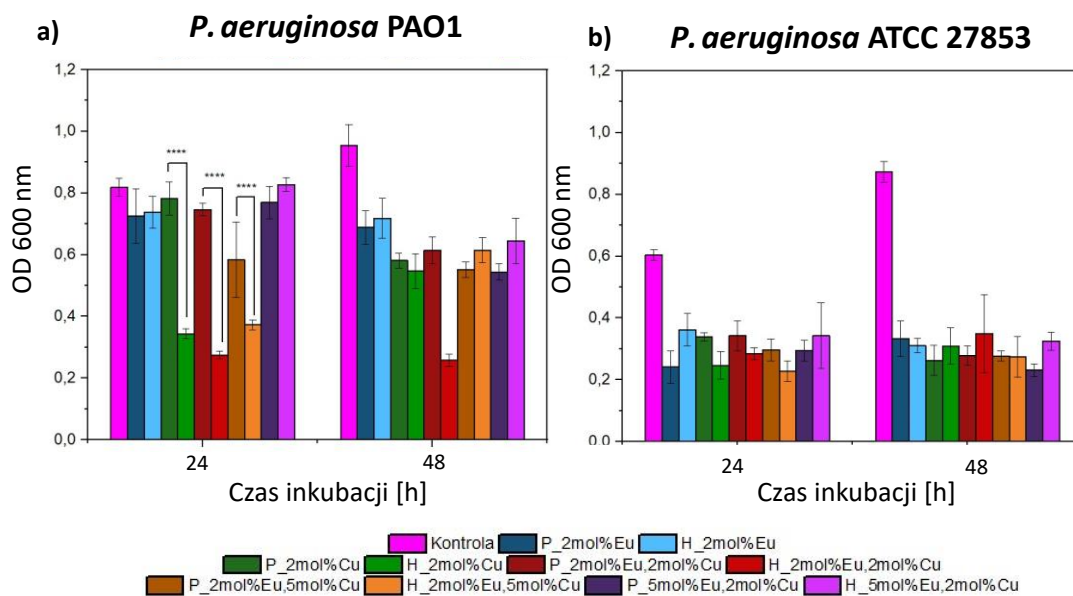
Rycina S.6. Wzrost bakterii *P. aeruginosa* PAO1 i ATCC 27853 w podłożu MOPS o różnym pH (5,0-8,0) (Rewak-Soroczynska et al. 2022a)



Rycina S.7. Dynamika zmian gęstości hodowli *P. aeruginosa* w obecności roztworów jonów miedzi (Cu^{2+}) i europu (Eu^{3+}) o stężeniach innych niż prezentowane w głównej części rozprawy



Rycina S.8. Interakcje pomiędzy jonami miedzi Cu^{2+} a składnikami podłoży mikrobiologicznych obserwowano jako: a) zmętnienie, wytrącenie osadu, zmiana koloru przy stężeniu miedzi 1 mg/ml; b) zmiana pH podłoża MOPS i LB oraz wody przy różnych stężeniach miedzi; c) zmiana pH podłoży pełnych i minimalnych przy stężeniu miedzi 1 mg/ml (Rewak-Soroczynska et al. 2022a).



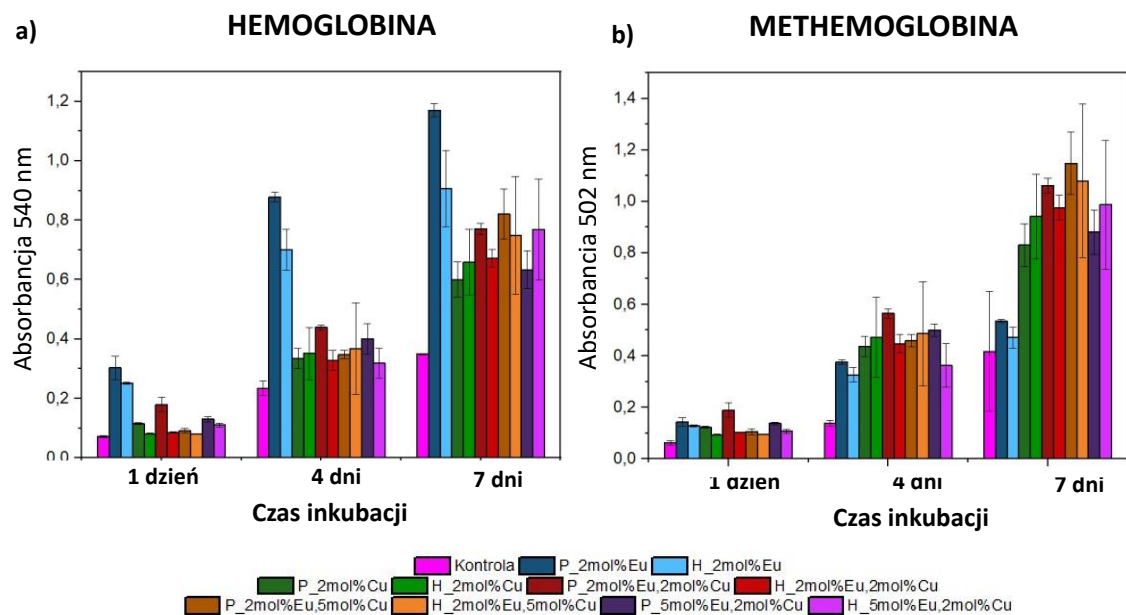
Rycina S.9. Aktywność antybakteryjna pozostałych nanomateriałów domieszkowanych i współdomieszkowanych Eu^{3+} i Cu^{2+} wobec: a) *P. aeruginosa* PAO1 i b) *P. aeruginosa* ATCC 27853. (P – seria strąceniową, H – seria hydrotermalna). Analiza istotności statystycznej otrzymanych wyników w porównaniu z kontrolą wzrostu zamieszczono w **Tabeli S.5.** poniżej.

Tabela S.5. Istotności statystyczne różnic pomiędzy wartościami OD₆₀₀ hodowli uzyskanych po 24- i 48-godzinnej inkubacji *P. aeruginosa* w obecności hydroksyapatytów (ns- brak istotności statystycznej, * - istotność statystyczna)

Para do porównania w teście Dunnetta	<i>P. aeruginosa</i> PAO1		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Kontrola vs. P_HAP	ns	ns	ns	ns
Kontrola vs. H_HAP	ns	ns	ns	ns
Kontrola vs. P_2mol%Eu ³⁺	**	ns	****	ns
Kontrola vs. H_2mol%Eu ³⁺	*	ns	ns	ns
Kontrola vs. P_5mol%Eu ³⁺	ns	ns	***	ns
Kontrola vs. H_5mol%Eu ³⁺	ns	ns	*	**
Kontrola vs. P_2mol%Cu ²⁺	ns	***	ns	***
Kontrola vs. H_2mol%Cu ²⁺	****	****	****	*
Kontrola vs. P_5mol%Cu ²⁺	****	**	****	****
Kontrola vs. H_5mol%Cu ²⁺	****	****	****	****
Kontrola vs. P_2mol%Eu ³⁺ , 2mol%Cu ²⁺	ns	**	ns	**
Kontrola vs. H_2mol%Eu ³⁺ , 2mol%Cu ²⁺	****	****	**	*
Kontrola vs. P_2mol%Eu ³⁺ , 5mol%Cu ²⁺	****	****	*	**
Kontrola vs. H_2mol%Eu ³⁺ , 5mol%Cu ²⁺	****	*	****	***
Kontrola vs. P_5mol%Eu ³⁺ , 2mol%Cu ²⁺	ns	****	*	****
Kontrola vs. H_5mol%Eu ³⁺ , 2mol%Cu ²⁺	ns	*	ns	ns
Kontrola vs. P_5mol%Eu ³⁺ , 5mol%Cu ²⁺	****	****	****	****
Kontrola vs. H_5mol%Eu ³⁺ , 5mol%Cu ²⁺	ns	*	*	ns

Tabela S.6. Wpływ pozostałych hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} (bez i z wstępnym uwalnianiem jonów do pożywki) na wzrost *P. aeruginosa* (P – seria strąceniowa, H – seria hydrotermalna). Istotne statystycznie różnice wyróżniono kolorem czerwonym (****) i żółtym (*).

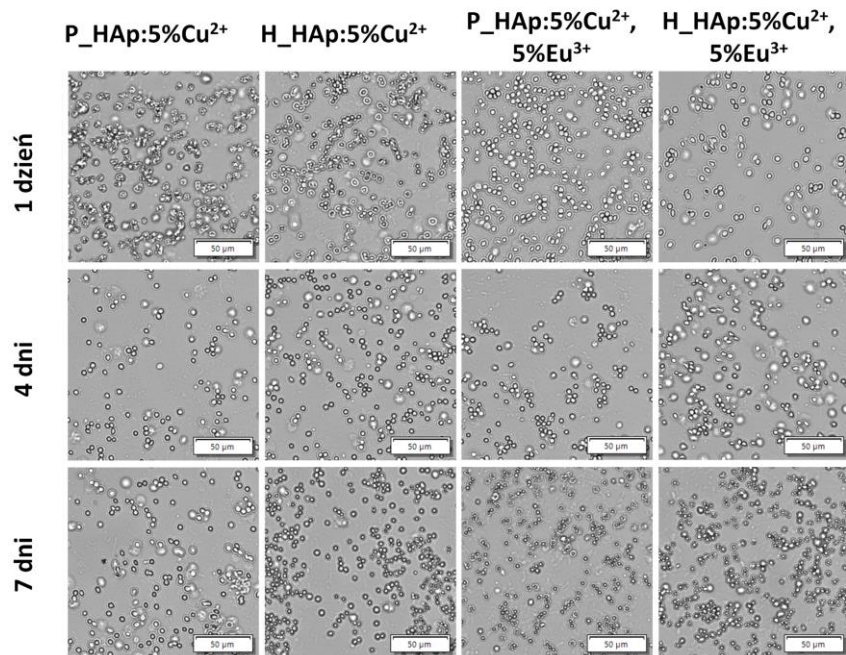
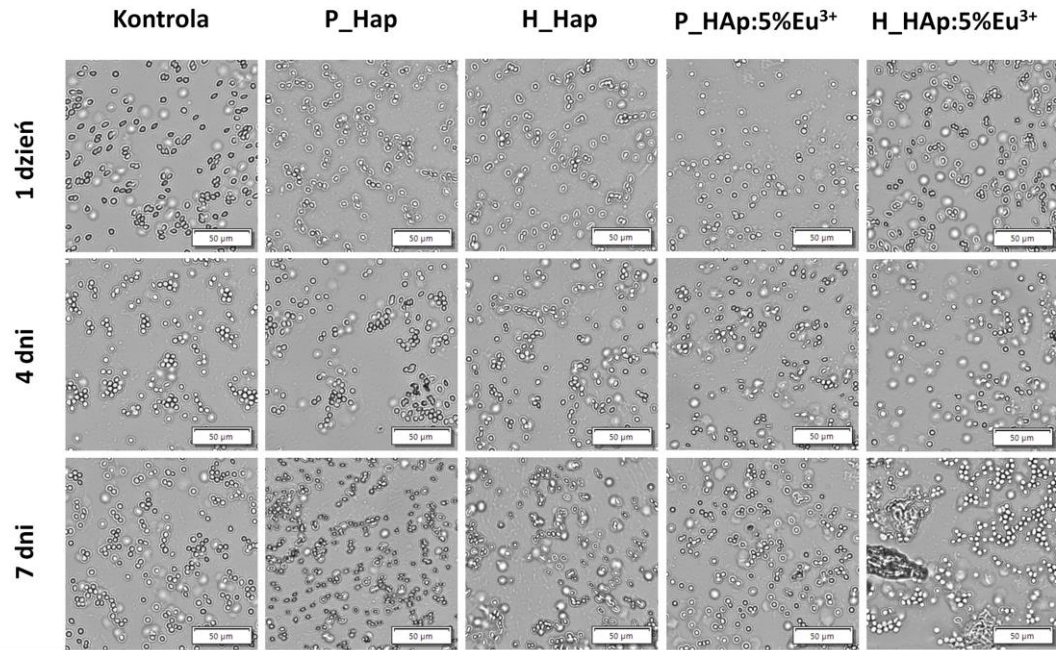
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		
	Średnie OD_{600}	Średnie OD_{600} (z wstępnym uwalnianiem)	ΔOD_{600}	Średnie OD_{600}	Średnie OD_{600} (z wstępnym uwalnianiem)	ΔOD_{600}
P_2mol% Eu^{3+}	0,73	0,73	0,00	0,24	0,26	0,02
H_2mol% Eu^{3+}	0,74	0,73	0,01	0,36	0,26	-0,10
P_2mol% Cu^{2+}	0,78	0,62	-0,16****	0,34	0,30	-0,04
H_2mol% Cu^{2+}	0,34	0,27	-0,08	0,25	0,19	-0,05
P_2mol% Eu^{3+} ,2mol% Cu^{2+}	0,75	0,30	-0,45****	0,34	0,28	-0,06
H_2mol% Eu^{3+} ,2mol% Cu^{2+}	0,27	0,25	-0,02	0,28	0,23	-0,05
P_2mol% Eu^{3+} ,5mol% Cu^{2+}	0,58	0,26	-0,32****	0,30	0,23	-0,07
H_2mol% Eu^{3+} ,5mol% Cu^{2+}	0,37	0,28	-0,09*	0,23	0,18	-0,04
P_5mol% Eu^{3+} ,2mol% Cu^{2+}	0,77	0,43	-0,34****	0,30	0,24	-0,05
H_5mol% Eu^{3+} ,2mol% Cu^{2+}	0,83	0,82	-0,01	0,34	0,35	0,01



Rycina S.10. Absorbancja uwolnionej a) hemoglobiny i b) methemoglobiny po inkubacji erytrocytów przez 1, 4 i 7 dni w obecności pozostałych hydroksyapatytów (P- seria strąceniową, H – seria hydrotermalna). Analiza statystyczna została zamieszczona w **Tabeli S.7.** poniżej.

Tabela S.7. Istotność statystyczna różnic pomiędzy wartościami absorbancji hemoglobiny i methemoglobiny zmierzonymi po 1, 4 i 7 dniach inkubacji erytrocytów w obecności hydroksyapatytów

Para do porównania w teście Dunnetta	Hemoglobina			Methemoglobina		
	1 dzień	4 dni	7 dni	1 dzień	4 dni	7 dni
Kontrola vs. P_Hap	*	*	ns	ns	ns	ns
Kontrola vs. P_2mol%Eu ³⁺	****	***	***	***	ns	ns
Kontrola vs. P_5mol%Eu ³⁺	***	*	ns	ns	ns	ns
Kontrola vs. P_2mol%Cu ²⁺	ns	ns	ns	*	ns	ns
Kontrola vs. P_5mol%Cu ²⁺	ns	ns	**	**	****	**
Kontrola vs. P_2mol%Eu ³⁺ ,2mol%Cu ²⁺	**	ns	ns	****	**	ns
Kontrola vs. P_2mol%Eu ³⁺ ,5mol%Cu ²⁺	ns	ns	ns	ns	*	ns
Kontrola vs. P_5mol%Eu ³⁺ ,2mol%Cu ²⁺	ns	ns	ns	***	**	ns
Kontrola vs. P_5mol%Eu ³⁺ ,5mol%Cu ²⁺	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kontrola vs. H_Hap	**	*	ns	ns	ns	ns
Kontrola vs. H_2mol%Eu ³⁺	***	**	**	**	ns	ns
Kontrola vs. H_5mol%Eu ³⁺	**	*	ns	ns	ns	ns
Kontrola vs. H_2mol%Cu ²⁺	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kontrola vs. H_5mol%Cu ²⁺	ns	***	****	ns	****	**
Kontrola vs. H_2mol%Eu ³⁺ ,2mol%Cu ²⁺	ns	ns	ns	ns	*	ns
Kontrola vs. H_2mol%Eu ³⁺ ,5mol%Cu ²⁺	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kontrola vs. H_5mol%Eu ³⁺ ,2mol%Cu ²⁺	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kontrola vs. H_5mol%Eu ³⁺ ,5mol%Cu ²⁺	ns	ns	ns	ns	ns	ns



Rycina S.11. Zdjęcia mikroskopowe erytrocytów wykonane po 1, 4 i 7 dniach inkubacji w obecności wybranych hydroksyapatytów

Dorobek naukowy

Publikacje

1. Targonska S, Szyszka K, **Rewak-Soroczynska J**, Wiglusz RJ. A new approach to spectroscopic and structural studies of the nano-sized silicate-substituted hydroxyapatite doped with Eu^{3+} ions. *Dalton Trans.* 2019 Jun 11;48(23):8303-8316. doi: 10.1039/c9dt01025d.
2. Obłąk E, Piecuch A, **Rewak-Soroczynska J**, Paluch E. Activity of gemini quaternary ammonium salts against microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019 Jan;103(2):625-632. doi: 10.1007/s00253-018-9523-2.
3. **Rewak-Soroczynska J**, Paluch E, Siebert A, Szalkiewicz K, Obłąk E. Biological activity of glycine and alanine derivatives of quaternary ammonium salts (QASs) against micro-organisms. *Lett Appl Microbiol.* 2019 Sep;69(3):212-220. doi: 10.1111/lam.13195. Epub 2019 Jul 25. PMID: 31260122.
4. Szyszka K, **Rewak-Soroczynska J**, Dorotkiewicz-Jach A, Ledwa KA, Piecuch A, Giersig M, Drulis-Kawa Z, Wiglusz RJ. Structural modification of nanohydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ related to Eu^{3+} and Sr^{2+} ions doping and its spectroscopic and antimicrobial properties. *J Inorg Biochem.* 2020;203:110884. doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.110884
5. Paluch E, **Rewak-Soroczynska J**, Jędrusik I, Mazurkiewicz E, Jermakow K. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(5):1871-1881. doi:10.1007/s00253-020-10349-w
6. Zienkiewicz JA, Strzep A, Jedrzekiewicz D, Nowak N, **Rewak-Soroczynska J**, Watras A, Ejfler J, Wiglusz RJ. Preparation and Characterization of Self-Assembled Poly(L-Lactide) on the Surface of β -Tricalcium Diphosphate(V) for Bone Tissue Theranostics. *Nanomaterials (Basel).* 2020;10(2):331. Published 2020 Feb 15. doi:10.3390/nano10020331
7. Targonska S, **Rewak-Soroczynska J**, Piecuch A, Paluch E, Szymanski D, Wiglusz RJ. Preparation of a New Biocomposite Designed for Cartilage Grafting with Antibiofilm Activity. *ACS Omega.* 2020 Sep 15;5(38):24546-24557. doi: 10.1021/acsomega.0c03044.
8. **Rewak-Soroczynska, J.**; Sobierajska, P.; Targonska, S.; Piecuch, A.; Grosman, L.; Rachuna, J.; Wasik, S.; Arabski, M.; Ogorek, R.; Wiglusz, R.J. New Approach to Antifungal Activity of Fluconazole Incorporated into the Porous 6-Anhydro- α -l-Galacto- β -d-Galactan Structures Modified with Nanohydroxyapatite for Chronic-Wound Treatments—In Vitro Evaluation. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3112. <https://doi.org/10.3390/ijms22063112>
9. Lubojanski, A.; Dobrzynski, M.; Nowak, N.; **Rewak-Soroczynska, J.**; Szytyler, K.; Zakrzewski, W.; Dobrzynski, W.; Szymonowicz, M.; Rybak, Z.; Wiglusz, K.; Wiglusz, R.J. Application of Selected Nanomaterials and Ozone in Modern Clinical Dentistry. *Nanomaterials* 2021, 11, 259. <https://doi.org/10.3390/nano11020259>
10. Sobierajska P, Pozniak B, Tikhomirov M, Miller J, Mrowczynska L, Piecuch A, **Rewak-Soroczynska J**, Dorotkiewicz-Jach A, Drulis-Kawa Z, Wiglusz RJ. Multifunctionality of Nanosized Calcium Apatite Dual-Doped with $\text{Li}^+/\text{Eu}^{3+}$ Ions Related to Cell Culture Studies and Cytotoxicity Evaluation In Vitro. *Biomolecules.* 2021 Sep 21;11(9):1388. doi: 10.3390/biom11091388.
11. Paulina Sobierajska, Nicole Nowak, **Justyna Rewak-Soroczynska**, Sara Targonska, Agnieszka Lewińska, Lukasz Grosman, Rafal J. Wiglusz. Investigation of topography effect on antibacterial properties and biocompatibility of

- nanohydroxyapatites activated with zinc and copper ions: In vitro study of colloids, hydrogel scaffolds and pellets. *Materials Science and Engineering: C*. 2021, 112547, ISSN 0928-4931, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112547>.
12. Sara Targonska, Monika Dobrzynska-Mizera, Marta Wujczyk, **Justyna Rewak-Soroczynska**, Monika Knitter, Katarzyna Dopierala, Jacek Andrzejewski, Rafal J. Wiglusz. New way to obtain the poly(L-lactide-co-D,L-lactide) blend filled with nanohydroxyapatite as biomaterial for 3D-printed bone-reconstruction implants. *European Polymer Journal*. 2022, 110997, ISSN 0014-3057, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.110997>.
 13. **Rewak-Soroczynska**, J.; Dorotkiewicz-Jach, A.; Drulis-Kawa, Z.; Wiglusz, R.J. Culture Media Composition Influences the Antibacterial Effect of Silver, Cupric, and Zinc Ions against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomolecules* 2022, 12, 963. <https://doi.org/10.3390/biom12070963>.
 14. **Rewak-Soroczynska**, J.; Nowak, N.; Targonska, S.; Piecuch, A.; Wiglusz, R.J. The Study of Nanosized Silicate-Substituted Hydroxyapatites Co-Doped with Sr²⁺ and Zn²⁺ Ions Related to Their Influence on Biological Activities. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022, 44, 6229-6246. <https://doi.org/10.3390/cimb44120425>.
 15. **Justyna Rewak-Soroczyńska**, Agata Dorotkiewicz-Jach¹, Rafał J. Wiglusz. Przegląd badań aktywności biologicznych jonów lantanowców. [Rozdział monografii: Postępy w naukach przyrodniczych: stan obecny i perspektywy.] Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o. 2022, s. 162-167.

Wystąpienia konferencyjne

1. PREZENTACJA: **Justyna Rewak-Soroczyńska**, Agata Dorotkiewicz-Jach, Rafał J. Wiglusz. Wpływ różnych stężeń jonów europu (Eu³⁺) i miedzi (Cu²⁺) na wzrost bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. VII Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne metody analityczne w farmacji i medycynie", Wrocław 2022. – **Nagroda za zajęcie II miejsca.**
2. PREZENTACJA: **Justyna Rewak-Soroczynska**, Paulina Sobierajska and Rafal J. Wiglusz. Antimicrobial activity of nanocrystalline hydroxyapatites doped and co-doped with Zn²⁺ and Cu²⁺ ions against Gram-negative bacteria. Open Readings, Wilno, 2022.
3. PREZENTACJA: **Justyna Rewak-Soroczyńska**, Agata Dorotkiewicz-Jach and Rafał J. Wiglusz. Wpływ jonów lantanowców na wzrost i wirulencję *Pseudomonas aeruginosa*. Tygiel, Lublin, 2022.
4. POSTER: **J. Rewak-Soroczynska**, K. Syszka, A. Dorotkiewicz-Jach, Z. Drulis-Kawa, R. J. Wiglusz. Antipseudomonal activity of nanohydroxyapatites doped and co-doped with Cu²⁺ and Eu³⁺ obtained via co-precipitation and hydrothermal methods. AMBRA, Wrocław, 2022.
5. POSTER: Anna Han, Rafał J. Wiglusz, M. Dobrzyński, Tomasz Han, Sabina Zalewska, **Justyna Rewak-Soroczyńska**, Magdalena Pajęzkowska, Maria Szymonowicz, Jacek Chmielowiec. AMBRA, Wrocław, 2022.
6. POSTER: A. Piecuch, R. Ogórek, **J. Rewak-Soroczyńska**, S. Targońska, J. Suchodolski and R. Wiglusz. Antifungal activity of hydroxy- and fluorapatites doped with silver ions. AMBRA, Wrocław, 2022.
7. PREZENTACJA: Justyna Rewak-Soroczynska, Paulina Sobierajska, Rafal J. Wiglusz. Antifungal activity of fluconazole incorporated into hydrogels modified with nanohydroxyapatite. Open Readings, Wilno, 2021.

8. POSTER: **Justyna Rewak-Soroczynska**, Nicole Nowak, Sara Targonska, Agata Piecuch and Rafal J. Wiglusz. New approach to antibacterial activity and safety evaluation of nanosized silicon-substituted hydroxyapatite co-doped with Zn²⁺ and Sr²⁺ ions. Open Readings, Wilno, 2019.
9. POSTER: Nicole Nowak, **Justyna Rewak-Soroczynska**, Agata Piecuch, Konrad Szustakiewicz, Piotr Kuroпка Maciej Dobrzynski and Rafal Jakub Wiglusz. Studies and evaluation of anticancer properties of poly(L-lactide)/ Sr²⁺, Eu³⁺ and Cu²⁺ ions co-doped hydroxyapatite porous sponge scaffolds.. Open Readings, Wilno, 2019
10. POSTER: Emil Paluch, **Justyna Rewak**, Ewa Obłak, Łukasz Lamch and Kazimiera A. Wilk. Antifungal activity of quaternary ammonium salts (QAS) against *Candida albicans*. Ogólnopolska Konferencja Naukowa POD MIKROSKOPEM – IV edycja „Drobnoustroje codziennym wyzwaniem dla mikrobiologa” Poznań, 2018.
11. POSTER: **Rewak J**, Paluch E, Obłak E. Antifungal activity of glycine derivatives of quaternary ammonium salts (QAS). IV Konferencja Naukowa pt. „Wektory i patogeny w przeszłości i przyszłości” “Vectors and Pathogens – in the past and in the future” Wrocław, 2017.
12. PREZENTACJA: **Justyna Rewak**, Ewa Obłak. Antifungal Activity of Quaternary Ammonium Salts. 6th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech. Kraków, 2017.

Inne wydarzenia naukowe:

1. Prezentacja w ramach posiedzenia PTM (Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów) 24.05.2018: "Biologiczna aktywność glicyno- i alaninopochodnych czwartorzędowych soli amoniowych wobec mikroorganizmów", **Rewak J**, Szalkiewicz K, Siebert A, Paluch E, Obłak E.

Inne osiągnięcia:

1. **Patent:** Piecuch Agata; Ogórek Rafał; Przywara Katarzyna; Wiglusz Rafał; Rewak-Soroczyńska Justyna; Targońska Sara. Krzemianowy związek o strukturze hydroksyapatytu domieszkowany jonami srebra, sposób jego wytwarzania i zastosowanie (Method of production and antifungal activity of fluoroapatites doped with silver ions). **Pat.242895**