

ZAŁĄCZNIK NR 2

do wniosku o przeprowadzenie

postępowania habilitacyjnego dr n. med. Agnieszki Magryś



Autoreferat w języku polskim

Dr n. med. Agnieszka Magryś

Adiunkt w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej

II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

ul. W. Chodźki 1

20-093 Lublin

tel. 81 448 6400

agnieszka.magrys@umlub.pl

Lublin 2019

Spis treści

1. DANE BIBLIOGRAFICZNE.....	2
2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA 2 I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	2
3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....	2
4. PRACA NAUKOWA (PODSUMOWANIE NA PODSTAWIE BIBLIOMETRII)	2
5. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. Z 2016 R. POZ. 1311.)	3
5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
5.2. Autorzy i tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa	4
5.3. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	6
5.3.1. Wprowadzenie.....	6
5.3.2. Cel i zakres badań.....	8
5.3.3. Uzasadnienie i omówienie uzyskanych wyników badań.....	9
5.3.4. Podsumowanie wyników głównego osiągnięcia naukowego	21
6. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH.....	26
6.1. Tematyka pozostałych prac badawczych.....	26
6.1.1. Monitorowanie zanieczyszczenia systemów dystrybucji wody w szpitalach i budynkach użyteczności publicznej pałeczkami <i>Legionella pneumophila</i>	27
6.1.2. Ocena częstości występowania zakażeń bakterią <i>Legionella pneumophila</i> u pacjentów z obniżoną odpornością.....	30
6.1.3. Badania nad identyfikacją pacjentów z gruźlicą latentną (LTBI) oraz opornością na leki wśród <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32
6.1.4. Inne zagadnienia	37
6.1.4.1. Retinopatie nowotworowe	37
6.1.4.2. Inwazyjne kandydozy u chorych z chorobą nowotworową, w trakcie chemioterapii.....	38
7. POZOSTAŁA AKTYWNOŚĆ NAUKOWA ZMIERZAJĄCA DO POPULARYZACJI NAUKI. 39	
7.1. Streszczenia prac ze zjazdów międzynarodowych i krajowych opublikowane w suplementach czasopism	39
7.2. Nagrody i wyróżnienia	43
7.3. Członkostwo w towarzystwach naukowych	43
7.4. Recenzje wydawnicze	43
7.5. Opieka nad studentami	44
7.6. Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki.....	44
7.7. Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich.....	45
7.8. Osiągnięcia organizacyjne	45

1. DANE BIBLIOGRAFICZNE

Imię i nazwisko: Agnieszka Magryś (z domu Tokarz)

Tytuł naukowy: doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej

Stanowisko: Adiunkt

Adres służbowy: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

ul. W. Chodźki 1, 20-093 Lublin

Telefon: 81 448 6400

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 1999 r. - uzyskanie tytułu magistra biologii, specjalność: mikrobiologia Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi.
- 2003 r. - uzyskanie tytułu specjalisty I stopnia z mikrobiologii
- 2003 r. - uzyskanie tytułu doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej na podstawie rozprawy: „Opracowanie modelu wczesnego wykrywania inwazyjnych kandydoz u pacjentów z chorobą nowotworową”

Promotor pracy doktorskiej: prof. dr hab. Maria Koziół-Montewka

Recenzenci: prof. dr hab. Sabina Toś-Luty, prof. dr hab. Małgorzata Polz-Dacewicz

- 2012 r. - ukończenie szkolenia specjalizacyjnego w ramach prowadzonej specjalizacji w dziedzinie mikrobiologii medycznej (tryb uzupełniający do II stopnia)

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie:

- Asystent w latach 1999 – 2010;
- Adiunkt od 2010 r. do chwili obecnej;
- 1.10.2003 r. - 30.09.2004 r. - Staż podoktorancki w Ocular Immunology Laboratory w Neurological Sciences Institute of the Oregon Health Sciences University, USA.

4. PRACA NAUKOWA (PODSUMOWANIE na podstawie bibliometrii)

Jestem autorem i współautorem **24 oryginalnych pełnotekstowych prac oryginalnych**, z których 17 zostało opublikowanych w czasopiśmie z Impact Factor, o łącznym IF 24.375

i punktacji wg MNiSW - 260 pkt. (wszystkie po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych). Jestem również współautorem 7 prac oryginalnych bez IF, których łączna punktacja wg MNiSW wynosi 39 punktów (5 z nich po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych).

Jestem współautorem **1 opisu przypadku** (IF- 2.426, MNiSW 27 pkt), opublikowanego po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych).

Łącznie IF dla mojego dorobku: prace oryginalne i opisy przypadków wynosi 26.801, punktacja wg MNiSW – 326 pkt.

Jestem autorem i współautorem **35 doniesień zjazdowych**: 26 ze zjazdów międzynarodowych i 9 ze zjazdów krajowych.

Jestem współautorem **2 publikacji w suplementach czasopism**, obydwie opublikowane w czasopismach z Impact Factor, o łącznym IF 0.704, a punktacja wg MNiSW – 20 pkt (wszystkie po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych).

Jestem także współautorem **4 rozdziałów** w podręcznikach krajowych (3 po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych) oraz 3 w podręcznikach międzynarodowych (1 po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych).

Łączna punktacja mojego dorobku naukowego: prace oryginalne, pogładowe, opisy przypadków, publikacje pełnotekstowe w suplementach czasopism oraz rozdziały w podręcznikach wynosi 27.505 punktów IF oraz 397 punktów MNiSW.

Liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection (bez autocytowań): 130

h-index wg bazy Web of Science Core Collection: 6

Liczba cytowań wg bazy Scopus (bez autocytowań): 152

h-index wg bazy Scopus: 7

5. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Strategie aktywności patogennej *Staphylococcus epidermidis* związane z udziałem w zakażeniach przewlekłych i nawracających

Przedstawiony Centralnej Komisji do oceny cykl publikacji będących podstawą do sformułowania wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie: nauki medyczne, w dyscyplinie: biologia medyczna, składa się z 4 oryginalnych prac pełnotekstowych o łącznej wartości bibliometrycznej **IF=8.136** oraz łącznej punktacji **MNiSW=85**. Wszystkie wymienione prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych.

5.2. Autorzy i tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

1. Jolanta Paluch-Oleś, **Agnieszka Magryś**, Maria Koziół-Montewka, Artur Niedzielski, Justyna Niedźwiadek, Grażyna Niedzielska, Michał Kotowski. The phenotypic and genetic biofilm formation characteristics of coagulase-negative staphylococci isolates in children with otitis media. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2011 vol. 75 nr 1 s. 126-130.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badania. Wykonałam eksperymenty badające zdolność bakterii do wytwarzania śluzu metodą płytkową i na podłożu Congo Red. Napisałam manuskrypt i jako autor korespondencyjny kontaktowałam się z Redakcją i Recenzentami oraz przeprowadziłam korektę ostatecznej wersji tekstu.

Mój udział procentowy wynosił 60%.

IF: 1.167, punkty MNiSW: 20

2. **Agnieszka Magryś**, Jolanta Paluch-Oleś, Agnieszka Bogut, Michał Kielbus, Dorota Plewik, Maria Koziół-Montewka. The role of programmed death ligand 1 pathway in persistent biomaterial-associated infections. *J. Microbiol.* 2015 vol. 53 nr 8 s. 544-552, DOI: 10.1007/s12275-015-5022-7

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badania i opracowaniu metodologii. Przeprowadziłam test internalizacji bakterii do makrofagów, przygotowałam komórki do oznaczenia ekspresji PD-L1, obliczyłam zdolność bakterii do przeżywania w makrofagach oraz oznaczyłam poziom cytokin metodą ELISA. Przeprowadziłam analizę statystyczną otrzymanych wyników i napisałam manuskrypt. Jako autor korespondencyjny kontaktowałam się z Redakcją i Recenzentami oraz przeprowadziłam korektę ostatecznej wersji tekstu.

Mój udział procentowy wynosił na 75%.

IF: 1.621, punkty MNiSW: 15

3. **Agnieszka Magryś**, Agnieszka Bogut, Michał Kielbus, Alina M. Olender: The role of the PI3K/mTOR signaling pathway in *Staphylococcus epidermidis* small colony variants intracellular survival. *Immunol. Invest.* [online] 2018 vol. 47 nr 3 s. 251-263, DOI: 10.1080/08820139.2018.1423569.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badania i opracowaniu metodologii. Przeprowadziłam doświadczenia na hodowli komórkowej i przygotowałam komórki do oznaczenia ekspresji sygnałów ścieżki PI3K-mTOR. Przeprowadziłam analizę statystyczną otrzymanych wyników i napisałam manuskrypt. Jako autor korespondencyjny kontaktowałam się z Redakcją i Recenzentami oraz przeprowadziłam korektę ostatecznej wersji tekstu.

Mój udział procentowy wynosił na 80%.

IF: 2.588, punkty MNiSW: 15

4. **Agnieszka Magryś**, Kamil Deryło, Agnieszka Bogut, Alina Olender, Marek Tchórzewski. Intraphagolysosomal conditions predispose to *Staphylococcus epidermidis* small colony variants persistence in macrophages. *PLoS One.* 2018 Nov 9;13(11): e0207312. doi: 10.1371/journal.pone.0207312. eCollection 2018.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badania i opracowaniu metodologii. Przygotowałam bakterie i hodowle komórkowe makrofagów do testu internalizacji i przeprowadziłam test. Zaplanowałam i wykonałam eksperymenty związane z oznaczeniem poziomu iNOS metodą ELISA. Wykonałam analizy statystyczne. Zinterpretowałam wyniki tych analiz i napisałam manuskrypt. Jako autor korespondencyjny kontaktowałam się z Redakcją i Recenzentami oraz przeprowadziłam korektę ostatecznej wersji tekstu.

Mój udział procentowy wynosił na 75%.

IF: 2.76, punkty MNiSW: 35

Mój średni udział w prezentowanym jednotematycznym cyklu publikacji wynosi 72.5%.

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

5.3.1. Wprowadzenie

Gronkowce koagulazo-ujemne (CoNS) są integralną częścią prawidłowego mikrobiomu człowieka, powszechnie występującymi na skórze i błonach śluzowych. Przez dziesięciolecia uznawano je za niepatogenne organizmy komensalne. Obecnie fakt, że CoNS, mogą powodować poważne infekcje u ludzi nie budzi wątpliwości. Bakterie te są coraz częstszą przyczyną zakażeń oportunistycznych, odpowiadając za 40-75% infekcji związanych ze stosowaniem biomateriałów, a najbardziej znaczącym gatunkiem pod tym względem jest *Staphylococcus epidermidis* [1].

Chociaż *S. epidermidis* rzadko powoduje choroby zagrażające życiu, to jednak znacznie zwiększa zachorowalność wśród pacjentów predysponowanych do tego typu zakażeń [2, 3]. Ich częstotliwość oraz powszechna oporność na wiele antybiotyków, stanowi istotny problem dla publicznego systemu opieki zdrowotnej [4].

W przypadku wielu drobnoustrojów chorobotwórczych, mechanizmy obronne gospodarza skutecznie eliminują patogenne drobnoustroje. Niektóre z nich wytworzyły jednak strategie umożliwiające przetrwanie w obecności eliminujących je mechanizmów, dając podstawy do rozwoju zakażeń o charakterze przewlekłym [5]. Szczegółowe badania dotyczące odpowiedzi immunologicznej gospodarza i patomechanizmów zakażeń z udziałem *S. epidermidis* są mało znane, ograniczone głównie do badań nad blisko z nim spokrewnionym gatunkiem, *Staphylococcus aureus* [1]. Chorobotwórczość *S. epidermidis* związana jest głównie ze zdolnościami adhezyjnymi, zarówno do biomateriałów, jak i tkanek, a także z czynnikami zapewniającymi im ochronę przed działaniem układu immunologicznego gospodarza. Dwa kluczowe procesy przyczyniają się do sukcesu *S. epidermidis* pod tym względem: 1) formowanie biofilmu i 2) wytwarzanie subpopulacji małych wariantów kolonii (Small Colony Variants, SCV) [2, 4].

Centrum Kontroli i Prewencji Chorób (Center for Disease Control and Prevention, CDC) ocenia, że 65% wszystkich zakażeń bakteryjnych przebiega z wytworzeniem biofilmu [6]. Ma to poważne konsekwencje kliniczne, ponieważ zakażenia takie mają charakter przewlekły i nawracający, a bakterie żyjące w biofilmie są 100-1000 krotnie mniej wrażliwe na konwencjonalne leczenie antybiotykami w porównaniu z populacją rozwijającą się w formie planktonowej [7]. Ze względu na rozpowszechnienie i coraz większą rozpoznawalność zakażeń z udziałem biofilmu bakteryjnego, znajomość czynników ryzyka rozwoju infekcji, czynników

etiologicznych oraz mechanizmów doprowadzających do wytworzenia struktur biofilmu jest konieczna do walki z tego rodzaju infekcjami [6].

Wytwarzanie biofilmu jest preferowaną formą wzrostu gronkowców w przypadku większości zakażeń, również z udziałem *S. epidermidis*, i to nie tylko związanych ze stosowaniem biomateriałów. Obecność biofilmu stwierdza się także *in vivo* na błonach śluzowych w zapaleniu ucha środkowego, zapaleniu płuc lub przewlekłym zapaleniu zatok przynosowych [8]. Struktura dojrzałego biofilmu jest złożona. Składa się z wielu warstw komórek bakterii, które są stabilizowane m. in. poprzez zewnątrzkomórkową macierz utworzoną przez egzopolimery PIA (polisaccharide intracellular adhesin) [8]. Częsteczka PIA, będąca polisacharydowym polimerem zbudowanym z reszt N-acetyloglukozaminy połączonych wiązaniem β -1,6, odpowiada za agregację komórek bakteryjnych w biofilmie [9], ale również zapewnia bakteriom ochronę przed mechanizmami obronnymi gospodarza i penetracją antybiotyków w głąb jego struktur. Za syntezę PIA odpowiadają enzymy kodowane przez geny tworzące operon *icaADBC* [7, 8, 9]. Znaczenie operonu *ica* potwierdza fakt, że jego występowanie w genomie *S. epidermidis* uznaje się za jeden z głównych markerów patogenności tych bakterii, odróżniających szczepy komensalne od inwazyjnych [7, 10].

Ponad 80% szpitalnych szczepów *S. epidermidis*, które posiadają geny *ica* wytwarza biofilm, lecz obecność tych genów nie jest niezbędna w procesie tworzenia jego struktur. Istnieją liczne doniesienia o możliwości wytwarzania biofilmu również przez szczepy, u których nie wykryto genów operonu *ica*. Przypuszcza się, że u szczepów *S. epidermidis* *ica*-negatywnych za wytwarzanie biofilmu odpowiadają specyficzne białka powierzchniowe, takie jak białko związane z akumulacją (accumulation associated protein Aap) [9, 10]. Wyniki badań sugerują, że biofilmy wytwarzane przez szczepy *ica*-negatywne odznaczają się jednak mniejszą biomasą i nie są tak wytrzymałe jak te tworzone przez szczepy *ica*-pozytywne [9, 10].

Współcześnie panuje pogląd, że w zakażeniach gronkowcowych o charakterze przewlekłym i nawracającym, obok biofilmu bakteryjnego, drugą ważną formą drobnoustrojów zwiększającą prawdopodobieństwo ich przetrwania w organizmie człowieka jest wytwarzanie subpopulacji małych wariantów kolonii, tzw. SCV (Small Colony Variants). Bakterie o takim fenotypie wykazują cechy odmienne od szczepów dzikich (wild type, WT), o klasycznych cechach gatunkowych. Różnią się od nich zmniejszoną aktywnością metaboliczną i małą wielkością kolonii [5, 8]. Subpopulacje SCV charakteryzują się również tym, że są dobrze przystosowane do przetrwania wewnątrz komórek gospodarza, w fagocytach i komórkach nefagocytujących, takich jak komórki nabłonka lub śródbłonek. Możliwość pozostawania wewnątrzkomórkowego przez SCV radykalnie wpływa na wzajemne oddziaływanie gospodarz

- patogen, a główną konsekwencją kliniczną jest rozwój przewlekłych, nawracających, często opornych na leczenie infekcji [11].

Komórki o fenotypie SCV mogą powstać w wyniku spontanicznej selekcji podczas antybiotykoterapii. Na podstawie informacji, które antybiotyki zostały zastosowane w leczeniu, można się spodziewać SCV o określonych mutacjach genetycznych, dotyczących szczególnych wymagań wzrostowych. Po ekspozycji na aminoglikozydy rozwijają się SCV zależne od menadionu lub heminy, podczas gdy terapia trimetoprimem-sulfametoksazolem jest silnie związana z pojawieniem się SCV zależnych od tymidyny. Jednak w wielu przypadkach takie powiązanie pomiędzy typem użytego antybiotyku a rodzajem auktotrofizmu nadal nie jest jasne [11]. Z powodu mutacji w genach biosyntezy heminy i menadionu, SCV często posiadają defekty w składowych łańcucha transportu elektronów - cytochromie lub menachinonie [12, 13, 14]. Zakłócenia w transporcie elektronów powodują, poprzez zaburzenia w oksydacyjnej fosforylacji i produkcji ATP, zmiany w potencjale transbłonowym, co wpływa ochronnie na bakterie, zabezpieczając je przed działaniem wielu substancji bakteriobójczych, jak również niektórych antybiotyków [11]. Odkrycie, że antybiotyki są zdolne do modyfikowania zarówno fenotypu, jak i fizjologii bakterii, jest niezwykle ważne z punktu widzenia antybiotykoterapii, ponieważ lek, który nie działa bezpośrednio bakteriobójczo na komórkę bakteryjną może hamować lub wzmacniać ekspresję genów zaangażowanych w jej wirulencję, co z kolei w istotny sposób wpływa na przebieg infekcji bakteryjnej [11].

Występowanie małych wariantów kolonii najczęściej dotyczy *S. aureus*, jednak wiele innych patogenów może występować pod postacią takiego fenotypu, np. *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* i *Salmonella enterica serovar Typhi*. W porównaniu z fenotypem SCV *S. aureus*, który był szeroko badany, stosunkowo niewiele wiadomo na temat formy SCV *S. epidermidis*. Klinicznie, są to szczepy izolowane najczęściej z zakażeń związanych ze stosowaniem biomateriałów, od pacjentów poddawanych długotrwałej antybiotykoterapii [11].

5.3.2. Cel i zakres badań

Zarówno zdolność wytwarzania biofilmu, jak i indukcja fenotypu SCV umożliwiają gronkowcom namnażanie i przetrwanie w organizmie gospodarza, stanowiąc czynnik sprzyjający rozwojowi przewlekłej i nawracającej postaci zakażenia; bakterie są wówczas znacznie mniej wrażliwe na działanie leków przeciwbakteryjnych oraz mechanizmów obronnych gospodarza [15]. Ponieważ oba zjawiska mają kluczowe znaczenie w patogenezie zakażeń wywoływanych przez gronkowce koagulazo-ujemne, celem przedstawionego

osiągnięcia naukowego było zbadanie zależnych od bakterii i gospodarza czynników sprzyjających rozwojowi zakażenia przewlekłego.

Cele szczegółowe prezentowanego cyklu obejmowały:

1. Ocena roli CoNS w zakażeniach ucha środkowego z wysiękiem oraz ich zdolności do wytwarzania biofilmu *in vitro*.
2. Analizę zdolności adaptacyjnych SCV *S. epidermidis* do środowiska wewnątrzkomórkowego gospodarza podczas infekcji poprzez:
 - 2.1. Zbadanie zdolności SCV *S. epidermidis* do przetrwania fagocytozy przez makrofagi i wpływu czynników prozapalnych na przeżywalność bakterii;
 - 2.2. Określenie czy wytwarzanie cytokin przez makrofagi zakażone szczepami SCV *S. epidermidis* może przyczynić się do ich przeżywalności wewnątrzkomórkowej;
 - 2.3. Określenie roli szlaku PD-L1/PD-L2 w zakażeniu;
 - 2.4. Ocena udziału szlaku sygnałowego PI3K/Akt/mTOR w procesie internalizacji i wewnątrzkomórkowej przeżywalności bakterii oraz możliwość eliminacji bakterii przy udziale autofagii.

5.3.3. Uzasadnienie i omówienie uzyskanych wyników badań

AD. 1.

Ocena roli CoNS w zakażeniach ucha środkowego z wysiękiem oraz ich zdolności do wytwarzania biofilmu *in vitro* przedstawiona została w pracy: **The phenotypic and genetic biofilm formation characteristics of coagulase-negative staphylococci isolates in children with otitis media. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2011 vol. 75 nr 1 s. 126-130.**

Zapalenie ucha środkowego z wysiękiem (otitis media with effusion, OME) jest częstą chorobą wieku dziecięcego [16]. Charakteryzuje się gromadzeniem płynu w uchu środkowym, bez objawów ostrego zakażenia, takich jak ból, gorączka lub zapalenie błony bębenkowej. Jeśli wysięk utrzymuje się dłużej niż 3 miesiące, zakażenie może przejść w formę przewlekłą [16, 17]. Chociaż w większości przypadków OME jest chorobą przemijającą, u części dzieci rozwinąć się mogą trwałe ubytki słuchu, które wiążą się z opóźnieniem rozwoju mowy, zdolności komunikacyjnych i rozwoju behawioralnego [16].

Ze względu na brak oznak i objawów ostrego zapalenia sugerowano, że bakterie nie odgrywają roli w etiologii OME. W istocie, w większości badań mikrobiologicznych, żywe bakterie można było wyhodować w mniej niż połowie próbek [16]. W toku dalszych badań odkryto jednak, że w ponad 80% próbek płynów wysiękowych znajdował się bakteryjny DNA [16, 17]. Ponadto, obecność bakteryjnego mRNA i białek w tych próbkach wskazywała

na obecność metabolicznie aktywnych mikroorganizmów. Wyniki te pozwoliły przypuszczać, że wysiękowe zapalenie ucha ma związek z biofilmem.

Powyższe badanie własne miało na celu przeanalizowanie próbek płynu wysiękowego pod kątem obecności DNA oraz żywych, hodowlanych bakterii. U wyhodowanych koagulazo-ujemnych gronkowców przeanalizowałam także fenotypowe i genotypowe wskaźniki powstawania biofilmu. Jako grupę porównawczą przebadalam 23 szczepy gronkowców koagulazo-ujemnych izolowanych z wymazów z nosogardła od dzieci cierpiących na przewlekłe zapalenie zatok przynosowych. Wybór takiej grupy porównawczej został podyktowany możliwością translokacji bakterii do ucha środkowego, zazwyczaj na skutek powikłań stanów zapalnych w obrębie nosogardła oraz powszechną izolację gronkowców z takiego rodzaju materiałów klinicznych.

Spośród przebadanych 97 próbek płynu wysiękowego, pobranych śródoperacyjnie od 49 dzieci z OME, 38 (39.1%) było dodatnich w hodowli. *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*, najczęstsze patogeny związane z zapaleniem ucha środkowego, wyizolowano w 20% przypadków. Co ciekawe, spośród 30 wyizolowanych CoNS, gatunkiem wiodącym był *S. epidermidis* (76%). W badaniach wykonanych za pomocą techniki nested-PCR wykryto DNA bakterii w 58.8% próbek płynu wysiękowego, które były jałowe w hodowli. Ogólnie, próbki z dodatnim wynikiem w metodzie PCR stanowiły 97.9% wszystkich badanych próbek płynów wysiękowych. Fakt ten wskazuje, że **w diagnostyce OME identyfikację genotypową można uznać za alternatywę lub uzupełnienie klasycznych metod fenotypowych. Wyniki również jednoznacznie wskazują na rolę bakterii w patogenezie OME.**

Szeroko udokumentowany jest udział biofilmów bakteryjnych w zakażeniach przewlekłych, innych niż zakażenia biomateriałów: zakażeniach dolnych dróg oddechowych u chorych na mukowiscydozę, zakażeniach ran przewlekłych. Wśród tych chorób, wielu autorów zwraca uwagę na rolę biofilmu w patogenezie OME [6, 16, 17]. Wcześniejsze badania z zastosowaniem metody FISH (fluorescence in situ hybridization) wykazały obecność biofilmu na błonie śluzowej ucha środkowego u dzieci z utrzymującym się wysiękowym zapaleniem ucha [17, 18, 19].

Biorąc pod uwagę fakt, że tworzenie biofilmu jest uważane za istotny czynnik zjadliwości gronkowców koagulazo-ujemnych, różnicujący szczepy inwazyjne od komensalnych [7], w przedstawionym badaniu przeanalizowałam zdolności fenotypowe i genotypowe wyizolowanych CoNS do tworzenia jego struktur. Uzyskane wyniki wskazują, że badane szczepy gronkowców różniły się pod względem wytwarzania adhezyny PIA, kodowanej przez

geny tworzące operon *icaADBC*, produkcji śluzu, przylegania i morfologii kolonii na agarze Congo Red. Badania wykazały, że około 40% szczepów CoNS izolowanych z wysięków ucha środkowego miało zdolność wytwarzania śluzu polisacharydowego, co może mieć istotny wpływ na kolonizację przez bakterie różnych powierzchni i tkanek. Ponieważ ważne w procesie tworzenia biofilmu są czynniki genotypowe, w przedstawionym badaniu u wyizolowanych CoNS oceniłam obecność genów tworzących operon *icaADBC*. Wszystkie geny wchodzące w skład tego operonu wykryto u 5 (16.6%) spośród 30 analizowanych szczepów *S. epidermidis*. Wykazano silną zależność pomiędzy obecnością genów *icaADBC* u tych szczepów a tworzeniem biofilmu. Ponadto wszystkie one wytwarzały śluz. Dodatkowo u 2 kolejnych szczepów (6.6%) wykryto jednoczesną ekspresję genów *icaA* i *icaD*, jako dwóch najważniejszych genów zaangażowanych w syntezę adhezyny PIA. Szczepy te, nie miały jednak zdolności do wytwarzania śluzu, a ich zdolność do przylegania *in vitro* była umiarkowanie wyrażona.

Wśród CoNS izolowanych z nosogardzieli przeważały szczepy, które nie posiadały genotypowych ani fenotypowych właściwości do tworzenia biofilmu (19/23; 82.6%). Cztery szczepy CoNS (17.4%) tworzyły strukturę biofilmu. Cecha ta poparta była możliwością wytwarzania śluzu oraz ekspresją genów *ica*: *ADB* w 3 przypadkach (13%) oraz *icaDB* w 1 przypadku (4.3%).

Podsumowując, badanie dostarczyło fenotypowych i genotypowych dowodów na ekspresję biofilmu wśród niektórych szczepów CoNS izolowanych z przypadków OME, co podkreśla ich patogenny charakter. Cechy odpowiedzialne za powstawanie biofilmu u szczepów izolowanych z wymazów z nosogardła występowały rzadko, jednak ich obecność nawet u niewielkiego procentu bakterii, może stanowić rezerwuuar genów odpowiedzialnych za tworzenie się biofilmu, co ma znaczenie przy ewentualnej translokacji bakterii w obrębie górnych dróg oddechowych.

AD. 2.1.

Zdolności adaptacyjne SCV *S. epidermidis* do środowiska wewnątrzkomórkowego gospodarza podczas infekcji, a w szczególności zdolności SCV do przetrwania fagocytozy przez makrofagi i wpływ czynników prozapalnych na przeżywalność bakterii zostały przedstawione w publikacjach: **The role of programmed death ligand 1 pathway in persistent biomaterial-associated infections. *J. Microbiol.* 2015 vol. 53 nr 8 s. 544-552, DOI: 10.1007/s12275-015-5022-7;** oraz **Intraphagolysosomal conditions predispose**

to *Staphylococcus epidermidis* small colony variants persistence in macrophages. PLoS One. 2018 Nov 9;13(11): e0207312. doi: 10.1371/journal.pone.0207312. eCollection 2018.

W poniższych badaniach analizie poddano 10 klinicznych szczepów *S. epidermidis* wyizolowanych od pacjentów z obłuzowaniem implantu stawu biodrowego. Szczepy reprezentowały dwa fenotypy: małe warianty kolonii (SCV) i odpowiadające im szczepy dzikie (WT). Wszystkie pary mikroorganizmów zostały wyizolowane od tego samego pacjenta, a ich pokrewieństwo oceniono za pomocą testu DNA fingerprinting. Wszystkie szczepy SCV wykazywały auksotrofizm w stosunku do heminy. Stabilność fenotypu SCV oceniano poprzez sprawdzenie ich fenotypu i auksotrofii w sześciu kolejnych subkulturach. Rewertanty wykazujące wszystkie cechy normalnego fenotypu *S. epidermidis* zostały wyłączone z badania. Szczepy bakteryjne stosowane w eksperymentach zostały dokładnie scharakteryzowane przez Bogut i wsp. [20]. Wszystkie badania prowadzone były w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem linii monocytarno-makrofagowej THP-1.

Staphylococcus epidermidis przez długi czas uważany był za nieinwazyjną bakterię zewnątrzkomórkową, jednakże coraz liczniejsze badania wskazują na to, że jest to drobnoustroj dobrze przystosowany do środowiska wewnątrzkomórkowego gospodarza [21, 22, 23, 24]. Gronkowce, zarówno *S. aureus*, jak i *S. epidermidis*, posiadają zdolność wnikania i przeżywania w różnych typach komórek, m.in. w komórkach śródbłonna, komórkach nabłonkowych i osteoblastach oraz w monocytach, makrofagach i neutrofilach [21]. Z klinicznego punktu widzenia występowanie patogenów w komórkach gospodarza przyczynia się do rozwoju zakażeń przewlekłych, a zakażone komórki stanowią potencjalny rezerwuuar bakterii chorobotwórczych [25]. Dodatkowo, ich obecność w makrofagach przyczynia się do rozprzestrzeniania patogenów do obszarów odległych od pierwotnego miejsca zakażenia [25].

Fagocytoza z udziałem profesjonalnych komórek żernych układu immunologicznego, takich jak neutrofile, monocyty i w szczególności makrofagi, jest jednym z najważniejszych mechanizmów obronnych wykorzystywanych do eliminacji drobnoustrojów. Fagocyty rozpoznają, pochłaniają i niszczą mikroorganizmy za pomocą różnych mechanizmów bakteriobójczych [10]. Jednak niektóre wyspecjalizowane patogeny wewnątrzkomórkowe, takie jak *Mycobacterium tuberculosis*, czy *Legionella pneumophila*, neutralizują czynniki bójcze makrofagów, co pozwala bakteriom przeżyć i namnażać się wewnątrz tych komórek. Co ciekawe, poza typowymi wewnątrzkomórkowymi patogenami, również małe warianty kolonii *S. epidermidis* opracowały strategie unikania bakteriobójczych właściwości profesjonalnych komórek fagocytujących. Przedstawione badania *in vitro* potwierdziły,

że **SCV i odpowiadające im dzikie szczepy WT mogą przetrwać wewnątrz makrofagów przez co najmniej 3 dni bez istotnej zmiany żywotności komórek gospodarza**. Otrzymane wyniki wskazują, że chociaż liczba wewnątrzkomórkowych SCV krótko po internalizacji (2 godz.) była niższa w porównaniu do komórek WT, ich ilość tylko nieznacznie zmniejszyła się w czasie trwania obserwacji, w przeciwieństwie do szczepów dzikich, których ilość uległa znaczącej redukcji w ciągu pierwszych 24 godzin po internalizacji. Ponadto **wszystkie przebadane szczepy SCV były obecne w pożywce hodowlanej po 72 godzinach od internalizacji, podczas gdy nie obserwowano takiego zjawiska w przypadku WT**. Ten fakt, że SCV opuszczają schronienie wewnątrz komórki gospodarza ma swoje poparcie w obserwacjach klinicznych, w których zauważono, że zakażenia z udziałem SCV utrzymywały się bezobjawowo przez wiele lat, aż do momentu, gdy stan pacjenta zaburzał równowagę między utrzymującą się populacją bakterii a odpowiedzią gospodarza, dając początek nawrotowi infekcji [2, 24, 26].

Obserwacja wewnątrzkomórkowej lokalizacji bakterii dostarcza ważnych informacji o ich patogeniczności i losie w komórce gospodarza. Obecnie szeroko akceptowany jest pogląd, że bakterie wewnątrzkomórkowe, aby przeżyć wykorzystują jedną z trzech strategii: modyfikują proces powstawania fagolizosomu, przystosowują się do niskiego pH fagolizosomu lub uciekają z fagolizosomu do cytoplazmy [25].

Ponieważ, jak wcześniej udowodniłam, SCV są w stanie przetrwać w makrofagach, w dalszych badaniach starałam się zidentyfikować lokalizację wewnątrzkomórkową analizowanych bakterii i określić, ich sposoby na przetrwanie w niekorzystnym środowisku komórki fagocytydującej. W związku z tym, stosując mikroskopię konfokalną obrazowania żywych komórek hodowanych w warunkach *in vitro*, zbadalam kolokalizację bakterii znakowanych FITC z markerem późnych endosomów/lizosomów, LysoTracker Red (barwnik ten wykorzystywany jest jako wskaźnik pH fagosomu) [27]. W wyniku przeprowadzonych badań obserwowałam perfekcyjną kolokalizację pomiędzy sygnałem FITC barwionych bakterii (WT i SCV) a sygnałem markerów frakcji lizosomalnej po 2 godzinach od internalizacji bakterii. Jednak w przeciągu kolejnych 24 h fagosomy zawierające *S. epidermidis* o fenotypie WT wykazały radykalnie obniżony poziom kolokalizacji (z 55% do 37%). W przeciwieństwie do tego, znacznie wyższy odsetek fagosomów zawierających szczep SCV (92%) pokrywał się z sygnałem LysoTracker w ciągu całego czasu analizy. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że **podczas gdy szczep WT *S. epidermidis* jest eliminowany w niskim pH fagolizosomu, szczep SCV jest dobrze przystosowany do egzystencji w kwaśnej niszy makrofagów**. Zdolność SCV do utrzymywania się wewnątrz fagolizosomów

jest prawdopodobnie związana ze zmniejszonym potencjałem transbłonowym tego fenotypu bakterii lub zmianami w składzie ściany komórkowej. Ponadto wielu autorów zwraca uwagę na fakt, że przechodzenie bakterii w formę małych wariantów kolonii jest indukowane przez trudne warunki panujące w środowisku bakterii, takie jak m.in. ekspozycja na kwaśne pH środowiska [27, 28].

Dla większości drobnoustrojów, środowisko wewnętrzne aktywowanych makrofagów jest wyjątkowo niekorzystne, a fagolizosom jest pod tym względem organelum o wyjątkowych właściwościach bakteriobójczych [29]. Oprócz kwaśnego pH, niszczenie patogenów polega na wydzielaniu przez fagocytyującą komórkę tlenu azotu, wytwarzanego pod wpływem stymulacji indukowalnej syntazy tlenu azotu (inducible nitric oxide synthase, iNOS) [29]. iNOS jest niewykrywalna w spoczynkowych fagocytach i ulega ekspresji tylko w odpowiedzi na różnorodne bodźce immunologiczne i zapalne. Kiedy wzrasta poziom ekspresji iNOS, przez dłuższy czas obserwuje się wysokie stężenie NO, który reaguje z białkami i DNA sfagocytowanych mikroorganizmów [29]. Jednak, pomimo generowania NO i innych substancji bójczych, wiele klasycznych patogenów wewnątrzkomórkowych wypracowało strategię unikania właściwości bójczych fagolizosomu [29]. Przedstawione wyniki sugerują, że istnieją różnice w wytwarzaniu iNOS w odpowiedzi na obecność szczepów WT i SCV *S. epidermidis*. **SCV stymulował syntezę iNOS mniej efektywnie w porównaniu do szczepu WT, co ma duży wpływ na zdolności utrzymania się SCV w środowisku makrofagów.**

Przetrwanie bakterii w komórkach fagocytyujących wydaje się być kluczowym procesem w patogenezie zakażeń związanych ze stosowaniem biomateriałów. Biorąc pod uwagę to, że IFN- γ odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej w stosunku do bakterii wewnątrzkomórkowych, wzmacniając właściwości bójcze makrofagów [30], w następnym etapie zbadalam, czy immunomodulujące działanie cytokiny wpływa na interakcję między komórką gospodarza a patogenem. Uzyskane wyniki wskazują, że stymulacja makrofagów za pomocą IFN- γ wywiera ważny efekt na interakcję między szczepami *S. epidermidis* WT i SCV oraz makrofagami.

Po pierwsze, **przeżycie bakterii w makrofagach aktywowanych IFN- γ zostało znacznie ograniczone, niezależnie od rodzaju fenotypu bakterii.** Dowodzi to, że wewnątrzkomórkowo przebywające bakterie można wyeliminować poprzez aktywację szlaku sygnalizacyjnego zainicjowanego przez cytokinę prozapalną [31]. Stwierdziłam również, że **niektóre bakterie o fenotypie SCV opuściły stymulowane IFN- γ makrofagi,** a ich ilość w środowisku zewnątrzkomórkowym podwoiła się w ciągu 24 godzin. Zjawiska tego

nie obserwowalam w przypadku szczepów WT. Obserwacja ta sugeruje, że w przypadku SCV, ucieczka z makrofagów do środowiska zewnątrzkomórkowego może być ważnym krokiem mającym na celu uniknięcie odpowiedzi immunologicznej. Z drugiej strony, przebywając na zewnątrz komórki, bakterie są bardziej podatne na stosowane w terapii antybiotyki.

Po drugie, jak wspomniałam wcześniej, po 2 h od zakażenia zauważalny był wysoki poziom kolokalizacji między *S. epidermidis* WT i SCV a fagolizosomem, a w ciągu kolejnych 24 h poziom kolokalizacji w przypadku WT drastycznie zmalał. W wyniku stymulacji makrofagów IFN- γ , liczba organelli o kwaśnym pH zmniejszyła się w ciągu 24 godzin, co było równoważne z redukcją bakterii przebywających wewnątrzkomórkowo. Stwierdziłam również, że 12% bakterii o fenotypie SCV w trakcie badania powróciło do swojego normalnego, dzikiego fenotypu. Jak wspomniałam wcześniej, niskie pH fagosomów jest niezbędne dla wewnątrzkomórkowej trwałości fenotypu SCV. Uzyskane dane wskazują, że **stymulacja makrofagów za pomocą IFN- γ powoduje redukcję ilości fagolizosomów, a więc miejsca bytowania wewnątrzkomórkowego bakterii, co wpływa na skuteczną eliminację *S. epidermidis*, zarówno szczepów WT, jak i SCV ze środowiska komórki gospodarza.**

Ponadto, **IFN- γ , jako prozapalny bodziec dla funkcji bakteriobójczych makrofagów, wzmógł syntezę iNOS w komórkach zakażonych bakteriami.** Wykazałam wcześniej, że ekspresja iNOS była słabo wzbudzana przez SCV *per se*. Jednak po indukcji IFN- γ w makrofagach z internalizowanymi szczepami SCV i WT, poziom enzymu znacznie wzrósł.

Podsumowując, internalizacja i przeżywanie bakterii w komórkach gospodarza przyczyniają się do rozwoju przewlekłych, nawracających, niepodatnych na leczenie za pomocą antybiotyków infekcji. Wewnątrzkomórkowe środowisko i niskie pH fagolizosomu sprzyjają indukcji fenotypu SCV, co dodatkowo zwiększa prawdopodobieństwo ich przetrwania. **Przedstawione wyniki badań własnych potwierdzają wewnątrzkomórkowe bytowanie *S. epidermidis* i wyjątkowe właściwości komórek o fenotypie SCV: adaptację do kwaśnego środowiska fagolizosomu, słabą indukcję przeciwbakteryjnych mechanizmów bójczych makrofagów oraz przechodzenie do środowiska zewnątrzkomórkowego w sytuacji zwiększenia właściwości prozapalnych makrofagów. Z drugiej strony, stymulacja za pomocą IFN- γ umożliwia makrofagom wytwarzanie skutecznej prozapalnej odpowiedzi przeciwko *S. epidermidis*, niezależnie od jego fenotypu.**

A.D.2.2.

W związku z tym, że w chorobach o charakterze przewlekłym istotną rolę odgrywają cytokiny, w publikacji: **The role of programmed death ligand 1 pathway in persistent biomaterial-associated infections. *J. Microbiol.* 2015 vol. 53 nr 8 s. 544-552, DOI: 10.1007/s12275-015-5022-7** zbadalam, czy rodzaj cytokin wytwarzanych przez makrofagi zakażone szczepami SCV *S. epidermidis* może przyczynić się do ich przetrwania wewnątrzkomórkowego.

Fagocytoza i zabijanie bakterii są podstawowymi procesami obrony gospodarza przed atakującymi mikroorganizmami. Proces fagocytozy regulowany jest przez liczne mediatory, a cytokiny mają znaczący wpływ na internalizację i wewnątrzkomórkowy los patogenu [32]. Wewnątrzkomórkowe patogeny, takie jak *Mycobacterium tuberculosis*, mogą manipulować wydzielaniem cytokin dla swoich własnych korzyści, zwiększając tym samym swoje szanse na przeżycie. Jedną z głównych strategii działania tych bakterii jest ich zdolność do przekształcania odpowiedzi immunologicznej z odpowiedzi przeciwzapalnej na prozapalną [30]. Bakterie wewnątrzkomórkowe stymulują produkcję przeciwzapalnej cytokiny IL-10, a jej wysoki poziom jest charakterystyczny dla chorób chronicznych. Cytokina ta jako silny mediator przeciwzapalny, hamuje aktywację makrofagów i wpływa niekorzystnie na wytwarzanie IFN- γ oraz TNF- α przez komórki NK [33]. Makrofagi poddane działaniu tej cytokiny obniżają swoje właściwości bakteriobójcze, tworząc w ten sposób mikrośrodowisko, w którym patogen może przetrwać [33].

Gdy makrofagi są poddane silnej stymulacji, TNF- α jest jednym z pierwszych mediatorów, który zostaje uwolniony przez aktywowane komórki [33]. Cytokina ta stymuluje ostrą fazę odpowiedzi zapalnej zwiększając przepuszczalność naczyń krwionośnych, co umożliwia naciek leukocytów i mediatorów stanu zapalnego do miejsca infekcji. TNF- α , zwiększa także zdolność fagocytarną makrofagów i wzmacnia zabijanie patogenu, szczególnie w połączeniu z IFN- γ , prowadząc do eradykacji czynnika zakaźnego [32, 34].

W wyżej wspomnianym badaniu własnym zbadalam znaczenie wytwarzania IL-10 i TNF- α przez makrofagi stymulowane szczepami WT i SCV *S. epidermidis*. Warto zauważyć, że ze względu na swój komensalny charakter, rzadko badano uwalnianie cytokin pod wpływem stymulacji *S. epidermidis*. Obserwacje wykonane przez Megyeri i in. wskazują jednak, że komensalny *S. epidermidis* indukuje niższe poziomy prozapalnych cytokin w porównaniu do *S. aureus* [34].

Wyniki badań własnych wskazują, że *S. epidermidis* może wpływać na produkcję cytokin przez zakażone makrofagi w zależności od fenotypu. Inwazja makrofagów przez szczepy SCV

charakteryzowała się zwiększoną, w porównaniu do WT, syntezą IL-10. Potwierdza to fakt, że małe warianty kolonii poprzez stymulowanie uwalniania IL-10 nie indukują odpowiedzi zapalnej, zwiększając swoje szanse na przetrwanie wewnątrz komórki. Uzyskane dane wskazują również, że TNF- α może być wydzielany do środowiska pozakomórkowego po inkubacji z obydwoma fenotypami *S. epidermidis*, bez znaczącej różnicy w jego poziomie. W celu potwierdzenia udziału TNF- α w zakażeniu, następnym moim celem było określenie wpływu SCV na transkrypcyjną regulację tej cytokiny. Zaobserwowałam, że nawet jeśli oba szczepy indukowały mRNA dla TNF- α , poziom transkrypcji genu był znacząco zwiększony we wszystkich stymulowanych przez WT makrofagach w porównaniu do SCV.

Podsumowując, wyniki powyższego badania sugerują, że niższa transkrypcja genu dla TNF- α , w połączeniu z wysoką syntezą IL-10 może być związana z przewlekłym charakterem gronkowcowych infekcji związanych z biomateriałami. Istotnie, podczas przewlekającej się infekcji, SCV w dużej mierze unikają aktywacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Ten podostry charakter zakażeń może częściowo wyjaśnić, dlaczego w tego rodzaju infekcjach brak wyraźnych objawów stanu zapalnego [10, 11].

A.D. 2.3.

Szlak PD-1/PD-L1 pełni funkcję negatywnego regulatora odpowiedzi immunologicznej, prowadząc m.in. do rozwoju chorób przewlekłych, spowodowanych wyczerpaniem efektorowych limfocytów T [35]. W pracy: **The role of programmed death ligand 1 pathway in persistent biomaterial-associated infections. *J. Microbiol.* 2015 vol. 53 nr 8 s. 544-552, DOI: 10.1007/s12275-015-5022-7** sprawdziłam ekspresję PD-L1/PD-L2 na makrofagach 72 h po internalizacji *S. epidermidis* SCV i WT.

Receptor programowanej śmierci 1 (programmed death receptor 1, PD-1) to białkowy receptor ulegający ekspresji na limfocytach T, limfocytach B i monocytach/makrofagach. Jego związanie z ligandami PD-L1 i PD-L2 hamuje aktywację układu odpornościowego. PD-L1 ulega ekspresji konstytutywnie na różnych komórkach, w tym limfocytach T i komórkach linii mieloidalnej, takich jak komórki dendrytyczne i makrofagi. Jego ekspresja wzrasta po aktywacji [35]. PD-L2 ulega z kolei indukowalnej ekspresji na aktywowanych komórkach dendrytycznych i makrofagach [35, 36, 37]. PD-1, poprzez interakcję ze swoimi ligandami, wpływa na równowagę między sygnałami stymulacyjnymi i hamującymi balansując odpowiedź immunologiczną [35, 38]. Wiązanie PD-1 z jego ligandami, PD-L1 lub PD-L2 hamuje funkcję komórek T, powodując ich zmniejszoną proliferację i wytwarzanie cytokin efektorowych, takich jak IL-2 i IFN- γ . Poprzez ograniczanie aktywacji, proliferacji i funkcji efektorowych

limfocytów T, ta negatywna regulacja ma kluczowe znaczenie w zachowaniu tolerancji obwodowej. W niektórych przypadkach może być on wykorzystany przez patogeny, pozwalając im na uniknięcie rozpoznania immunologicznego i rozwój przewlekłej infekcji [39]. Podczas przewlekłego zakażenia szlak sygnalizacji PD-1/PD-L1 ulega silnej ekspresji, co prowadzi do wyczerpania limfocytów T i utratę ich funkcji cytotoksycznych. Takie komórki nieskutecznie usuwają patogen prowadząc do rozwoju przewlekłej infekcji [39]. Z kolei zablokowanie szlaku PD-1/PD-L1 prowadzi do zwiększenia proliferacji limfocytów T i wytwarzania cytokin, doprowadzając do eradykacji wewnątrzkomórkowo bytującego mikroorganizmu [37, 39].

Liczne badania wykazały, że patogeny, zarówno bakteryjne jak i wirusowe, skutecznie wykorzystują szlak sygnalizacji PD-1/PD-L1 do unikania mechanizmów efektorowych odpowiedzi immunologicznej gospodarza [37, 41]. Udowodniono, że szlak PD-1/PD-L1 odgrywa rolę w patogenezie zakażeń *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* lub *Chlamydia trachomatis* i przyczynia się do osłabienia odpowiedzi ochronnej [37, 41].

W celu poznania roli PD-L1/L2 w zakażeniach z udziałem *S. epidermidis*, zbadalam ekspresję PD-L1 i PD-L2 na makrofagach w odpowiedzi na obecność WT i SCV badanych bakterii. Stwierdziłam, że **makrofagi znacznie zwiększają ekspresję PD-L1, ale nie ekspresję PD-L2 po stymulacji obydwojoma fenotypami *S. epidermidis* 72 h po zakażeniu.**

W przedstawionym eksperymencie oba fenotypy zastosowanych bakterii były w stanie podnieść poziom ekspresji PD-L1. Jednakże, zgodnie z moimi poprzednimi wynikami, liczba utrzymujących się wewnątrzkomórkowo SCV została nieznacznie tylko zmniejszona w ciągu 72 h od internalizacji, podczas gdy liczba szczepów WT zauważalnie zmniejszyła się w trakcie obserwacji, chociaż bakterie nadal były obecne w makrofagach w małych ilościach. Liczne badania wykazują, że w większości przypadków zwiększenie poziomu ekspresji PD-L1 jest związane

z trwałą obecnością antygeny, a pozbywanie się antygeny z komórki może prowadzić do zmniejszenia ekspresji PD-L1 [35, 39]. Dane przedstawione przez McNaab et al. wskazuje, że nadmierna ekspresja PD-L1 u pacjentów z aktywną gruźlicą obserwowana w momencie rozpoznania została znacząco zmniejszona pod wpływem skutecznej terapii [41].

Wyniki te potwierdzają istotność szlaku z udziałem PD-L1 w patogenezie infekcji przewlekłych z udziałem *S. epidermidis*. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano zaburzenia funkcjonowania PD-L1, jakie ma miejsce podczas przedłużającej się ekspozycji na antygeny bakterii. Konieczne są dalsze eksperymenty w celu określenia roli szlaku PD-1/PD-L1 w patogenezie SCV, co może być krokiem w kierunku wykorzystania

terapeutycznego tego szlaku w przewlekłych infekcjach gronkowcowych związanych ze stosowaniem biomateriałów.

A.D. 2.4.

Przetrwanie w niekorzystnym środowisku komórki fagocytyzującej wymaga od patogenu opracowania różnych taktyk omijania jej bójczych właściwości. Najnowsze badania sugerują, że aktywacja szlaku PI3K/mTOR jest wykorzystywana przez drobnoustroje w celu optymalizacji ich fagocytozy i przetrwania. W pracy: **The role of the PI3K/mTOR signaling pathway in *Staphylococcus epidermidis* small colony variants intracellular survival. *Immunol. Invest.* 2018 vol. 47 nr 3 s. 251-263, DOI: 10.1080/08820139.2018.1423569** oraz w: **Intraphagosomal conditions predispose to *Staphylococcus epidermidis* small colony variants persistence in macrophages. *PLoS One.* 2018 Nov 9;13(11): e0207312. doi: 10.1371/journal.pone.0207312. eCollection 2018** sprawdziłam, czy ścieżka przekazu sygnału PI3K/mTOR odgrywa rolę w wewnątrzkomórkowym przetrwaniu *S. epidermidis* SCV.

Kinazy fosfatydyloinozydowe 3 (PI3K) i ich cząsteczki efektorowe Akt oraz mTOR (mammalian target of rapamycin) stanowią główne komponenty szlaku sygnałowego PI3K/Akt/mTOR, którego rola polega na regulacji różnorodnych procesów fizjologicznych, koordynacji proliferacji komórek, ich przeżycia, metabolizmu i stanu zapalnego. W komórkach zakażonych mikroorganizmami wewnątrzkomórkowymi zwiększona aktywność osi sygnałowej PI3K/Akt reguluje układ odpornościowy i wytwarzanie cytokin przez komórki odpornościowe. Zapobiega apoptozie i sprzyja przeżywalności komórek, a także ich proliferacji [41].

Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że aktywność kinazy Akt koreluje z internalizacją wyspecjalizowanych patogenów wewnątrzkomórkowych, takich jak *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* oraz wirusów powodujących zakażenia latentne, w tym HIV i wirusów opryszczki. Sprawia to, że kinaza Akt jest ważnym celem dla patogenów, kontrolującym proces ich internalizacji i odpowiedź immunologiczną gospodarza [30, 42, 43]. Uzyskane **wyniki własne wykazały po raz pierwszy, że szczepy SCV *S. epidermidis* mogą również kontrolować ten szlak sygnałowy, aktywując kinazę Akt w makrofagach.** Jednocześnie aktywność osi sygnalizacji PI3K/Akt została zahamowana przez szczepy WT we wszystkich przypadkach.

W następnym etapie, określony został udział szlaku PI3K/Akt w przeżywalności wewnątrzkomórkowej *S. epidermidis* obu fenotypów. Wstępna stymulacja makrofagów za pomocą inhibitora PI3K, wortmaniny, nie miała wpływu na przeżywalność znajdujących

się wewnątrzkomórkowo WT i SCV, ponieważ ich liczba była porównywalna z kontrolnymi makrofagami po 4 h inkubacji. Zaobserwowałam również, że część szczepów SCV była w stanie aktywować Akt, nawet w obecności inhibitora. Dowodzi to, że **szlak PI3K/Akt jest ważnym elementem wykorzystywanym przez SCV do internalizacji i przetrwania wewnątrzkomórkowego. Bakterie te stymulują fosforylację Akt nawet w obecności inhibitora PI3K, prawdopodobnie wykorzystując inne możliwe sposoby, na aktywność których nie wpływa wortmanina.**

Fosforylacja kinazy Akt powoduje w następnym etapie aktywację mTOR, kluczowego regulatora metabolizmu komórkowego i równowagi pomiędzy odpowiedzią pro- i przeciwzapalną. mTOR odgrywa także ważną rolę w regulacji autofagii, krytycznego procesu odpowiedzialnego za utrzymywanie homeostazy komórkowej, a także za reagowanie na bodźce, takie jak niedobór składników odżywczych, które mogą potencjalnie zagrozić przeżyciu komórki. Oprócz funkcji utrzymywania homeostazy komórkowej, stwierdzono, że autofagia jest krytycznym mechanizmem odpornościowym, który może być wykorzystywany przez komórki gospodarza w celu obrony przed patogenami wewnątrzkomórkowymi, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* [44], lub nawet bakteriami zewnątrzkomórkowymi - *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella spp.* czy *Pseudomonas spp.* [45]. Zastosowanie inhibitorów metabolicznych mTOR, takich jak rapamycyna, ma działanie immunosupresyjne i indukuje autofagię, podczas gdy stymulacja szlaku mTOR zmniejsza ten proces [44, 46].

Na podstawie przeprowadzonych badań ustaliłam, że **szczepy SCV *S. epidermidis* unikają kaskady sygnałowej mTOR, ponieważ poziom wskaźnika aktywności mTOR, fosforylowanego białka S6 (p-S6), był podobnie niski jak w kontrolnych, niezakażonych makrofagach.** Jest to istotna informacja, gdyż w warunkach podstawowych dominującą funkcją mTOR jest koordynacja szlaków wzrostu i metabolizmu komórek [41]. Z drugiej strony, podczas infekcji szczepami WT, poziom p-S6 był znacznie obniżony, w porównaniu do SCV. W przypadku szczepów WT ta obniżona aktywacja mTOR może wpływać hamująco na przeżywalność bakterii poprzez stymulację układu odpornościowego w kierunku odpowiedzi prozapalnej. Sytuacja taka jest zdecydowanie korzystna dla komórek gospodarza [41].

Następnym celem było scharakteryzowanie związku między hamowaniem mTOR za pośrednictwem rapamycyny a losem bakterii wewnątrz makrofagów. Rapamycyna jest powszechnie uznanym inhibitorem mTOR, a stosowanie inhibitorów mTOR do indukcji zależnej od mTOR autofagii jest uznawane za złoty standard [44]. **Stymulacja makrofagów**

za pomocą rapamycyny doprowadziła do znaczącej redukcji bakterii wewnątrz komórek, niezależnie od fenotypu. Było to zgodne ze spadkiem kolokalizacji obu rodzajów szczepów w obrębie fagolizosomów. Jednak odsetek SCV w fagolizosomach, mimo że zmniejszony w porównaniu z komórkami niestymulowanymi rapamycyną, był wyższy niż w przypadku WT, co wskazuje, że małe warianty kolonii *S. epidermidis* posiadają unikalne cechy metaboliczne, pozwalające im na przeciwstawienie się procesowi autofagii i kontynuację swojego wewnątrzkomórkowego bytowania.

5.3.4. Podsumowanie wyników głównego osiągnięcia naukowego

Prezentowane badania podkreślają jak bardzo ważnymi właściwościami adaptacyjnymi *Staphylococcus epidermidis* jest ich przebywanie wewnątrzkomórkowe i indukcja fenotypu SCV. Te cechy zjadliwości umożliwiają bakteriom ucieczkę przed odpowiedzią immunologiczną i stanowią podstawę zrozumienia przewlekłych i nawracających infekcji. Zrozumienie, z jednej strony, strategii wykorzystywanych przez gronkowce do wewnątrzkomórkowego przeżywania, a z drugiej strony mechanizmów immunologicznych, których wynikiem będzie pozbycie się tych patogenów, pogłębi naszą wiedzę w zakresie patogenezy zakażeń przewlekłych i nawracających. Ma to również ważne implikacje kliniczne. Strategie adaptacyjne bakterii należy wziąć pod uwagę przy opracowywaniu nowych kierunków terapeutycznych i profilaktycznych, mających na celu niedopuszczenie do tworzenia się form SCV i rozwoju przewlekłego zakażenia, jak również doprowadzenie do całkowitej eliminacji bakterii.

Poza dobrze znanymi cechami charakteryzującymi fenotyp SCV, takimi jak odmienna od dzikich szczepów morfologia, auktotrofizm, czy swoiste właściwości biochemiczne i oporność na leki, w przedstawionym cyklu publikacji zbadalam strategię *S. epidermidis* SCV o auktotrofiźmie w kierunku heminy, umożliwiające im wywołanie zakażeń przewlekłych i nawracających. Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie badań, stanowiących główne osiągnięcie naukowe, mogę sformułować następujące wnioski:

(1) Małe warianty kolonii *S. epidermidis* przeżywają wewnątrz makrofagów przez wiele dni, bez znaczącej redukcji swojej liczebności. W odróżnieniu od typowych wewnątrzkomórkowych patogenów, przeżywają wewnątrz makrofagów, do momentu aż warunki środowiska stają się odpowiednie do opuszczenia komórki gospodarza. Szczepy SCV zachowują integralność makrofagów, wykorzystując je jako wewnątrzkomórkową niszę. Jednym z dowodów na to jest brak oddziaływania z mTOR, którego hamowanie doprowadza do autofagii.

(2) W internalizacji i przetrwaniu bakterii rolę odgrywa szlak sygnałowy, w którym uczestniczą kinazy PI3K/Akt.

(3) Wiadomo, że adaptacja do wewnątrzkomórkowego środowiska chroni SCV przed humoralną odpowiedzią immunologiczną i zmniejsza ekspozycję bakterii na antybiotyki. Jednakże w obrębie makrofagów patogeny są dodatkowo atakowane przez wewnątrzkomórkowe mechanizmy obronne: niskie pH fagolizosomów i tlenek azotu. Małe warianty kolonii *S. epidermidis* mogą przeżyć bakteriobójcze działanie fagolizosomów, a ich adaptacja jest dodatkowo wspomagana przez kwaśne pH fagosomów, podczas gdy właściwości bakteriobójcze tych organelli są bardziej skuteczne wobec fenotypów WT.

(4) Małe warianty kolonii bardzo słabo indukują syntezę iNOS, co zwiększa ich szanse na przeżycie wewnątrz makrofagów.

(5) Gronkowcowe SCV nie prowokują odpowiedzi zapalnej, natomiast stymulują odpowiedź przeciwzapalną wyrażaną podwyższonym stężeniem IL-10, co łączy się z przewlekłością procesu chorobowego.

(6) Obydwa fenotypy bakterii mogą podnosić poziom ekspresji PD-L1 w zakażonych makrofagach. Ponieważ ekspresja PD-L1 jest związana z trwałą obecnością antygeny, a w ciągu 72 godzin po internalizacji ilość WT uległa znaczącej redukcji, w przeciwieństwie do SCV, wydaje się, że PD-L1 może uczestniczyć w patogenezie infekcji z udziałem SCV *S. epidermidis*.

(7) Stymulacja makrofagów IFN- γ daje komórkom gospodarza potężną przewagę nad bakteriami. IFN- γ pośredniczy w zabijaniu patogenów za pomocą kilku mechanizmów: redukcji ilości fagolizosomów a więc miejsca bytowania wewnątrzkomórkowego bakterii oraz zwiększonej syntezy iNOS. Cytokina ta może więc mieć wpływ na losy *S. epidermidis* w makrofagach, niezależnie od jego fenotypu. Pośrednio, wpływając na przechodzenie bakterii do środowiska zewnątrzkomórkowego i zmianę fenotypu z SCV na prawidłowy, IFN- γ może zwiększyć szanse eradykacji bakterii z miejsca zakażenia przy pomocy antybiotyków.

(8) Hamowanie mTOR przez rapamycynę i następnie indukcja autofagii zmniejsza przeżywalność bakterii wewnątrz makrofagów, niezależnie od ich fenotypu. Jednakże

zredukowana liczba żywych bakterii o fenotypie SCV może nadal trwać w makrofagach w warunkach autofagii.

Omawiając rolę *S. epidermidis* w patogenezie OME stwierdziłam, że:

(9) Obok typowych patogenów zapalenia ucha środkowego, koagulazo-ujemne gronkowce również odgrywają rolę w etiopatogenezie zapalenia ucha środkowego z wysiękiem. Prezentowane badanie dostarczyło fenotypowych i genotypowych dowodów na możliwości wytwarzania biofilmu przez niektóre szczepy CoNS izolowane z przypadków OME, co podkreśla ich patogenny charakter.

Bibliografia:

1. Nguyen TH, Park MD, Otto M. Host response to staphylococcus epidermidis colonization and infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7, 90:1-7.
2. Boelens JJ, Dankert J, Murk JL, Weening JJ, van der Poll T, Dingemans K, Koole L, Laman JD, Zaat SA. Biomaterial-associated persistence of *Staphylococcus epidermidis* in pericatheter macrophages. *J. Infect. Dis.* 2000; 181:1337–1349.
3. Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 2002; 4:481–489.
4. Mack D, Davies AP, Harris LG, Jeeves R, Pascoe B, Knobloch JKM, Rohde H, Wilkinson TS. *Staphylococcus epidermidis* in biomaterial-associated infections, pp. 25–56. In Moriarty, T.F., Zaat, S.A.J., and Busscher, H.J. (eds.), *Biomaterials Associated Infection*, Springer New York, USA 2013.
5. Schmidt Grant S, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and oxidative stress response. *Virulence* 2013; 4: 273-283.
6. Fergie N, Bayston R, Pearson JP, Birchall JP. Is otitis media with effusion a biofilm infection? *Clin. Otolaryngol.* 2004; 29:38-46.
7. O’Gara, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50: 582-587.
8. Thompson KM, Jefferson KK. Chapter 5. Adaptation to stress: biofilms and small-colony variants, pp.109-124. In Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler VG Jr. (eds.), *Staphylococci in human disease*, second Edition Blackwell Publishing, 2009.
9. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7(8): 555-567.
10. Sabate-Bresco M, Harris LG, Thompson K, Stanic B, Morgenstern M, O’Mahony L, Richards RG, Moriarty TF. Pathogenic mechanisms and host interactions in *Staphylococcus epidermidis* device-related infection. *Front. Microbiol* 2017; 8:1401. doi: 10.3389/fmicb.2017.01401.
11. Kahl B, Becker K, Löffler B. Clinical significance and pathogenesis of *Staphylococcal* small colony variants in persistent infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(2):401-427.

12. Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker K, Löffler B, Peters G. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; 28; 4: 99.
13. Schröder A, Kland R, Peschel A, von Eiff Ch, Aepfelbacher M. Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med. Microbiol. Immunol.* 2006; 195: 1850–194.
14. Samuelsen O, Haukland HH, Kahl BC, von Eiff Ch, Proctor RA, Ulvatne H. *Staphylococcus aureus* small colony variants are resistant to the antimicrobial peptide lactoferricin. *B. J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 56: 1126–1129.
15. Al Laham N, Rohde H, Sander G, Fisher A, Hussain M, Heilmann C, Mack D, Proctor R, Peters G. Augmented expression of polysaccharide intracellular adhesin in a defined *Staphylococcus epidermidis* mutant with small colony variant phenotype. *J. Bacteriol.* 2007; 189, 4494–4501.
16. Daniel M, Imtaiz-Umer S, Fergie N, Birchall JP, Bayston R. Bacterial involvement in otitis media with effusion. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2012; 76: 1416-1422.
17. Hoa M, Syamal M, Achaeffer MA, Sachdeva L, Berk R, Coticchia J. Biofilms and chronic otitis media: an initial exploration into the role of biofilms in the pathogenesis of chronic otitis media. *Am. J. Otolaryngol.* 2010; 31:241-245.
18. Post JC, Hiller NL, Nistico L. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 15: 347-51;
19. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieske A. Direct detection of bacterial biofilms on middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* 2006; 296:202-11.
20. Bogut A, Niedźwiadek J, Koziół-Montewka M, Strzelec-Nowak D, Blacha J, Mazurkiewicz T. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus warneri* small-colony variants associated with prosthetic-joint infections. *J. Med. Microbiol.* 2014; 63: 176–185.
21. Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda B, Maciąg-Gudowska a, Brix K, Shaw L, Foster T, Potempa J. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 2008; 3(1): e1409.
22. Garzoni Ch, Kelley WL. Return of the Trojan horse: intracellular phenotype switching and immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *EMBO Mol. Med.* 2011; 3:115-117.
23. Fraunholz, M. and Sinha, B. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2:1–10.
24. Tuchscher L, Heitman, V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff Ch, Peters G, Becker K, Löffler B. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J. Infect. Dis.* 2010; 202:1031–1040.
25. Trafny EA. Wewnątrzkomórkowe bakterie względnie chorobotwórcze w zakażeniach górnych dróg oddechowych I ucha. *Post. Mikrobiol.* 2012; 51:277-290.

26. Subbiahdoss G, Fernandez ICS, da Silva D, JF, Kuijter R, van der Mei .C, Bussche, HJ. *In vitro* interactions between bacteria, osteoblast-like cells and macrophages in the pathogenesis of biomaterial-associated infections. PLoS ONE. 2011; 6, e24827.
27. Lacoma A, Cano V, Moranta D, Regueiro V, Dominguez-Villanueva D, Laabei M. Investigating intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* within a murine alveolar macrophage cell line. Virulence. 2017; 8: 1761–1775.
28. Leimer N, Rachmul C, Marques MP, Bahlmann AS, Furrer A, Eichenseher F. Nonstable *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by low pH and sensitized to antimicrobial therapy by phagolysosomal alkalization. J Infect Dis. 2016; 213: 305–313.
29. Uribe-Querol E, Rosales C. Control of phagocytosis by microbial pathogens. Front. Immunol. 2017; <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01368>.
30. Thi EP, Lambertz U, Reiner N. Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. PLoS Pathog. 2012; 8:1–4.
31. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. J. Leukoc. Biol. 2004; 75, 163–189.
32. Ouadrhiri Y, Sibille Y. Phagocytosis and killing of intracellular pathogens: interaction between cytokines and antibiotics. Curr. Opin. Infect. Dis. 2000; 13(3):233-240.
33. Duque GA, Descoteaux A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases Front Immunol. 2014; 5: 491.
34. Megyeri K, Mandi Y, Degre M, Rosztoczy I. Induction of cytokine production by different *Staphylococcal* strains. Cytokine 2002; 19:206-212.
35. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Nat. Immunol. 2007. 8, 239–245.
36. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int. Immunol. 2007; 19, 813–824.
37. Sakai S, Kawamura I, Okazaki T, Tsuchiya K, Uchiyama, Mitsuyama M. PD-1 - PD-L1 pathway impairs Th1 immune response in late stage of infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. Intern. Immunol. 2010; 22, 915–925.
38. Wang J, Roderiquez G, Norcross MA. Control of adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus* through IL-10, PD-L1, and TLR2. Sci. Rep. 2012; 2, 10–11.
39. Hofmeyer KA, Jeon H, Zang X. The PD-1/PD-L1 (B7- H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion. J. Biomed. Biotechnol. 2011; 2011: 1–9.
40. McNab FW, Berry MP, Graham ChM, Bloch SAA, Oni T, Wilkinson KA, Wilkinson R, Kon OM, Banchereau J, Chaussabel D. Programmed death ligand 1 is over- expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis. Eur. J. Immunol. 2011; 41, 1941–1947.
41. Abdel-Nour M, Tsalikis J, Kleinman D, Girardin SE. The emerging role of mTOR signaling in antibacterial immunity. 2014; Immunol. Cell Biol. 92: 346-353.

42. Liu XQ, Cohen JI. The role of PI3K/Akt in human herpesvirus infection: From the bench to the bedside. *Virology*, 2015; 479-480: 568-577.

43. Oviedo-Boyso J, Cortés-Vieyra R, Huante-Mendoza A, Yu HB, Valdez-Alarcón JJ, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez, Finlay BB, Baizabal-Aguirre VM. The PI3K- Akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. *Infect. Immun.* 2011; 79:4569-4577.

44. Zullo AJ, Smith KLJ, Lee S. Mammalian target of Rapamycin inhibition and mycobacterial survival are uncoupled in murine macrophages. *BMC Biochemistry*, 2014; 15: doi: 10.1186/1471-2091-15-4.

45. Kahl BC. Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus* – a bacterial survival strategy. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 2014:515-522.

46. Rafii S, Roda D, Guena E, Jimenez B, Rihawi K, Capelan M, Yap TA, Molife LR, Kaye SB, de Bono JS, Banerji U. Higher risk of infections with PI3K-Akt- mTOR pathway inhibitors in patients with advanced solid tumors on phase I clinical trials. *Clin. Cancer Res.*, 2015; 21:1869-1876.

6. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH.

6.1. Tematyka pozostałych prac badawczych

Poza badaniami nad strategiami *Staphylococcus epidermidis* związanymi z przewlekłymi i nawracającymi zakażeniami, podejmowane przeze mnie prace badawcze mieszczą się w czterech głównych obszarach tematycznych:

6.1.1. Monitorowanie zanieczyszczenia systemów dystrybucji wody w szpitalach i budynkach użyteczności publicznej pałeczkami *Legionella pneumophila*.

6.1.2. Ocena częstości występowania zakażeń bakterią *Legionella pneumophila* u pacjentów z obniżoną odpornością.

6.1.3. Badania nad identyfikacją pacjentów z gruźlicą latentną (LTBI) oraz opornością na leki wśród *Mycobacterium tuberculosis*.

6.1.4. Inne zagadnienia

6.1.4.1. Retinopatie nowotworowe

6.1.4.2. Inwazyjne kandydozy u chorych z chorobą nowotworową, w trakcie chemioterapii.

6.1.1. Monitorowanie zanieczyszczenia systemów dystrybucji wody w szpitalach i budynkach użyteczności publicznej pałeczkami *Legionella pneumophila*

Bakterie z rodzaju *Legionella spp.* są czynnikami etiologicznymi ciężkiej i potencjalnie śmiertelnej postaci atypowego zapalenia płuc - choroby legionistów oraz łagodnej, samoograniczającej się choroby grypopodobnej - gorączki Pontiac. *Legionella pneumophila* odpowiada za większość przypadków legionellozy (80-90%), w tym 50-75% przypadków spowodowanych jest przez serogrupę 1 (SG 1).

Legionella jest bakterią szeroko rozpowszechnioną na całym świecie. Naturalnym środowiskiem jej występowania są źródła wody, takie jak rzeki i jeziora. Organizm kolonizuje również systemy dystrybucji wody w dużych budynkach użyteczności publicznej, gospodarstwach domowych i systemach przemysłowych a temperatura wody w zakresie od 20°C do 45°C sprzyja namnażaniu bakterii. Organizmy słabo albo wcale nie namnażają się w temperaturze poniżej 20°C i są zabijane w ciągu kilku minut w temperaturze powyżej 60°C. Najczęstszą formą przenoszenia się legionelli jest wdychanie zanieczyszczonych aerozoli wodno-powietrznych. Źródłem takiego aerozolu mogą być chłodnicze wieże klimatyzacyjne, systemy ciepłej i zimnej wody, nawilżacze i wanny z hydromasażem. Do zakażenia może również dojść poprzez aspirację skażonej wody, szczególnie u podatnych na ten typ zakażeń pacjentów hospitalizowanych.

Ze względu na powszechną obecność bakterii *Legionella* w środowisku naturalnym nie istnieją konkretne zalecenia prewencyjne mające na celu zapobiec narażeniu na kontakt z bakterią. Niemniej jednak systemy wodne powinny być odpowiednio konserwowane i kontrolowane, aby nie dopuścić do ich kolonizacji, a osoby predysponowane do zakażenia powinny unikać miejsc wysokiego ryzyka. W Polsce w 2008 roku wprowadzono regulacje prawne w zakresie kontroli systemów wodnych w dużych budynkach użyteczności publicznej pod kątem występowania *L. pneumophila*. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. "O jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi" należy podjąć działania naprawcze, gdy liczba bakterii *Legionella spp.* przekracza wartość graniczną 100 CFU/100 ml wody. W placówkach służby zdrowia, w których znajdują się pacjenci z obniżoną odpornością, w tym w ramach terapii immunosupresyjnej, *Legionella spp.* powinna być nieobecna w próbce wody o pojemności 1000 ml.

Następujące publikacje naukowe miały na celu określenie częstości występowania bakterii *Legionella spp.* w systemach ciepłej wody w zakładach opieki zdrowotnej i dużych budynkach użyteczności publicznej regionu lubelskiego:

MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, NIMFA STOJEK, MARTA PALUSIŃSKA SZYSZ, MARZENA DANIELAK, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, JOLANTA NIEWIEDZIOŁ, RENATA KONCEWICZ, JUSTYNA NIEDŹWIADEK, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, HANNA TRZECIAK, WINCENTY DROŻAŃSKI, JACEK DUTKIEWICZ. 2008. Monitoring *Legionella* species in hospital water systems. Link with disease and evaluation of different detection methods. *Ann. Agric. Environ. Med.* vol. 15 nr 1 s. 143-147 (praca oryginalna; **IF=1.44, MNiSW 15**).

Celem powyższego badania było określenie częstości występowania bakterii *Legionella spp.* w systemie gorącej wody w Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym w Lublinie. W badaniu porównano trzy metody detekcji: bezpośrednią filtrację membranową (International Standard Method, PN-ISO11731-2), bezpośrednią hodowlę na podłożach selektywnych i hodowlę z wykorzystaniem ameb. Dodatkowo, pacjenci wysokiego ryzyka zostali przebadani pod kątem obecności antygeny *L. pneumophila* SG1 w moczu. W rezultacie standardowa metoda filtracji membranowej i hodowla z wykorzystaniem ameb okazały się najczulszymi metodami do wykrywania żywych szczepów *L. pneumophila*, podczas gdy metoda bezpośredniej hodowli jest metodą najmniej czułą, mogącą mieć zastosowanie jedynie jako test przesiewowy. Liczba wykrytych bakterii *Legionella* przekroczyła 100 CFU/100 ml w 50% próbek. Wszystkie próbki pozytywne zawierały *L. pneumophila* SG 2-14. Próbki moczu pobrane od 57 pacjentów pediatrycznych były ujemne pod kątem obecności antygeny bakteryjnego.

W dwóch kolejnych publikacjach związanych z powyższą tematyką, zbadana została częstość kolonizacji *L. pneumophila* w systemach dostawy wody w wybranych szpitalach, hotelach, barakach jednostki wojskowej, domach samotnych matek, centrach handlowych i zakładach przemysłowych w regionie lubelskim. Liczbę bakterii w próbkach wody określono rekomendowaną metodą filtracji membranowej. W rezultacie, *L. pneumophila* SG 2-14 została wyhodowana z 75% badanych próbek, a w 34% próbek wody liczba *L. pneumophila* przekroczyła dopuszczalny poziom 100 CFU/100 ml. Największą liczbę bakterii *Legionella* wykryto w badanych szpitalach (średnia liczba 355 CFU/100 ml) i hotelach (średnia liczba 279 CFU/100 ml). Obecność bakterii *Legionella* w systemach wodnych stwarza realne ryzyko zakażenia, szczególnie dla osób z upośledzoną odpornością.

W pracy przeanalizowano również wpływ temperatury wody na poziom kolonizacji bakterii w systemach wodnych. Wykazano, że przez wzrost temperatury wody liczba bakterii w próbkach uległa redukcji.

Podsumowując, badanie próbek gorącej wody, pobranych z systemów dostawy wody szpitali i budynków publicznych wykazało, że dopuszczalny poziom *L. pneumophila* został przekroczony, co wskazuje na ryzyko przeniesienia zakażenia na osoby predysponowane. Uzyskane dane wskazują, że wysoka temperatura zapobiega kolonizacji układu wodnego przez bakterie - wzrost temperatury wody zmniejsza liczbę bakterii. Dowodzi to, że podwyższona temperatura wody jest dobrą metodą zwalczania bakterii *Legionella* z systemów gorącej wody budynków użyteczności publicznej.

MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, AGNIESZKA SIKORA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, IWONA JAWORSKA-GROMASZEK, IWONA GŁADYSZ, JAROSŁAW FOREMNY, ZBIGNIEW KĘDZIERSKI, JUSTYNA NIEDŹWIADEK, HANNA TRZECIAK, JOLANTA PALUCH-OLEŚ. 2008. *Legionella pneumophila* - charakterystyka mikrobiologiczna, regulacje prawne, badania mikrobiologiczne sieci wody ciepłej w budynkach zbiorowego zamieszkania. (*Legionella pneumophila* - microbiological characteristics, law regulations, microbiological examination of hot water system in the places of collective accommodation.). W: Współczesne zagrożenia zdrowia. Pr. zbior. pod red. Marii Kozioł-Montewki, Stanisławy Spisackiej Biała Podlaska 2008, Wydaw. PWSZ, s. 391-405, bibliogr. poz. 28, sum, 978-83-61044-40-6 (praca oryginalna; **MNiSW 3**).

AGNIESZKA SIKORA, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ-BOBIN, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, IWONA GŁADYSZ. 2015. Prevalence of *Legionella pneumophila* in water distribution systems in hospitals and public buildings of the Lublin region of eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* vol. 22 nr 2 s. 195-201. DOI: 10.5604/12321966.1152064 (praca oryginalna, **IF=0.895; MNiSW 20**).

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w postaci następujących doniesień zjazdowych:

MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, IWONA GŁADYSZ, MARZENA DANIELAK. Wstępna ocena zanieczyszczenia sieci wody ciepłej przez *Legionella* spp. w wybranych szpitalach województwa lubelskiego. W: XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Szczecin, 4-7 września 2008. Materiały Naukowe. [Streszcz.] s. 164. (prezentacja plakatowa).

MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, AGNIESZKA SIKORA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA. An assessment of the prevalence of *Legionella* spp. and effectiveness of thermal disinfection in eradicating the bacteria from water distribution system in a single hospital of Lublin. W: *Legionella 2009*. France, October 13-17, 2009. Abstr s. 305. (prezentacja plakatowa).

6.1.2. Ocena częstości występowania zakażeń bakterią *Legionella pneumophila* u pacjentów z obniżoną odpornością.

W Polsce choroba legionistów występuje sporadycznie, jak i epidemicznie, a epidemie są zwykle związane ze skażonymi systemami ciepłej wody. Legionelloza stanowi 3-5% przypadków zapaleń płuc, a około 5% stanowią infekcje nabyte w szpitalu. Większość przypadków choroby wymaga hospitalizacji, ze wskaźnikiem śmiertelności na poziomie około 10%. Niestety tylko 1-5% pacjentów jest prawidłowo diagnozowanych. Często rozpoznanie jest niewłaściwe lub mylone ze względu na nieswoiste objawy przypominające przeziębienie lub zapalenie płuc. Prawidłowe rozpoznanie choroby ma zasadnicze znaczenie dla zastosowania właściwej kuracji antybiotykowej - do zalecanych środków należą fluorochinolony, azytromycyna i doksycyklina. Najbardziej podatni na chorobę legionistów są mężczyźni w wieku 40-69 lat, pacjenci z obniżoną odpornością, w tym biorcy przeszczepów oraz leczeni kortykosteroidami.

Potwierdzenie podejrzenia opiera się wyłącznie na wynikach danych mikrobiologicznych: wykryciu antygeny w próbce moczu i oznaczeniu miana przeciwciał lub wykryciu DNA bakterii metodą molekularną.

W przeprowadzonych badaniach własnych oceniono miano specyficznych przeciwciał anti-*Legionella* w klasach IgM i IgG, a także sprawdzono obecność antygeny bakteryjnego w próbkach moczu pobranych od pacjentów narażonych na zachorowanie: pacjentów z atypowymi infekcjami płuc (n = 85), pacjentów ze schyłkową chorobą nerek poddawanych przewlekłej dializie (n = 213) i pacjentów po przeszczepie nerki (n = 68).

W wyniku badań, stwierdzono obecność przeciwciał klas IgM i/lub IgG przeciwko *Legionella pneumophila* SG 1-7 u 17.6% pacjentów z zakażeniami płuc. Antygen *Legionella pneumophila* SG1 w moczu wykryto u 12.5% pacjentów. Pacjenci, u których wykryto antygen w moczu również byli dodatni pod kątem dwóch badanych klas przeciwciał. W badaniu nie zaobserwowano jednak znaczącej różnicy w poziomach przeciwciał IgM i/lub IgG między pacjentami poddawanymi hemodializie, po przeszczepie nerki i zdrowych, stanowiących grupę kontrolną.

Uważa się, że ciężkie niedobory odporności związane z mocznicą i immunosupresją po przeszczepie, zwiększają ryzyko rozwoju infekcji bakteryjnych i wirusowych, w tym legionellozy. W kolejnym badaniu, przeanalizowano odpowiedź immunologiczną *ex vivo* komórek pełnej krwi, pobranych od pacjentów w immunosupresji z powodu chorób nerek, przeciwko szczepom *L. pneumophila* SG 1, SC 2-14 i ATCC 33152 Philadelphia 1 poprzez określenie poziomu cytokin TNF- α i IFN- γ . Badanie wykazało zaburzenia odpowiedzi

komórkowej u pacjentów po stymulacji różnymi szczepami *L. pneumophila*, co wskazuje na upośledzone mechanizmy obrony immunologicznej w przypadku narażenia na patogen. Powyższe wyniki wskazują na konieczność badania przesiewowego pod kątem zakażenia *Legionella pneumophila*, w szczególności u osób predysponowanych do zakażenia - z niedoborem odporności.

Wyniki badań zostały zaprezentowane w następujących publikacjach i doniesieniach zjazdowych:

AGNIESZKA SIKORA, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ANDRZEJ KSIĄŻEK, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, AGNIESZKA GRZEBALSKA, ANNA BEDNAREK-SKUBLEWSKA, ANNA STEĆ, SŁAWOMIR RUDZKI, JACEK FURMAGA, RENATA MATUSZEWSKA, BOŻENA KROGULSKA. 2013. Assessment of cytokine release after in vitro stimulation of whole blood with *Legionella pneumophila* in immunocompromised patients. *Immunol. Invest.* vol. 42 nr 1 s. 1-17. DOI: 10.3109/08820139.2012.719562. (praca oryginalna, **IF=1.903; MNiSW 15**).

AGNIESZKA SIKORA, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ANDRZEJ KSIĄŻEK, AGNIESZKA GRZEBALSKA, ANNA BEDNAREK-SKUBLEWSKA, ANNA STEĆ, SŁAWOMIR RUDZKI, JACEK FURMAGA, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MAGDALENA KARAS. 2013. Prevalence of *Legionella* antibodies in immunocompromised patients. *Centr. Eur. J. Med.* vol. 8 nr 2 s. 208-212 (praca oryginalna, **IF=0.209; MNiSW 15**).

AGNIESZKA SIKORA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ANNA SIKORA. 2014. Ocena występowania zakażeń *Legionella pneumophila* na podstawie mikrobiologicznych badań diagnostycznych. (Assessment of prevalence of *Legionella pneumophila* infections based on microbiological diagnostic tests.). *Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol. Fam. Med.* 2014 vol. 20 nr 2 s. 72-77 (praca oryginalna, **MNiSW 5**).

AGNIESZKA SIKORA, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ANDRZEJ KSIĄŻEK, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, AGNIESZKA GRZEBALSKA, ANNA BEDNAREK-SKUBLEWSKA, ANNA STEĆ, SŁAWOMIR RUDZKI, JACEK FURMAGA. Ocena uwalniania cytokin po stymulacji *in vitro* krwi pełnej pałeczkami *Legionella pneumophila* u pacjentów dializowanych oraz pacjentów po transplantacji nerki. (Assessment of cytokine release after *in vitro* whole blood stimulation with *Legionella pneumophila* in dialysis patients and in patients after renal transplantation.). W: XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów " Drobnoustroje bez granic". Lublin, 5-8 września 2012 (prezentacja plakatowa).

AGNIESZKA SIKORA, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ANDRZEJ KSIĄŻEK, AGNIESZKA GRZEBALSKA, ANNA STEĆ, SŁAWOMIR RUDZKI, JACEK FURMAGA, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ,

D. STRZELEC-NOWAK. Ocena ryzyka zakażenia *Legionella pneumophila* u pacjentów z immunosupresją. W: Mikrobiologia w medycynie, przemyśle i ochronie środowiska. Łódź, 22-23 października 2011, II edycja. Streszcz s. 54 (prezentacja plakatu).

6.1.3. Badania nad identyfikacją pacjentów z gruźlicą latentną (LTBI) oraz opornością na leki wśród *Mycobacterium tuberculosis*.

Kolejną, istotną dziedziną moich zainteresowań naukowych są zagadnienia związane z identyfikacją i opornością na leki *Mycobacterium tuberculosis*. Gruźlica nadal jest poważnym problemem zdrowotnym na całym świecie, mimo że możliwe jest skuteczne jej leczenie i dostępne są nowoczesne metody diagnostyczne. WHO szacuje, że ponad 2 miliardy ludzi na świecie (równe 1/3 światowej populacji) jest zarażonych *Mycobacterium tuberculosis*, z których u zdecydowanej większości występuje utajona postać zakażenia (latent tuberculosis infection, LTBI). Ponieważ zakażenie jest niezbędnym warunkiem wstępnym do rozwoju aktywnej postaci choroby, osoby z LTBI są uważane za najbardziej zagrożone rozwojem gruźlicy objawowej. Najważniejszym elementem działań mających na celu kontrolę nad chorobą jest zatem identyfikacja i leczenie pacjentów z utajoną postacią zakażenia.

Małe dzieci i osoby poddane terapii immunosupresyjnej przeciwciałami anty-TNF- α znajdują się w grupie podwyższonego ryzyka reaktywacji latentnej postaci gruźlicy w formę aktywną. Do niedawna tuberkulinowy test skórny (TST) był jedyną dostępną metodą diagnostyki LTBI, pomimo wielu znanych ograniczeń testu, takich jak reakcja krzyżowa ze szczepionką BCG lub fałszywie ujemne wyniki u osób z obniżoną odpornością.

Nową metodą diagnostyczną, będącą alternatywą dla TST, jest interferonowy test QuantiFERON - TB Gold. Test został opracowany do diagnostyki LTBI i do wspomagania diagnozy aktywnej postaci choroby. Zasada testu polega na ilościowym oznaczeniu IFN- γ uwalnianego przez komórki T po stymulacji przez specyficzne antygeny *M. tuberculosis*. Wykazano, że test QFT-TB jest wysoce swoisty, mniejszy wpływ na jego wynik mają wcześniejsze szczepienia szczepionką BCG, jest też bardziej czuły niż TST w wykrywaniu osób z LTBI. W Polsce test QuantiFERON-TB (QFT-TB) stosowany jest od roku 2006 z dobrymi wynikami wykrywalności LTBI u dorosłych. Jednak dokładność testu w przypadkach pediatrycznych jest słabo zbadana. U niemowląt postęp gruźlicy – od zakażenia latentnego do aktywnej choroby, jest szybki. W związku z tym podjęliśmy badania określające przydatność testu QFT-TB do wykrywania LTBI u dzieci szczepionych BCG, hospitalizowanych z powodu chorób płucnych i klinicznego podejrzenia gruźlicy (n = 156, w wieku 0-18 lat). W analizowanej grupie pacjentów 8 (5%) miało dodatnie wyniki testu,

127 (81,4%) miało ujemne wyniki testu, a 21 (13,5%) - wyniki nieokreślone. Ponadto w trakcie badania u 3 dzieci rozpoznano klinicznie i mikrobiologicznie aktywną gruźlicę. Spośród tych dzieci tylko w jednym przypadku test QFT-TB był pozytywny. W dwóch innych przypadkach uzyskano wyniki nieokreślone lub podprogowe. Wyniki sugerują, że QFT-TB może okazać się użytecznym testem przesiewowym dla LTBI u dzieci szczepionych BCG. Jednakże uzyskane dane podkreślają potrzebę ostrożnego interpretowania podprogowych lub nieokreślonych wyników u dzieci z niedoborami odporności.

Inny projekt naukowy dotyczący przydatności testu QFT-TB u chorych z ryzykiem rozwoju aktywnej gruźlicy, przeprowadzono u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (n = 81) i zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa (n = 9), którzy zostali zakwalifikowani do terapii inhibitorami TNF- α . W omawianej pracy test QFT-TB sprawdzony był po raz pierwszy u pacjentów podczas leczenia biologicznego. W badanej grupie pacjentów 20 (22,2%) uznano za zakażonych prątkami z LTBI, co wykryto na podstawie pozytywnego testu QFT-TB. Test TST wypadł dodatnio u 26 (28,9%) pacjentów. Test QFT-TB potwierdził pozytywne wyniki TST w 15 przypadkach (16,7%). W 16 przypadkach wyniki obu testów były rozbieżne. W badaniu, u 2 pacjentów z poprzednimi wynikami fałszywie ujemnego TST, leczenie inhibitorami TNF- α przerwano z powodu dodatniego wyniku testu QFT-TB. Uzyskane wyniki sugerują, że test QFT-TB może być pomocny jako test przesiewowy u pacjentów przed rozpoczęciem biologicznego leczenia inhibitorami TNF- α i może z powodzeniem zastąpić test TST. Podsumowując otrzymane wyniki, zaleca się przeprowadzenie szeroko zakrojonych badań przesiewowych wykrywających LTBI wśród pacjentów obciążonych ryzykiem reaktywacji gruźlicy. W przypadku pozytywnego wyniku testu QFT-TB zalecana jest szczegółowa diagnostyka w kierunku aktywnej gruźlicy.

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w postaci następujących publikacji oraz ustnych i plakatowych doniesień zjazdowych:

JOLANTA PALUCH-OLEŚ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ARKADIUSZ KOSZARNY, MARIA MAJDAN. 2013. Identification of latent tuberculosis infection in rheumatic patients under consideration for treatment with anti-TNF- α agents. *Arch. Med. Sci.* vol. 9, nr 1 s. 112-117. DOI: 10.5114/aoms.2013.33352 (praca oryginalna, **IF=1.890; MNiSW 20**).

JOLANTA PALUCH-OLEŚ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA. 2011. Detection of latent tuberculosis infection in BCG vaccinated children. (Wykrywanie latentnej gruźlicy u dzieci szczepionych szczepionką BCG.). Zdr. Publ. 2011 t. 121 nr 2 s. 157-161 (praca oryginalna, **MNiSW6**).

MARIA KOZIOL-MONTEWKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, E. KOT. Rapid identification of tuberculosis epididymo-orchitis by QuantiFERON-TB and INNO-LiPA Rif TB tests in semen samples. W: 13th International Congress on Infectious Diseases. Kuala Lumpur June 19-22, 2008. (prezentacja plakatowa).

ANNA STEĆ, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, MARIA KOZIOL-MONTEWKA, WOJCIECH ZAŁUSKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, ANDRZEJ KSIĄŻEK. Częstość występowania oraz czynniki ryzyka latentnego zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* wśród pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w okresie przeddializacyjnym i dializowanych w populacji o średniej zapadalności na gruźlicę. W: XXI Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego. Lublin, 12-14 czerwca 2014 (prezentacja ustna).

Dalsze badania, w których uczestniczyłam, miały na celu porównanie przydatności różnych metod laboratoryjnych do diagnozy pacjentów z gruźlicą. Obecnie powszechnie przyjmuje się, że przyszłość identyfikacji bakterii leży w metodach genetycznych. Poniższe badania podkreślają znaczenie metod opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych, w szczególności w wykrywaniu zakażeń prątkami niegruźliczymi, takimi jak *Mycobacterium avium complex*, *M. kansasii* oraz innych, szybko rosnących prątków. Bakterie te są uważane za patogeny oportunistyczne u pacjentów z supresją układu odpornościowego, alkoholików lub osób starszych. Przeprowadzone badanie miało na celu przetestowanie nowej wersji testu INNO-LiPA Mycobacteria v2, opartego na reakcji PCR, który umożliwi równoczesne wykrywanie i identyfikację 16 najczęstszych gatunków prątków (gruźliczych i niegruźliczych) do poziomu gatunku. Celem testu jest region niekodujący ITS (internal transcribed spacer), znajdujący się między genami kodującymi 16S i 23S r RNA. Przeprowadzone badania były pierwszym raportem dotyczącym przydatności testu INNO-LiPA Mycobacteria v2 w Polsce.

W rezultacie, test prawidłowo wykrył i zidentyfikował prątki gruźlicze w badanych próbkach. Co więcej, był w stanie prawidłowo wykryć gatunki bakterii w mieszaninie. Podsumowując, dostępność testów molekularnych, takich jak INNO-LiPA v2 w laboratorium prątków pozwoli na zwiększenie efektywności ich identyfikacji. Z drugiej strony testy molekularne nigdy nie powinny zastępować testów bakteriologicznych, ale powinny je uzupełniać, a ich wynik zawsze powinien być konfrontowany z obrazem klinicznym pacjenta.

Ostateczne rozpoznanie gruźlicy pozapłucnej jest często opóźnione z powodu niespecyficznego obrazu klinicznego i wyników laboratoryjnych choroby. W kolejnej publikacji przedstawiono interesujący przypadek 32-letniego pacjenta z zapaleniem jąder

i najdłuższe jako jedynymi objawami gruźlicy. W tym przypadku łączne zastosowanie nowoczesnych metod diagnostycznych: PCR i QuantiFERON-TB pozwoliło na postawienie diagnozy i rozpoczęcie odpowiedniej terapii. Warto zauważyć, że chociaż QFT-TB nie jest standardem diagnostycznym dla aktywnej gruźlicy, może pomóc w diagnozie, szczególnie w populacji osób szczepionych szczepionką BCG.

Jednym z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia populacji ludzkiej związanych z gruźlicą, jest pojawienie się szczepów opornych na wiele leków (multi drug resistance, MDR) zdefiniowanych jako oporność na co najmniej rifampicynę i izoniazyd - leki pierwszego rzutu w leczeniu gruźlicy. Przyjmuje się, że w szczególności oporność na rifampicynę stanowi marker dla MDR-TB. Oporność na rifampicynę jest związana z mutacjami w obrębie regionu genu *rpoB* o wielkości 81 pz, a wykrywanie oporności tego typu jest skutecznym testem przesiewowym identyfikującym szczepy MDR.

W kolejnym badaniu przebadano 37 izolatów klinicznych, u których fenotypowo i/lub genotypowo potwierdzono oporność na rifampicynę. Szczepy pochodziły od pacjentów z rozpoznaniem gruźlicy, mieszkających na terenie Polski Wschodniej. W celu wykrycia szczepów opornych na rifampicynę, komercyjnie dostępny test INNO LiPA Rif.TB zastosowano równolegle z konwencjonalnymi procedurami izolacji, identyfikacji i oznaczania wrażliwości. Przy użyciu testu INNO LiPA Rif.TB wykryto 36 szczepów opornych na rifampicynę, podczas gdy 24 szczepy były fenotypowo odporne na testowany lek. Podsumowując, możliwość testu INNO LiPA Rif.TB wykrycia genetycznych markerów oporności na rifampicynę u szczepów *Mycobacterium tuberculosis* sprawia, że jest to test wiarygodny i cenne narzędzie do rutynowego zastosowania diagnostycznego, Podkreślić również należy prostotę i szybkość jego wykonania.

Poniższe publikacje i doniesienie zjazdowe poświęcono powyższemu tematowi:

JOLANTA PALUCH-OLEŚ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, EWA KOT, MARIA KOZIÓŁ-MONTEWKA, 2010. Rapid identification of tuberculosis epididymo-orchitis by Inno-Lipa Rif Tb and Quantiferon-Tb Gold In Tube Tests: case report. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* Vol. 66 Nr 3 S. 314-317 (praca oryginalna, **IF=2.426; MNiSW 27**).

JOLANTA PALUCH-OLEŚ, MARIA KOZIÓŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MIROSLAWA DĄBROWSKA, HANNA TRZECIAK, AGNIESZKA BOGUT. 2008. Identification of nontuberculous mycobacteria in HIV-negative patients using the INNO-LiPA Mycobacteria v2 test. (Zastosowanie testu INNO-LiPA Mycobacteria v2 do identyfikacji prątków niegruźliczych u pacjentów HIV-ujemnych.). W: Współczesne zagrożenia zdrowia. Pr. zbior. pod red. Marii Koziół-Montewki, Stanisławy Spisackiej Białą Podlaska 2008, Wydaw. PWSZ, s. 321-328. (praca oryginalna, **MNiSW 7**).

JOLANTA PALUCH-OLEŚ, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**. 2009. Mutations in the rpoB gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Eastern Poland. *New Microbiol.* vol. 32 nr 1 s. 147-152. (praca oryginalna, **IF= 0.947, MNiSW 10**).

JOLANTA PALUCH-OLEŚ, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**. Mutations in the rpoB gene of rifampicin - resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Poland. W: 13th International Congress on Infectious Diseases. Kuala Lumpur June 19-22, 2008 (prezentacja plakatu).

Kolejny projekt badawczy, w którym uczestniczyłam, dotyczył roli późnego mediatora stanu zapalnego, białka High Mobility Group Box 1 (HMGB1), w ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej na prątki gruźlicy. W badaniu zmierzono poziom HMGB1 w surowicy pacjentów z aktywną i utajoną gruźlicą, w celu stwierdzenia czy białko to uczestniczy w patogenezie gruźlicy i jest powiązane z aktywnością choroby. Zaobserwowano, że HMGB1 jest wydzielany podczas aktywnej i latentnej gruźlicy w najwyższych ilościach, w przeciwieństwie do innych chorób płuc. Wydzielanie cytokiny prozapalnej TNF- α , o szczególnym znaczeniu w gruźlicy, było również podwyższone u pacjentów z gruźlicą i dodatnio skorelowane ze stężeniami HMGB1. Naszym zdaniem, mierząc poziom HMGB1, nie jest możliwe odróżnienie ukrytej i aktywnej gruźlicy, ani stwierdzenie prawdopodobieństwa progresji do aktywnej choroby. Ale białko to, wzmacniając odpowiedź immunologiczną, wraz z TNF- α może działać jako sygnał uszkodzenia tkankowego lub komórkowego.

Rola białka HMGB1 w gruźlicy została przedstawiona w następujących publikacjach i doniesieniach zjazdowych:

AGNIESZKA MAGRYŚ, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, TOMASZ ZABOROWSKI, JANUSZ MILANOWSKI, BARBARA MACIEJEWSKA. 2013. Evaluation of high-mobility group box 1 protein concentration in serum of patients with *M. tuberculosis* infection. *Immunol. Invest.* vol. 42 nr 1 s. 49-60. DOI: 10.3109/08820139.2012.723769 (praca oryginalna, **IF = 1.903, MNiSW 15**).

AGNIESZKA MAGRYŚ, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA SIKORA**. High-mobility group box 1 protein and TNF- α serum concentrations in legionellosis. *Int. Immunol.* 2010 vol. 22 suppl. 1 pt 3 s. iii105, 14th International Congress of Immunology. Kobe, 23-27 August 2010 (prezentacja plakatu).

JOLANTA PALUCH-OLEŚ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, TOMASZ ZABOROWSKI, JANUSZ MILANOWSKI. Evaluation of high-mobility group box 1 protein concentration in serum of patients with *M. tuberculosis* infection. *Int. Immunol.* 2010 vol. 22

suppl. 1 pt 3 s. iii114-iii115, 14th International Congress of Immunology. Kobe, 23-27 August 2010 (prezentacja plakatowa).

6.1.4. Inne zagadnienia

6.1.4.1. Retinopatie nowotworowe

Oprócz tematów związanych z mikrobiologią, moje badania naukowe koncentrowały się na zagadnieniach immunologii klinicznej. Jako postdoctoral fellow w Neuroscience Institute w Oregon Health and Science University w USA brałem udział w projekcie dotyczącym mechanizmu uszkodzenia siatkówki w retinopatii pochodzenia autoimmunologicznego.

Uszkodzenie siatkówki jest jedną z głównych przyczyn postępującej utraty wzroku u pacjentów z retinopatią nowotworową (cancer associated retinopathy, CAR). Jednak mechanizmy śmierci komórek siatkówki nie są w pełni zrozumiałe. Niektóre rodzaje retinopatii nabytej mogą być spowodowane przez działanie autoprzeciwciał, prowadzących do apoptotycznej śmierci komórek. Badania, w których uczestniczyłam, dotyczyły roli autoprzeciwciał przeciwko α -enolazie w patogenezie retinopatii. W badaniu *in vitro* po raz pierwszy stwierdzono, że przeciwciała anty-enolazowe mają zdolność blokowania działania katalitycznego enolazy, co prowadzi do obniżenia komórkowego ATP, a następnie zwiększenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , które aktywują apoptozę w komórkach siatkówki poprzez deregulację glikolizy. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że przeciwciała anty-enolazowe występujące u pacjentów z utratą wzroku mogą brać udział w patogenezie retinopatii, a nie stanowić jedynie markera choroby. Odkrycie to uzasadnia zastosowanie blokerów kanałów wapniowych przy projektowaniu odpowiedniej terapii retinopatii z udziałem autoprzeciwciał.

Publikacja wyników badań spotkała się z dużym zainteresowaniem środowiska naukowego, o czym świadczy wiele cytowań (59 - według Web of Science Core Collection).

W wyniku współpracy opublikowano następujący artykuł:

AGNIESZKA MAGRYŚ, THIMMAPPA ANEKONDA, GAOYING REN, GRAŻYNA ADAMUS. 2007. The role of anti- α -enolase autoantibodies in pathogenicity of autoimmune-mediated retinopathy. *J. Clin. Immunol.* vol. 27 nr 2 s. 181-192 (praca oryginalna **IF = 2.886, MNiSW 20**).

Uzyskane wyniki zostały również zaprezentowane w trakcie kongresu naukowego:

G. ADAMUS, **A. MAGRYŚ**, G. REN Anti-enolase antibodies block enolase function and induce apoptosis of retinal cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005 vol. 46 [b. pag.] e-abstr. 3478, ARVO Meeting (prezentacja plakatowa).

6.1.4.2. Inwazyjne kandydozy u chorych z chorobą nowotworową, w trakcie chemioterapii

Tematyka mojej rozprawy doktorskiej dotyczyła wybranych diagnostycznych i prognostycznych wskaźników inwazyjnych kandydoz u pacjentów nowotworowych poddawanych chemioterapii.

Inwazyjne zakażenia grzybicze, szczególnie te wywołane przez gatunki *Candida*, są powszechne u pacjentów w immunosupresji i wiążą się ze znaczną chorobowością i śmiertelnością. W większości przypadków, u pacjentów z neuropatią infekcja rozwija się po chemioterapii, a przyczynkiem do tego jest znaczny spadek ilości neutrofilów. Wysokie wskaźniki umieralności u pacjentów z grupy ryzyka mogą zostać zmniejszone tylko poprzez możliwie najwcześniejszą diagnozę zakażenia i odpowiednie leczenie, jeszcze zanim wystąpią objawy zakażenia ogólnoustrojowego.

Główne wnioski z badań dotyczących markerów diagnostycznych i prognostycznych inwazyjnej kandydozy są następujące: u pacjentów poddawanych chemioterapii przeciwnowotworowej niedobór MPO wydaje się być jednym z ważniejszych czynników ryzyka inwazyjnej kandydozy niezależnie od liczby neutrofilów. Co więcej, kolonizacja co najmniej dwóch obszarów ciała zwiększa ryzyko rozsianej kandydozy i może być uznana za marker prognostyczny choroby. W przypadku pacjentów z grup ryzyka, próbki kliniczne muszą być testowane przy użyciu co najmniej dwóch niezależnych metod, takich jak PCR i metoda immunoenzymatyczna wykrywająca antygen *Candida spp.* - mannan.

Wyniki tych badań zostały zaprezentowane w następujących publikacjach:

AGNIESZKA MAGRYŚ, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ELŻBIETA STAROSŁAWSKA, BEATA GĄBCZYŃSKA, AGNIESZKA SZCZEPANIK. 2005. Immunological parameters of candidiasis in cancer patients. *New Microbiol.* 2005 vol. 28 s. 355-364 (praca oryginalna, **IF = 0.529, MNiSW 3**).

AGNIESZKA MAGRYŚ, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ELŻBIETA STAROSŁAWSKA, BEATA GĄBCZYŃSKA. 2005. The prognostic and diagnostic markers of invasive candidiasis in patients during chemotherapy. *Pol. J. Microbiol.* 2005 vol. 54 nr 3 s. 207-213 (praca oryginalna, **MNiSW 10**).

MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, AGNIESZKA MAGRYŚ, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, AGNIESZKA BOGUT, KRZYSZTOF BUCZYŃSKI, STANISŁAW JABŁONKA. 2006. MPO and cytokines in the serum cancer patients in the context of *Candida* colonization and infection. *Immunol. Invest.* 2006 vol. 35 s. 167-179 (praca oryginalna, **IF = 1.276, MNiSW 10**).

7. POZOSTAŁA AKTYWNOŚĆ NAUKOWA ZMIERZAJĄCA DO POPULARYZACJI NAUKI

7.1. Streszczenia prac ze zjazdów międzynarodowych i krajowych opublikowane w suplementach czasopism

Ze zjazdów międzynarodowych:

1. ALINA OLENDER, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, JUSTYNA NIEDŹWIADEK, TATARKIEWICZ JACEK Evaluation of the effects of the biofilm and planktonic forms of *Corynebacterium amycolatum* strains on Jurkat cell line. W: 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Vienna, 22-25 April 2017.

2. MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA SIKORA**, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, JOLANTA PALUCH-OLEŚ. Prevalence of *Legionella pneumophila* antibodies in immunocompromised patients and analysis of risk factors for development of legionellosis. W: IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2011). Torremolinos, 14-16 September 2011.

3. JOLANTA PALUCH-OLEŚ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, TOMASZ ZABOROWSKI, JANUSZ MILANOWSKI. Evaluation of high-mobility group box 1 protein concentration in serum of patients with *M. tuberculosis* infection. *Int. Immunol.* 2010 vol. 22 suppl. 1 pt 3 s. iii114-iii115, 14th International Congress of Immunology. Kobe, 23-27.

4. **AGNIESZKA MAGRYŚ**, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA SIKORA** High-mobility group box 1 protein and TNF- α serum concentrations in legionellosis. *Int. Immunol.* 2010 vol. 22 suppl. 1 pt 3 s. iii105, 14th International Congress of Immunology. Kobe, 23-27 August 2010.

5. ARKADIUSZ KOSZARNY, MARIA MAJDAN, Z. KIELBIK, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA. QuantiFERON-TB Gold in Tube and tuberculin tests in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis patients qualified to anti-TNF therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 2010 vol. 69 suppl. 3 Annual European Congress of Rheumatology. Rome, 16-19 June 2010.

6. MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, **AGNIESZKA SIKORA**, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA. An assessment of the prevalence of *Legionella* spp. and effectiveness of thermal disinfection in eradicating the bacteria from water distribution system in a single hospital of Lublin. W: Legionella 2009. France, October 13-17, 2009.

7. JOLANTA PALUCH-OLEŚ, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**. Application of QuantiFERON-TB Gold in Tube assay for the detection of pulmonary tuberculosis in Poland. W: 5th Congress of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Dubrovnik, 27th-30th May 2009.

8. MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, ANETA JĘCZEŃ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MARIA JÓZWIAKOWSKA, VIOLETTA OPOKA-WINIARSKA. Detection of LTBI among BCG vaccinated children with pulmonary and connective tissue diseases. W: 5th Congress of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Dubrovnik, 27th-30th May 2009.

9. AGNIESZKA SIKORA, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA. Distribution of *Legionella* in hot water systems of hospitals and health resorts in Poland. W: European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Helsinki, 16-19 May 2009.

10. MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, AGNIESZKA SIKORA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA. The effectiveness of different methods eradicating *Legionella spp.* from water distribution systems in selected hospitals of Lublin region. W: European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Helsinki, 16-19 May 2009.

11. ARTUR NIEDZIELSKI, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, GRAŻYNA NIEDZIELSKA, MICHAŁ KOTOWSKI. Detection of staphylococcal ability for biofilm formation in otitis media in children. An evaluation of three different detection methods. W: 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelona, 19-22 April 2008.

12. JOLANTA PALUCH-OLEŚ, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**. Mutations in the rpoB gene of rifampicin - resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Poland. W: 13th International Congress on Infectious Diseases. Kuala Lumpur June 19-22, 2008.

13. MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, JOLANTA] PALUCH-OLEŚ, EWA KOT. Rapid identification of tuberculosis epididymo-orchitis by QuantiFERON-TB and INNO-LiPA Rif TB tests in semen samples. W: 13th International Congress on Infectious Diseases. Kuala Lumpur June 19-22, 2008.

14. GRAŻYNA ADAMUS, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, GAOYING REN. Anti-enolase antibodies block enolase function and induce apoptosis of retinal cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005 vol. 46 [b. pag.] e-abstr. 3478, ARVO Meeting.

15. ALINA CHUDNICKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA. Inductive effect of the opportunistic strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from patients with pharyngitis on epithelial cells. *Centr. Eur. J. Immunol.* 2005 vol. 30 suppl. 1 s. 15-16, 12th Congress of Polish Society of Clinical and Experimental Immunology. Lublin, 19th - 22nd May 2005.

16. MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ANDRZEJ MIROŚLAW, KRZYSZTOF BUCZKOWSKI, ALINA CHUDNICKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, ELŻBIETA STAROSŁAWSKA, ANNA KOŁODZIEJEK, BEATA GABCZYŃSKA, MACIEJ MONTEWKA, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ. The risk factors for candidaemia in cancer patients after surgical operation and patients

receiving chemotherapy. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004 vol. 10 suppl. 3 s. 263, 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Prague, 1-4 May 2004.

17. ELŻBIETA STAROSŁAWSKA, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA TOKARZ**. Does solcoseryl reduce postradiation damaging effects through TNF alpha and TGF beta decrease. *Immunol. Lett.* 2003 vol. 87 nr 1/3 s. 310, Abstr. of the 15th European Immunology Congress (EFIS 2003). Rhodes Island, June 8-12, 2003.

18. **AGNIESZKA TOKARZ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, BEATA GABCZYŃSKA, ELŻBIETA STAROSŁAWSKA, EWA KOSIOR, JOLANTA OLEŚ. Dysregulation of myeloperoxidase level and life-threatening *Candida* infection in subjects receiving cancer chemotherapy. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002 vol. 8 suppl. 1 s. 268, 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Milan, 21-24 April 2002.

19. MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ANDRZEJ MIROŚLAW, KRZYSZTOF BUCZYŃSKI, ALINA CHUDNICKA, **AGNIESZKA TOKARZ**, ANNA SIDOR-WÓJTOWICZ, STANISŁAW JABŁONKA. The risk factors for candidemia in lung cancer patients after surgery. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002 vol. 8 suppl. 1 s. 269, 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Milan, 21-24 April 2002.

20. MICHAŁ SAGAN, BARBARA BOROWICZ, **AGNIESZKA TOKARZ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA. Alteration in IL-6 production by cultured splenic lymphocytes following chemical sympathectomy in mice. *Pol. J. Pharmacol.* 2001 vol. 53 suppl. s. 194, bibliogr, XIVth International Congress of the Polish Pharmacological Society. Kraków, September 10-13, 2001.

21. ALINA CHUDNICKA, **AGNIESZKA TOKARZ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA. Cytokine induction and cytopathogenic influence of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* on epithelial cells (line Hep-2). *Scand. J. Immunol.* 2001 vol. 54 suppl. 1 s. 94, 11th International Congress of Immunology. Stockholm, 22-27 July 2001.

22. MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, IRENA MUSIK, **AGNIESZKA TOKARZ**. Immune response after selenium supplementation with newly synthesized organic compounds. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001 vol. 7 Suppl. 1 s. 263, 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Istanbul, 1-4 April 2001.

23. IRENA MUSIK, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA TOKARZ**. Immune response of mice after organic selenium compounds supplementation. *Scand. J. Immunol.* 2001 vol. 54 suppl. 1 s. 94, 11th International Congress of Immunology. Stockholm, 22-27 July 2001.

24. MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ELŻBIETA STAROSŁAWSKA, **AGNIESZKA TOKARZ**, BEATA GABCZYŃSKA, IRENA MUSIK. The cytokine dysregulation and life-threatening *Candida* infection in patients receiving cancer therapy. *Scand. J. Immunol.* 2001 vol. 54 suppl. 1 s. 68, 11th International Congress of Immunology. Stockholm, 22-27 July 2001.

25. MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA TOKARZ**, JANINA TRUCHLIŃSKA, ANNA SIDOR-WÓJTOWICZ. Borelioza z Lyme. Współudział infekcji w powikłaniach

neurologicznych. W: II Międzynarodowe Seminarium: Stawonogi pasożytnicze, alergogenne i jadowite - znaczenie medyczne i sanitarne. Kazimierz Dolny, 7-10 maja 2000. Lublin 2000 Wydaw. KGM s. 58-59.

26. ANNA SIDOR-WÓJTOWICZ, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA TOKARZ**. Wartość badań bakteriologicznych w przewlekłych infekcjach dróg oddechowych. W: IV Światowy Kongres Polonii Medycznej. Warszawa, 1-4 czerwca 2000.

Ze zjazdów krajowych:

1. DOROTA PITUCHA, DAMIAN RZĘTAŁA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, ALINA OLENDER. Bacterial meningitis among children older than 1 month - epidemiological situation in Poland in years 2006-2016. W: XXI Naukowa Konferencja Magnezologiczna: Pierwiastki w środowisku i medycynie. Lublin, 26 maja 2018.

2. ANNA STEĆ, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, WOJCIECH ZAŁUSKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, ANDRZEJ KSIĄŻEK. Częstość występowania oraz czynniki ryzyka latentnego zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* wśród pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w okresie przeddializacyjnym i dializowanych w populacji o średniej zapadalności na gruźlicę. W: XXI Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego. Lublin, 12-14 czerwca 2014.

3. **AGNIESZKA SIKORA**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ANDRZEJ KSIĄŻEK, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, **AGNIESZKA GRZEBALSKA**, ANNA BEDNAREK-SKUBLEWSKA, ANNA STEĆ, SŁAWOMIR RUDZKI, JACEK FURMAGA. Ocena uwalniania cytokin po stymulacji *in vitro* krwi pełnej pałeczkami *Legionella pneumophila* u pacjentów dializowanych oraz pacjentów po transplantacji nerki. (Assessment of cytokine release after *in vitro* whole blood stimulation with *Legionella pneumophila* in dialysis patients and in patients after renal transplantation.). W: XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów " Drobnoustroje bez granic". Lublin, 5-8 września 2012.

4. **AGNIESZKA SIKORA**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, ANDRZEJ KSIĄŻEK, **AGNIESZKA GRZEBALSKA**, ANNA STEĆ, SŁAWOMIR RUDZKI, JACEK FURMAGA, JOLANTA PALUCH-OLEŚ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, DAGMARA STRZELEC-NOWAK. Ocena ryzyka zakażenia *Legionella pneumophila* u pacjentów z immunosupresją. W: Mikrobiologia w medycynie, przemyśle i ochronie środowiska. Łódź, 22-23 października 2011, II edycja.

5. MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, IWONA GŁADYSZ, MARZENA DANIELAK. Wstępna ocena zanieczyszczenia sieci wody ciepłej przez *Legionella* spp. w wybranych szpitalach województwa lubelskiego. W: XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Szczecin, 4-7 września 2008. Materiały Naukowe.

6. ELŻBIETA STAROSŁAWSKA, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, **AGNIESZKA MAGRYŚ**, HELENA DONICA, KRZYSZTOF CZARNOCKI. The effect of Solcoseryl on the levels of TNF- α and TGF- β production in whole blood cell cultures of irradiated patients. *Centr. Eur. J. Immunol.* 2005 vol. 30 suppl. 1 s. 106, XIIth Congress of Polish Society of Clinical and Experimental Immunology. Lublin, 19-22 May 2005.

7. MICHAŁ SAGAN, BARBARA BOROWICZ, GRAŻYNA WÓJCIK, **AGNIESZKA TOKARZ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA. The change of production IL-6 and TNF- α in cellular farming of lymphocytes under the chemical sympathectomy in mice. W: Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism. Materials of the 12th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAS. Ed. by H. Lach. Cracow 2003, Pedagog. Univ s. 370-371.

8. AGNIESZKA SZCZEPANIK, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, GRAŻYNA NIEDZIELSKA, JUSTYNA NIEDŹWIADEK, ELŻBIETA MAZUR, ARTUR NIEDZIELSKI, **AGNIESZKA TOKARZ**, MAŁGORZATA WÓJTOWICZ, WANDA KUSA. Udział cytokin w przebiegu wysiękowego zapalenia ucha środkowego; IL-8 jako główny mediator lokalnego procesu zapalnego. W: XIII Dni Otolaryngologii Dziecięcej w Lublinie. Lublin, 18-20 wrzesień 2003.

9. BARBARA BOROWICZ, MICHAŁ SAGAN, **AGNIESZKA TOKARZ**, MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA, GRAŻYNA WÓJCIK. Modulation by lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production by chemical sympathectomy in mice. *J. Physiol. Pharmacol.* 2002 vol. 53 suppl. 1 s. 16, XXII Congress of the Polish Physiological Society. Bydgoszcz, September 4-7, 2002.

7.2. Nagrody i wyróżnienia

W 2018 roku otrzymałam Nagrodę JM Rektora Uniwersytetu Medycznego w Lublinie za zaangażowanie i wkład pracy w proces kształcenia studentów prowadzony na Oddziale Anglojęzycznym II Wydziału Lekarskiego UM w Lublinie.

7.3. Członkostwo w towarzystwach naukowych

Członek Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych

Członek Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

7.4. Recenzje wydawnicze

Dotychczas wykonałam następujące recenzje wydawnicze:

1. International Research Journal of Microbiology (1 manuskrypt, 2009 rok)
2. International Journal of Medicine and Medical Sciences (2 manuskrypty, 2010 rok)
3. Archives of Medical Science (2 manuskrypty 2011 rok)

4. International Research Journal of Agricultural Science (1 manuskrypt, 2011 rok)
5. Folia Microbiologica (1 manuskrypt, 2013 rok)
6. Journal of Sport Sciences (1 manuskrypt, 2013 rok)
7. BMJ Case Reports (1 manuskrypt, 2015 rok)
8. Pakistan Journal of Medical Sciences (1 manuskrypt, 2015 rok)
9. Medicinal Research Reviews (1 manuskrypt, 2015 rok)
10. Journal of Infectious Diseases (1 manuskrypt, 2016 rok)
11. International Journal Of Infectious Diseases and Epidemiology (1 manuskrypt, 2016 rok)
12. Diagnostic Microbiology and infectious Disease (1 manuskrypt, 2017 rok).
13. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences (1 manuskrypt, 2018 rok).

7.5. Opieka nad studentami

W latach 2016-2018 sprawowałam opiekę naukową nad 3 studentami ze Studenckiego Koła Naukowego przy Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej UM w Lublinie. Główne kierunki badań w ramach prowadzonych prac naukowych dotyczyły oceny stopnia nosicielstwa patogenów alarmowych wśród pacjentów ambulatoryjnych oraz częstotliwości występowania chorób zakaźnych (odra, krztusiec i meningokokowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych) w Polsce, ze szczególnym uwzględnieniem woj. lubelskiego.

Byłam promotorem 1 pracy licencjackiej, obronionej w 2018 roku (studentka Biomedycyny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie)

Dwukrotnie byłam opiekunem naukowym prac magisterskich.

7.6. Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki

Od początku mojej pracy na Uniwersytecie Medycznym w Lublinie (2000 rok) jestem zaangażowana w działalność dydaktyczną. Prowadzę zajęcia, seminaria, fakultety i wykłady z mikrobiologii lekarskiej dla studentów Wydziału Lekarskiego, Pielęgniarstwa i Biomedycyny. Prowadzę również zajęcia i wykłady w języku angielskim dla studentów kierunku lekarskiego Programu Amerykańskiego, Europejskiego i Azjatyckiego.

Od 2015 roku jestem koordynatorem kierunku mikrobiologii lekarskiej dla studentów anglojęzycznych.

Ponadto prowadzę zajęcia praktyczne i wykłady na kursach specjalizacyjnych z mikrobiologii medycznej dla diagnostów laboratoryjnych.

Jestem również współautorką 7 rozdziałów w podręcznikach: 3 międzynarodowych i 4 krajowych.

Na wniosek Studenckiego Towarzystwa Naukowego, zostałam zaproszona do wejścia w skład komisji oceniającej prace studentów w sesji "Nauki podstawowe i radiologia", podczas 7th Congress of Medical Simulation and Education for Students and Young Doctors, która będzie miała miejsce w Lublinie w dniach 10-11 maja 2019 roku.

7.7. Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

Odbyłam następujące staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych

1. 2000 r. (1 tydzień) Kurs technik biologii molekularnej (kurs zorganizowany przez Hungarian Society for Microbiology oraz UNESCO – Heribew University of Jerusalem International School for Molecular Biology, Microbiology and Science for Peace, Węgry).
2. 2001 r. (1 tydzień) Kurs „Technika PCR i jej zastosowanie” (kurs praktyczny przygotowany przez DNA Gdańsk i A&A Biotechnology)
3. 2003 r. (2 tygodnie) - Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie.
4. W latach 2003-2004 (1 rok) staż podoktorski w Ocular Immunology Laboratory w Neurological Sciences Institute of the Oregon Health Sciences University (OHSU), USA.

W trakcie odbywania stażu podoktorskiego uczestniczyłam jako współwykonawca w projekcie pt. ” MECHANISM OF RETINAL DAMAGE IN AUTOIMMUNE RETINOPATHY” (nr projektu EY13053), finansowanym przez National Institute of Health, USA.

7.8. Osiągnięcia organizacyjne

W ramach działalności organizacyjnej uczestniczyłam w pracach Komitetów Organizacyjnych krajowych i międzynarodowych konferencji naukowych organizowanych przez Katedrę i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej UM w Lublinie. Nazwa konferencji i charakter mojego udziału wymienione są poniżej:

I Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Legionella – rezerwuary, ocena zagrożenia zakażeniem”, 21 września 2007.

Członek komitetu organizacyjnego

Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Zakażenia układu oddechowego – postępy w diagnostyce i leczeniu”, Kazimierz Dolny 5 kwietnia 2008.

Członek komitetu organizacyjnego

Prowadzenie sesji „Diagnostyka i leczenie atypowych zapaleń płuc”

*Konferencja Naukowa „Wybrane zagadnienia zakażeń dróg oddechowych”
Lublin 5 grudnia 2008.*

Członek komitetu organizacyjnego

II Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Zakażenia układu oddechowego: postępy w diagnostyce, profilaktyce i leczeniu”, Kazimierz Dolny 24-25 kwietnia 2009.

Członek komitetu organizacyjnego

Prowadzenie sesji „Legionelloza”

XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Drobnoustroje bez granic” Lublin 5-8 września 2012.

Członek komitetu organizacyjnego

Prowadzenie sesji plakatowej „Alternatywa dla antybiotyków – poszukiwania nowych preparatów i strategii terapeutycznych”

II Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Stare i nowe patogeny – aktualne problemy”, Lublin 17-19 lutego 2017.

Członek komitetu organizacyjnego

Prowadzenie sesji „Złożony obraz infekcji”

III Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Stare i nowe patogeny – aktualne problemy”, Lublin 9-11 lutego 2018.

Członek komitetu organizacyjnego

Członek komisji sesji plakatowej

IV Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Stare i nowe patogeny – aktualne problemy”, Lublin 15-17 lutego 2019.

Członek komitetu organizacyjnego

Członek komisji sesji plakatowej

Prowadzenie sesji „Różne postacie i skutki infekcji”

Ponadto, od roku 2012 do chwili obecnej (drugą kadencję) jestem członkiem Rady II Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Anglojęzycznym UM w Lublinie. W wyniku głosowania zostałam wybrana na przedstawiciela pomocniczych pracowników nauki.

Agnieszka Magryś