



AUTOREFERAT

dr n. med. Anna Majewska
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa, 2018

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Anna Majewska

Adres służbowy: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel. 22 622 00 28, tel./fax 22 628 27 39

Obecne stanowisko: adiunkt

Tytuł naukowy: Doktor nauk medycznych

2. Wykształcenie

2004 - 2008 r. Studia doktoranckie. Obrona pracy doktorskiej pt.: *Przydatność kliniczna wybranych metod wirusologicznych w diagnozowaniu opryszczki narządów płciowych u kobiet*. Uzyskany tytuł: doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej.

Praca wykonana w ramach Studium Doktoranckiego w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Promotor w przewodzie doktorskim Prof. dr hab. n. med. Mirosław Łuczak.

Recenzenci: Prof. dr hab. Andrzej Denys, Prof. dr hab. Paweł Kamiński.

Rozprawa uzyskała wyróżnienie Rady I Wydziału Lekarskiego, WUM.

1996 - 2001 r. studia magisterskie. Obrona pracy magisterskiej na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Uzyskany tytuł: magister biologii.

2012 - 2013 r. Menedżerskie studia podyplomowe dla sektora B+W w ramach projektu *Kompetencje dla współpracy nauki i biznesu*. Wyższa Szkoła Ekonomii i Innowacji w Lublinie. Uzyskany tytuł: menedżer badań naukowych i prac rozwojowych.

2012 - 2016 r. kursy i staże specjalizacyjne do specjalizacji z zakresu mikrobiologii. Jednostka szkoląca - Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, WUM (opiekun specjalizacji dr hab. n. med. Marta Wróblewska)

3. Przebieg pracy zawodowej

od 2008 r. - obecnie, adiunkt, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawski Uniwersytet Medyczny, kierownik: Prof. dr hab. Grażyna Młynarczyk.

od 2017 r. - obecnie, starszy asystent, Zakład Mikrobiologii, Szpital Kliniczny
Dzieciątka Jezus w Warszawie, kierownik: dr n. przyr. Anna Sawicka-Grzelak.

2008 – 2017 r. młodszy asystent, Zakład Mikrobiologii, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus w Warszawie, kierownik: dr n. przyr. Anna Sawicka-Grzelak.

2004 - 2008 r. studia doktoranckie, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, WUM.

2003 - 2004 r. wykładowca, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, WUM.

2001 - 2003 r. asystent, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, WUM.

4. 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.)

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Możliwości kontrolowania zakażeń wirusami, badanie wpływu pranobeksu inozyny oraz alloferonu i jego analogów na inhibicję ludzkich wirusów *in vitro*.

Osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl 9 publikacji naukowych. Sumaryczny Impact Factor dla prac stanowiących osiągnięcie wynosi 10,773. Łączna liczba punktów zgodnie z obowiązującymi kryteriami MNiSW wynosi 154.

Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

1. Marchewka A, Majewska A*, Młynarczyk G. **Działalność ruchu antyszczepionkowego, rola środków masowego komunikowania oraz wpływ poglądów religijnych na postawę wobec szczepień ochronnych.** Post Mikrobiol. 2015;54(2):95-102.

IF 0,236, punkty MNiSW 15

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: autorstwie koncepcji, korekcie manuskryptu, konsultacji podczas pisania publikacji, doborze piśmiennictwa, korespondowaniu z redakcją.

2. Majewska A*, Lasek W, Kuczer M, Młynarczyk G. **Inhibitory effect of alloferons in combination with human lymphocytes on Human Herpesvirus 1 (HHV-1) replication *in vitro*.** Int J Pept Res Ther. 2016;22(2): 255-261.

IF 0,904, punkty MNiSW 15

Wkład własny: koncepcja pracy, zaplanowanie badań, dobór metod badawczych, wykonanie badań laboratoryjnych, analiza i opracowanie wyników, przygotowanie i analiza piśmiennictwa, pisanie pracy, korespondencja z wydawcą i recenzentami, zdobycie środków finansowych.

3. Majewska A*, Lasek W, Janyst M, Młynarczyk G. ***In vitro* inhibition of HHV-1 replication by inosine pranobex and interferon- α** . Acta Pol Pharm. 2016;73(3):637-644.
IF 0,745, punkty MNiSW 15

Wkład własny: koncepcja pracy, wykonanie badań laboratoryjnych, napisanie i przygotowanie pracy do druku, przygotowanie piśmiennictwa, analiza i opracowanie wyników, korespondowanie z wydawcą, dyskusja z recenzentem, zdobycie środków finansowych.

4. Majewska A*, Lasek W, Młynarczyk G. **Pranobeks inozyny - działanie cytotoksyczne oraz wpływ na replikację ludzkich wirusów paragrypy (HPIV-2, HPIV-4), enterowirusów (CA16, EV71) i adenowirusów (HAdV-2, HAdV- 5) w badaniu *in vitro***. Med Dosw Mikrobiol. 2015;67(2):107-114.

punkty MNiSW 7

Wkład własny: koncepcja pracy, zaprojektowanie eksperymentów, wykonanie badań, analiza i interpretacja wyników, przegląd i przygotowanie piśmiennictwa, przygotowanie pracy do druku, korespondencja z wydawcą.

5. Majewska A*, Lasek W, Janyst M, Młynarczyk G. **Inhibition of adenovirus multiplication by inosine pranobex and interferon- α *in vitro***. Cent Eur J Immunol. 2015;40(4):395-399.

IF 0,309, punkty MNiSW 15

Wkład własny: współautor koncepcji, wykonanie badań laboratoryjnych, analiza i przygotowanie piśmiennictwa, analiza wyników, napisanie manuskryptu, korespondencja z wydawcą.

6. Majewska A, Lasek W, Przybylski M, Dzieciatkowski T, Młynarczyk G. **Wpływ interferonu- α i pranobeksu inozyny na hamowanie replikacji ludzkich wirusów RNA *in vitro***. Med Dosw Mikrobiol. 2016;68(1):64-71.

punkty MNiSW 7

Wkład własny: współautor koncepcji, wykonanie badań wirusologicznych, analiza i przygotowanie piśmiennictwa, opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku, udział w przygotowaniu odpowiedzi na opinię recenzenta.

7. Kuczer M, Majewska A, Zahorska R. **New alloferon analogues: synthesis and antiviral properties**. Chem Biol Drug Des. 2013;81(2):302-309.

IF 2,507, punkty MNiSW 25

Wkład własny: zaplanowanie i wykonanie badań wirusologicznych, dobór metod badawczych, przygotowanie oraz analiza wyników w zakresie przeciwwirusowej aktywności białek, udział w korespondencji z recenzentami.

8. Kuczer M, Czerniewska E, Majewska A, Różanowska M, Rosiński G, Lisowski M. **Novel analogs of alloferon: Synthesis, conformational studies, pro-apoptotic and antiviral activity.** Bioorg Chem. 2016;66:12-20.

IF 3,231, punkty MNiSW 25

Wkład własny: zaplanowanie i wykonanie wszystkich badań wirusologicznych, analiza i opracowanie wyników w zakresie przeciwwirusowej aktywności białek.

9. Majewska A, Młynarczyk-Bonikowska B, Malejczyk M, Młynarczyk G, Majewski S. **Antiviral Medication in Sexually Transmitted Diseases. Part II: HIV.** Mini Rev Med Chem. 2015;15(2):93-103.

IF 2,841, punkty MNiSW 30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: autorstwie koncepcji, opisanie działania leków przeciwwirusowych (inhibitory odwrotnej transkryptazy), wykonaniu tabel, udziale w doborze piśmiennictwa.

* autor korespondencyjny

Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników

Wprowadzenie oraz uzasadnienie przeprowadzenia prac badawczych

Kontrolowanie zakażeń wirusami realizowane jest za pomocą immunoprofilaktyki jak i leczenia przeciwwirusowego. Powszechnie stosowane szczepienia ochronne umożliwiły eradykację wirusa ospy prawdziwej oraz przyczyniły się do zmniejszenia liczby zachorowań, m.in. na takie choroby wieku dziecięcego jak poliomyelitis, odra, różyczka, ograniczyły także występowanie zespołu różyczki wrodzonej. Współcześnie, istnieje także profilaktyka swoista innych zakażeń wirusowych, wobec których nadal niedostępne jest leczenie przyczynowe. Zaobserwowano jednak, że korzystna sytuacja epidemiologiczna skłania niektóre osoby do rezygnowania z tej formy profilaktyki. Najczęściej wymieniane powody zaniechania szczepienia nie są zgodne ze współczesną nauką, a w propagowaniu negatywnej postawy

wobec szczepień ochronnych skutecznie wykorzystywane są środki masowego komunikowania. W dobie niewystarczającej liczby leków przeciwwirusowych, biorąc pod uwagę łatwość rozprzestrzeniania się wirusów oraz brak uodpornienia części populacji ze względu na czasowe lub stałe przeciwwskazania do immunizacji, istotne jest zdefiniowanie przyczyn rezygnacji ze szczepień i wdrożenie działań zmierzających do utrzymania korzystnej sytuacji epidemiologicznej.

Historia chemioterapii przeciwwirusowej rozpoczęła się ponad 50 lat temu, kiedy William Herman Prusoff zsyntetyzował analog pirymidyny – idoxurydynę (IDU) i opisał jej właściwości przeciwnowotworowe, a Ernest C. Herrman wykazał aktywność IDU wobec wirusa opryszczki zwykłej (HSV) i wirusa krowianki (VV) oraz zaproponował jej stosowanie w leczeniu zapalenia rogówki u królików i u ludzi. Zatwierdzona w 1963 r. przez Food and Drug Administration (FDA) idoxurydyna jest pierwszym preparatem przeciwwirusowym, który nadal występuje w armamentarium leków stosowanych w terapii opryszczkowego zakażenia rogówki. Od 1962 r. do maja 2018 r. zarejestrowano 94 leki przeciwwirusowe, sklasyfikowane - na podstawie mechanizmu działania - w 14 grupach. Część leków, ze względu na słabą aktywność przeciwwirusową, szybko pojawiającą się oporność lub toksyczność została wycofana z użycia.

Chemioterapeutyki wykorzystywane są do kontrolowania zakażeń wywołanych przez zaledwie kilka spośród ponad 200 opisanych wirusów chorobotwórczych dla człowieka. Obecnie ponad 30 zatwierdzonych do stosowania preparatów, przeznaczonych jest do leczenia chorych zakażonych HIV. Skupienie uwagi na tym zakażeniu jest w pełni uzasadnione, bowiem stanowi ono istotny problemem w skali globalnej. W 2016 roku oszacowano, że na świecie z zakażeniem HIV żyje 36,7 mln osób, z czego 1,8 mln stanowią dzieci. Wykazano również, że dotychczas około 35 mln osób zmarło z powodu chorób związanych z AIDS; tylko w 2016 roku liczba zgonów wyniosła około 1 mln. Stosunkowo wiele leków dostępnych jest dla osób zakażonych wirusami zapalenia wątroby (HBV i HCV). Część z nich charakteryzuje się wysoką barierą rozwoju lekooporności i dużym potencjałem hamowania replikacji wirusa. Istotnym osiągnięciem jest opracowanie leków o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (DAAs - Direct Acting Antivirals), które umożliwiają wdrażanie leczenia zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C bez udziału interferonu- α . Mniej lub bardziej skuteczne przyczynowe leczenie przeciwwirusowe dostępne jest również w przypadku zakażeń wywołanych przez wirusy opryszczki zwykłej (HSV), wirus ospy wietrznej i półpaśca (VZV), wirus cytomegalii (CMV), wirusy grypy A i B oraz

papillomawirusy (HPV). W uzasadnionych przypadkach klinicznych podejmowane są próby stosowania zatwierdzonych leków przeciwwirusowych poza wskazaniami rejestracyjnymi.

Istotnym problemem w kontrolowaniu chorób o etiologii wirusowej jest pojawiająca się oporność kliniczna na leki. Przykładem może być oporność na acyklowir (ACV), wysoce selektywny inhibitor ludzkich alfaherpeswirusów. Pierwszy szczep wirusa opryszczki zwykłej oporny na acyklowir wyizolowano już 2 lata po rozpoczęciu dożylnego podawania leku. Potrzeba nowych inhibitorów, o odmiennym mechanizmie działania komunikowana była już w latach 80. zeszłego stulecia, jednak dopiero teraz jest szansa na nowe leki. Lekooporność może być także przyczyną niepowodzenia terapii antyretrowirusowej u osób zakażonych HIV. Szybkie tempo replikacji sprzyja występowaniu spontanicznych i częstych mutacji w genomie HIV-1, co oprócz komplikowania leczenia utrudnia prace nad zaprojektowaniem efektywnej szczepionki. Wysoka zmienność genetyczna HIV jest konsekwencją zachodzenia mutacji punktowych (substytucji, delecji i insercji) oraz rekombinacji w trakcie cyklu replikacyjnego wirusa. Oporność na leczenie przeciwwirusowe zależne jest od wielu czynników, do których oprócz aktywności replikacyjnej wirusa zaliczane są: siła działania leku, jego bariera genetyczna oraz profil genetyczny pacjenta.

Niestety, większość leków przeciwwirusowych interferuje tylko z określonym etapem replikacji jednego lub kilku, spokrewnionych gatunków wirusów. Konwencjonalny model *jeden wirus - jeden lek* istotnie ogranicza możliwości terapeutyczne, dlatego w strategii kontrolowania zakażeń wirusowych może być konieczne poszukiwanie związków o działaniu plejotropowym. Obecnie, podejmowane są działania mające na celu ustalenie nowych algorytmów leczenia, badanie aktywności przeciwwirusowej lub immunomodulującej nowych związków (w tym substancji pochodzenia naturalnego i ich syntetycznych analogów) oraz kojarzenia znanych chemioterapeutyków w celu maksymalizacji efektu terapeutycznego.

Do cyklu publikacji włączyłam prace, w których opisuję przykłady ograniczonych możliwości kontrolowania zakażeń wirusami u ludzi oraz prezentuję wyniki eksperymentów dotyczące aktywności przeciwwirusowej, dostępnego od ponad czterech dekad leku pranobeksu inozyny oraz wykorzystywanego w terapii adiuwantowej różnych chorób interferonu- α .

Pranobeks inozyny jest syntetyczną pochodną puryny i należy do grupy farmaceutyków przeciwwirusowych ogólnego zastosowania. Mechanizm działania leku nie został w pełni wyjaśniony. Prawdopodobnie związek ten bierze udział w hamowaniu syntezy wirusowego RNA. Stymuluje układ odpornościowy wpływając na dojrzewanie oraz aktywację

limfocytów, stymuluje wytwarzanie cytokin, takich jak interleukina 1 (IL-1) i interleukina 2 (IL-2), interleukina 12 (IL-12), TNF- α i interferon- γ (IFN- γ), hamuje wytwarzanie IL-10, nasila działanie cytotoksyczne komórek NK oraz pobudza chemotaksję i fagocytozę.

Na przełomie lat 80. i 90. opublikowano wyniki badań *in vitro* i *in vivo* dotyczące roli pranobeksu inozyny w leczeniu osób zakażonych HIV. Wykazano, że lek nie działa inhibicyjnie na HIV-1 jednak może opóźnić progresję infekcji w kierunku pełnoobjawowego AIDS. Podczas prób wyjaśnienia tego zjawiska wykazano, że pranobeks inozyny działa inhibicyjnie na metabolizm *Pneumocystis jiroveci* (dawniej *P. carinii*) poprzez wpływ na syntezę kwasu foliowego. Składnik pranobeksu inozyny - 4-acetyloaminobenzoetan (PACBA) - działa jako inhibitor kompetycyjny syntezy kwasu foliowego, podobnie jak sulfonamidy wykorzystywane do leczenia i profilaktyki zapalenia płuc o etiologii *P. jiroveci*. Te obserwacje wskazują na możliwość wykorzystania pranobeksu inozyny również w kontrolowaniu zakażeń drobnoustrojami, które syntetyzują kwas foliowy, a nie korzystają z jego zasobów dostępnych w środowisku. Dodatkowo, zaobserwowano, że pranobeks inozyny w skojarzeniu z zydowuiną powoduje zwiększenie stężenia zydowudyny w osoczu oraz wydłużenie czasu półtrwania leku.

Interferon- α (IFN- α) natomiast, jest cytokiną zaangażowaną w immunologiczną odpowiedź organizmu na miejscowym i ogólnoustrojowym poziomie, wykazuje plejotropowe działanie przeciwwirusowe. Jego forma pegylowana stosowana jest w skojarzeniu z innymi lekami w terapii wirusowego, przewlekłego zapalenia wątroby. Poza dwoma wymienionymi lekami, przedmiotem mojego zainteresowania był alloferon, peptyd wyizolowany w 2002 r. z hemolimfy larw muchy plujki pospolitej (*Calliphora vicina*) eksperymentalnie immunizowanych komórkami *Escherichia coli* i *Micrococcus luteus* oraz jego syntetyczne analogi. Aktywność alloferonu i jego pochodnych jest obecnie przedmiotem zainteresowania badaczy różnych dyscyplin z obszaru medycyny i biologii medycznej.

Oceną aktywności biologicznej związków pochodzenia naturalnego (seskwiterpenów oraz taksolu) w hodowlach komórkowych zajmowałam się także w pierwszych latach mojej pracy w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej, czego wyrazem są 3 publikacje oryginalne oraz doniesienia na zjazdach krajowych i zagranicznych. Prace te ze względu na fakt, że zostały opublikowane przed uzyskaniem tytułu doktora nie zostały włączone do przedstawianego osiągnięcia.

Publikacja 1. Działalność ruchu antyszczepionkowego, rola środków masowego komunikowania oraz wpływ poglądów religijnych na postawę wobec szczepień ochronnych.

Praca jest próbą zdefiniowania przyczyn negatywnych postaw wobec wykonywania szczepień ochronnych. Obecnie, w wielu krajach Europy, sytuacja epidemiologiczna zakażeń, którym można zapobiegać poprzez szczepienie jest korzystna, jednak agresywne postawy antyszczepionkowe związane są z lokalnie i okresowo podwyższoną liczbą zachorowań np. na odrę lub świnkę. W przedstawionej publikacji opisano historię ruchu antyszczepionkowego na świecie oraz sposoby komunikowania o szkodliwości wykonywania szczepień ochronnych.

Akty sprzeciwu wobec profilaktyki zakażeń wirusami pojawiły się już w XVIII w., kiedy rozpoczęto wariolację, a następnie wakcynację, aby zapobiegać ospie prawdziwej. W kolejnych latach w Wielkiej Brytanii zaczęto wprowadzać obowiązek wykonywania szczepień u dzieci. Podobnie jak w czasach współczesnych, potraktowano to działanie jako zamach na wolność i prawa obywatelskie. Pod koniec XIX w. protesty antyszczepionkowe pojawiły się w Stanach Zjednoczonych, a w latach 90. XX w. narodził się jeden z największych mitów dotyczący szczepień – *szczepienia powodują autyzm*.

Obecnie przeciwnicy szczepień skutecznie wykorzystują środki masowego komunikowania, w prezentowaniu swoich postaw. Przestrzeń internetowa jest istotnym narzędziem przekazywania informacji, również tych udostępnianych przez samozwańczych ekspertów. Treści antyszczepionkowe konstruowane są w taki sposób, aby były łatwo przyswajalne i wydały się przekonujące, są przepełnione emocjami np. zawierają materiał w formie osobistych historii rodziców. Do głównych sposobów działania przeciwników szczepień należy zdyskredytowanie badań oraz nauki i podważanie autorytetów oraz stosowanie historii zmieniających się hipotez (w przypadku negacji szczepionki skojarzonej przeciwko odrze, śwince i różyczce). Współcześnie, przedstawiciele różnych kościołów na świecie - z nielicznymi wyjątkami - opowiadają się za koniecznością szczepienia. Wątpliwości wiernych niesłusznie budzi jednak skład szczepionek oraz sposób ich produkcji. Niepokoje dotyczą głównie substancji pomocniczych pochodzenia zwierzęcego, hodowli szczepów szczepionkowych wirusów na liniach komórkowych wywodzących się ze składników krwi czy z tkanek płodów.

Analizując powody rezygnacji ze szczepień ochronnych zauważyliśmy, że jest ich wiele i trudno ustalić ten najistotniejszy. Stwarza to ogromną trudność w prowadzeniu rozmów z

oponentami, wyjaśnieniu wątpliwości dotyczących profilaktyki zakażeń, co w konsekwencji, w przyszłości może utrudniać kontrolowanie zakażeń wirusami.

Publikacja 2. Inhibitory effect of alloferons in combination with human lymphocytes on *Human Herpesvirus 1 (HHV-1) replication in vitro.*

Celem pracy była ocena wpływu alloferonów (I i II) na replikację referencyjnego szczepu wirusa opryszczki zwykłej (ludzki herpeswirus typu 1; HHV-1 McIntyre) oraz ocena skojarzonego działania alloferonów wraz z limfocytami (stymulowanymi przez fitohemaglutyninę; PHA i nie poddanych stymulacji) na namnażanie HHV-1 *in vitro*.

Badania przeprowadzono w hodowli ludzkich komórek linii HEp-2 (komórki z nowotworu krtani), Hel 299 (hodowla pierwotna, fibroblasty płuca), A549 (komórki raka płuca). W komórkach eksponowanych przez 48 godz. na alloferon w dawkach 50-400 µg/ml i/lub limfocyty (1×10^4 komórek w 0,1 ml) nie zaobserwowano zmian morfologicznych (obserwacja mikroskopowa przy użyciu mikroskopu optycznego odwróconego; powiększenie 400x) świadczących o toksycznym wpływie białek i limfocytów. Wyniki badań kalorymetrycznych (test redukcji soli tetrazolowej w mitochondriach komórek, MTT) potwierdziły to spostrzeżenie. Efekt przeciwwirusowy oznaczono metodą redukcji mian zakaźnych (YRA, yield reduction assay). Zastosowano metodę Reed-Muench'a do oceny medialnego stężenia inhibitora hamującego w 50% funkcje biologiczne wirusów (IC_{50} , inhibitory concentration).

Wykazano, że alloferony redukują miano HHV-1 w sposób zależny od stężenia. Stężenie 200 µg/ml alloferonu I i II obniżyło miano zakaźne wirusa o odpowiednio 1,69 i 1,76 $\log_{10}TCID_{50}/ml$. Alloferon I i II w stężeniu 400 µg/ml obniżył miano wirusa o odpowiednio 3,12 i 2,13 $\log_{10}TCID_{50}/ml$. Efekt ten został wzmocniony po dodaniu limfocytów. Alloferon I w skojarzeniu z limfocytami spowodował znaczące statystycznie obniżenie miana wirusa o maksymalnie 3,69 $\log_{10}TCID_{50}/ml$ (400 µg/ml alloferonu I/limfocyty stymulowane PHA) w porównaniu z mianem wirusów bez inhibitorów. Podobnie, wzmocnienie działania inhibicyjnego alloferonu II zaobserwowano po ekspozycji wirusa na 400 µg/ml alloferonu II i limfocytów stymulowanych PHA (o 3,27 $\log_{10}TCID_{50}/ml$).

Efekt działania alloferonów oceniono także na podstawie stężenia hamującego funkcje biologiczne wirusa. Wartość IC_{50} alloferonu I względem HHV-1 wynosiła 394,3 µg/ml, alloferonu II 304,41 µg/ml. Aplikacja limfocytów wspólnie z alloferonami do hodowli komórek zakażonych wirusem pozwoliła zredukować IC_{50} alloferonów I i II do 317,53

i 303,09 $\mu\text{g/ml}$. Po zastosowaniu limfocytów stymulowanych fitohemaglutyniną IC_{50} zostało zredukowane do wartości odpowiednio 306,00 i 213,63 $\mu\text{g/ml}$.

Podsumowując, wykazano, że testowane syntetyczne odpowiedniki peptydów wyizolowanych z hemolimfy gąsienic *Calliphora vicina* (alloferon I i II) wpływają inhibicyjnie na HHV-1_{MC}. Przeciwwirusowe działanie alloferonów zostało wzmocnione po podaniu limfocytów oraz limfocytów, których proliferacja została stymulowana fitohemaglutyniną.

Publikacja 3. *In vitro* inhibition of HHV- 1 replication by inosine pranobex and interferon- α .

Posiadając wiedzę na temat przeciwwirusowego działania interferonu- α poszukiwaliśmy odpowiedzi na pytanie, czy interferon może wzmacniać działanie pranobeksu inozyny w warunkach *in vitro*. Pranobeks inozyny obecnie stosowany jest w leczeniu i profilaktyce zakażeń ludzkimi alfa herpeswirusami (HHV-1, HHV-2, VZV), a w połączeniu z interferonem- α (IFN- α) w podostrym stwardniającym zapaleniu mózgu (SSPE) będącym odległym powikłaniem po zakażeniu wirusem odry.

Celem badania była ocena inhibicji trzech szczepów wirusa opryszczki zwykłej (HHV-1) przez pranobeks inozyny i IFN- α *in vitro*. W badaniu wykorzystano szczep referencyjny HHV-1_{MC} (McIntyre) wrażliwy na acyklowir (IC_{50} ACV 0,68 $\mu\text{g/ml}$) oraz dwa szczepy kliniczne odporne na ACV i alternatywnie podawany - cidofowir (HHV-1_{H3a} i HHV-1_{f12k}; IC_{50} ACV >250 $\mu\text{g/ml}$, IC_{50} CDV >500 $\mu\text{g/ml}$). Aktywność przeciwwirusową oceniano w hodowli ludzkich komórek linii Hep-2 i Hel 299, wcześniej ustalając, że badane związki nie wykazują toksycznego działania na hodowle komórek, w których prowadzono eksperymenty (metoda jakościowa tj. ocena efektu cytopatycznego i ilościowa za pomocą testu MTT).

Zastosowano pranobeks inozyny w dawkach 50-400 $\mu\text{g/ml}$ oraz 100 i 1000 IU/ml IFN- α . Działanie przeciwwirusowe oceniono na podstawie zdolności wprowadzonych do hodowli inhibitorów do zredukowania mian wirusów oraz redukcji IC_{50} pranobeksu inozyny.

Analiza wyników pozwoliła na stwierdzenie, że pranobeks inozyny, po dodaniu do zakażonej wirusem hodowli, wpływa inhibicyjnie na HHV-1, a jego aktywność przeciwwirusowa zależy od stężenia leku. Siła hamowania namnażania wirusa *in vitro* zależy także od szczepu wirusa i linii komórkowej, w której prowadzony jest eksperyment. Pranobeks najsilniej zredukował miano zakaźne referencyjnego szczepu wirusa w hodowli komórek HEL 299. IFN- α (1000 IU/ml) zredukował miano wszystkich wirusów o ok. 1 \log_{10} w

porównaniu z kontrolą. IFN- α wzmocnił także działanie pranobeksu inozyny. Po aplikacji 400 $\mu\text{g/ml}$ pranobeksu i 1000 IU/ml IFN- α do zakażonej HHV-1_{MC} hodowli HEL 299 miano zakaźne zostało zredukowane o ponad 3 \log_{10} w porównaniu z kontrolą wirusa. Miana szczepów HHV-1_{MC}, HHV-1_{H3a} i HHV-1_{F12K} eksponowanych na te inhibitory w linii komórkowej HEp-2 zostały zredukowane o ponad 1,5 \log_{10} w porównaniu do miana wirusa nie eksponowanego na żadne inhibitory. Skojarzenie 1000 IU/ml IFN- α i pranobeksu spowodowało także redukcję IC₅₀ pranobeksu, najistotniej w badaniu względem referencyjnego szczepu wirusa opryszczki zwykłej, o odpowiednio 26,3% i 49,8% w hodowli Hel 299 i HEp-2.

Wykazaliśmy zatem, że pranobeks inozyny wpływa inhibycyjnie na wirusy opryszczki zwykłej. IFN- α wzmocnił zdolność leku do redukcji mian zakaźnych wirusów *in vitro*. Efekt inhibycyjny zależy w dużym stopniu od szczepu HHV-1 oraz zastosowanej linii komórkowej. Dotyczy to zarówno pranobeksu inozyny, IFN- α jak i skojarzonego działania obu preparatów. Spostrzeżenia te, zwracają uwagę na rozważne porównywanie wyników i uwzględnienie w ich interpretacji odmiennych warunków, w których prowadzone są eksperymenty *in vitro*.

Publikacja 4. Pranobeks inozyny – działanie cytotoksyczne oraz wpływ na replikację ludzkich wirusów paragrypy (HPIV-2, HPIV-4), enterowirusów (CA16, EV71) i adenowirusów (HAdV-2, HAdV- 5) w badaniu *in vitro*.

W prezentowanej pracy oceniano wpływ pranobeksu inozyny na redukcję mian zakaźnych 4 klinicznych szczepów wirusów RNA: HPIV-2, HPIV-4, CA16, EV71 oraz 2 wirusów DNA: HAdV-2 i HAdV-5. Żaden z obecnie znanych preparatów przeciwwirusowych nie posiada rejestracji do leczenia zakażeń wirusami wykorzystanymi w badaniu. Eksperymenty przeprowadzono w linii ludzkich komórek A549.

Efekt przeciwwirusowy oznaczono metodą redukcji mian zakaźnych (YRA) wyrażając miano wirusa w $\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Wyniki oceniono statystycznie z wykorzystaniem metody korelacji Pearsona (r-Pearsona) do pomiaru zależności pomiędzy dawkami pranobeksu inozyny, a średnimi wartościami mian wirusów.

W pierwszym etapie badań wykazano, że pranobeks inozyny w stężeniach 50-800 $\mu\text{g/ml}$ nie

wykazuje toksycznego działania na hodowlę komórek. Żywotność komórek eksponowanych na lek wynosiła 96,70 - 99,90% (średnio 98,36%).

Badając aktywność przeciwwirusową leku, zauważono, że wyższe stężenia pranobeksu inozyny silniej redukują miano zakaźne wirusów. Analizując współczynnik korelacji Pearsona zaobserwowano istotną zależność zakaźnego miana EV71 i HPIV-4 od dawki pranobeksu. Pranobeks inozyny wykazał najniższą aktywność (redukcja miana o 1,00 \log_{10} TCID₅₀/ml) wobec enterowirusów. W prowadzonym eksperymencie miano zakaźne wirusa paragrypy HPIV-2 zostało zredukowane o 1,30 \log_{10} TCID₅₀/ml, a HPIV-4 o 1,19 \log_{10} TCID₅₀/ml. Lek w stężeniu 800 μ g/ml redukował miano zakaźne HAdV-2 i HAdV-5 w stosunku do kontroli średnio o odpowiednio 1,68 \log_{10} i 1,86 \log_{10} TCID₅₀/ml.

Podsumowując, wykazano, że badane wirusy DNA (adenowirusy) cechują się wyższą wrażliwością na działanie pranobeksu inozyny niż stosowane w eksperymentach wirusy RNA (enterowirusy i wirusy paragrypy).

Publikacja 5. Inhibition of adenovirus multiplication by inosine pranobex and interferon- α *in vitro*.

Wśród zarejestrowanych leków przeciwwirusowych brakuje chemioterapeutyku o działaniu przeciwadenowirusowym. Opcją terapeutyczną jest wprowadzenie cidofowiru, jednak jego główne działanie niepożądane tj. nefrotoksyczność oraz koszt terapii stanowią poważne ograniczenia stosowania.

W przedstawianej publikacji znajdują się wyniki badań, dotyczące działania pranobeksu inozyny i interferonu- α na namnażanie ludzkich adenowirusów. Oceniano redukcję mian zakaźnych HAdV-2 i HAdV-5 po ekspozycji na jednocześnie dodawane do hodowli wirusów inhibitory w różnych stężeniach. Obliczono medialne stężenie pranobeksu hamującego w 50% funkcje biologiczne wirusów (IC₅₀).

Zaobserwowano, że IFN- α w stężeniu 1000 IU/ml dodany do zakażonych wirusami hodowli wykazał słabe działanie inhibicyjne. Ekspozycja 2000 IU/ml IFN- α silniej zredukowała miano; HAdV-2 o blisko 2 \log_{10} , a HAdV-5 o około 1 \log_{10} w porównaniu z kontrolą (komórki zakażone wirusem bez inhibitorów). Pranobeks w maksymalnej stosowanej w badaniu dawce (800 μ g/ml) obniżył miano wirusów o ponad 1,5 \log_{10} . Wprowadzenie 800 μ g/ml pranobeksu i 2000 IU/ml IFN- α do zakażonej adenowirusem hodowli A549 skutkuje obniżeniem miana o około 3 \log_{10} .

Jednoczesna ekspozycja adenowirusów na pranobeks i 2000 IU/ml IFN- α obniżyła wartość IC₅₀ pranobeksu o odpowiednio 53,1% i 52,4% (w stosunku do IC₅₀ pranobeksu bez działania interferonu) w badaniu z udziałem HAdV-2 i HAdV-5.

Po obliczeniu indeksu interakcji (CI) zauważono, że pranobeks inozyiny i IFN- α synergistycznie redukują miano wirusów HAdV-2 (CI: 0.80) i HAdV-5 (CI: 0.73) w badaniu *in vitro*.

Wykazano zatem, że pranobeks inozyiny oraz IFN- α wprowadzone jednocześnie do zakażonych adenowirusem (HAdV- 2 oraz HAdV-5) hodowli komórek A549 działają synergistycznie i wywołują, istotnie statystycznie silniejsze działanie przeciwwirusowe niż monoterapia bez toksycznego wpływu na komórki, co może mieć wartość aplikacyjną.

Publikacja 6. Wpływ interferonu- α i pranobeksu inozyiny na hamowanie replikacji ludzkich wirusów RNA *in vitro*.

Zważywszy, że pranobeks inozyiny wykazuje działanie plejotropowe przeprowadzono kolejne eksperymenty, których celem była ocena wpływu IFN- α oraz pranobeksu na miana zakaźne wirusów RNA: wirusa Coxsackie A16 (CA-16), enterowirusa 71 (EV71), oraz wirusa paragrypy 4 (HPIV-4) w warunkach *in vitro*.

W badaniu wykazano, że IFN- α istotnie hamuje namnażanie wymienionych wirusów. Redukcja mian zakaźnych zależna była od stężenia interferonu. IFN- α dodany do hodowli wirusów w stężeniu 1000 IU/ml obniżył średnie miano zakaźne EV71 o 0,94, CA-16 o 2,33, a HPIV-4 o 1,33 log₁₀ TCID₅₀/ml w porównaniu do kontroli, którą stanowiła hodowla komórek A549 zakażonych wirusami i nie poddanych działaniu inhibitora. Pranobeks inozyiny w maksymalnej dawce zastosowanej w badaniu (400 μ g/ml) obniżył miano wirusów RNA o 0,80-0,88 log₁₀TCID₅₀/ml. W kolejnym etapie dodawano do hodowli wirusów jednocześnie IFN- α i pranobeks inozyiny. Analizując wpływ 1000 IU/ml IFN- α oraz 400 μ g/ml pranobeksu stwierdzono istotną statystycznie redukcję mian. Miano EV-71 zostało zredukowane o 1,76, HPIV-4 o 1,60, a CA-16 o 3,00 log₁₀TCID₅₀/ml w porównaniu z mianem kontrolnym (tj. miano wirusa bez ekspozycji na inhibitory). Aplikacja 1000 IU/ml IFN- α wspólnie z pranobeksem do hodowli komórek linii A549 zakażonych CA-16 zredukowała IC₅₀ pranobeksu o 41,7 %. W przypadku HPIV-4 i EV71 efekt ten był słabszy IC₅₀ pranobeksu zostało zredukowane o odpowiednio 29% i 3,5%.

Podsumowując, stwierdzono, że interferon- α redukuje miana zakaźne EV71, CA-16, HPIV-4. Wirus CA-16 jest najbardziej wrażliwy na działanie IFN- α . IFN- α wzmacnia

inhibicyjne działanie pranobeksu inozyny wobec badanych wirusów RNA. Skojarzenie inhibitorów najsilniej redukuje miano zakaźne wirusa Coxsackie A16 *in vitro*.

Publikacja 7. New alloferon analogues: synthesis and antiviral properties.

Publikacja 8. Novel analogs of alloferon: Synthesis, conformational studies, pro-apoptotic and antiviral activity.

Współcześnie istnieje możliwość wykorzystania modelowania molekularnego w projektowaniu leków. W publikacjach zaprezentowane są m. in. wyniki badań dotyczące aktywności biologicznej związku naturalnego pochodzenia, alloferonu oraz jego 36 analogów. Peptydy zostały opracowane drogą syntezy na Wydziale Chemii, Uniwersytetu Wrocławskiego. Wśród badanych związków znajdują się fragmenty alloferonu skrócone od N- i C-końca łańcucha peptydowego oraz białka, w których reszta histydyny (His) w pozycji 1, 9 lub 12 została wymieniona na aminokwasy zasadowe (Ala, Arg, Lys) lub aromatyczne (Phe, Phg, Tyr, Trp, Phe(*p*-Cl), Phe(*p*-OMe)).

W publikacji 7. oceniano aktywność przeciwwirusową peptydów wobec chorobotwórczych dla człowieka szczepów wirusa DNA (HHV-1_{MC} i szczep kliniczny HHV-1 z wykorzystaniem hodowli komórek Vero i HEp-2) i szczepów wirusa RNA (971 PT Coxsackievirus B2; CVB-2 971 PT i szczep kliniczny Coxsackievirus B2; CVB-2 z wykorzystaniem hodowli HEp-2 i LLC-MK2). Skuteczność hamowania replikacji wirusów wyrażono na podstawie stężenia białek hamujących w 50% funkcje biologiczne wirusów (IC₅₀).

Po wykonaniu serii eksperymentów stwierdzono, że najwyższą aktywność wobec HHV-1_{MC} w hodowli komórek Vero spośród analogów alloferonu skróconych od N-końca łańcucha peptydowego wykazały białka: [4-13]-alloferon, [6-13]-alloferon [7-13]-alloferon. Peptydy te posiadają podobną aktywność przeciwko klinicznemu szczepowi HHV-1 w tej samej hodowli komórek. W kolejnych badaniach, z wykorzystaniem linii komórkowej HEp-2, wykazano, że najwyższą aktywność wobec szczepu klinicznego HHV-1 posiadają: [3-13]-alloferon i [6-13]-alloferon. Wśród analogów skróconych od C-końca, związkiem wykazującym działanie przeciw HHV-1_{MC} porównywalne z alloferonem był [1-11]-alloferon.

Badano także białka, w których reszta His¹ alloferonu została wymieniona na reszty aminokwasów aromatycznych wykazując, że wszystkie te białka hamują replikację HHV-1_{MC} w komórkach Vero, a wartość IC₅₀ tych peptydów jest zbliżona do IC₅₀ alloferonu. Wśród analogów zmodyfikowanych w pozycji 9 (publikacja 8.) najwyższą aktywność

przeciwwirusową posiada [Ala⁹]-alloferon, a średnie stężenie hamujące [Arg⁹]- [Lys⁹]-, [Trp⁹]-alloferonu i analogów zawierających pochodne fenyloalaniny w pozycji *para*-podstawionej grupą hydroksylową ([Tyr⁹]-alloferon), grupą metoksyłową ([Phe (*p*-OMe)⁹]), jak również atomem chloru ([Phe (*p*-Cl)⁹]) jest niższe niż alloferonu. Analogi zmodyfikowane wprowadzeniem fenyloglicyny (Phg) i fenyloalaniny (Phe) w pozycję 9 wymagają zastosowania znacznie wyższych stężeń do redukcji miana referencyjnego szczepu HHV-1. Badania właściwości przeciwwirusowych analogów alloferonu modyfikowanych w pozycji 12 wykazały, że mają one słabszą od natywnego peptydu aktywność przeciwwirusową lub utraciły swoje właściwości inhibicyjne.

W publikacji 7. wykazano działanie alloferonu i jego skróconych analogów na inhibicję szczepów wirusa CVB-2. Alloferon - w wykorzystanych w badaniu stężeniach - nie działa hamująco na szczepy wirusa Coxsackie B2 namnożone w komórkach LLC-MK₂, ale wszystkie jego analogi ze skróconym łańcuchem polipeptydowym wykazały aktywność w stosunku do CVB-2 971 PT w stężeniach nietoksycznych. Najniższe IC₅₀ odnotowano dla [3-13]-alloferonu. Po wykonaniu takich samych eksperymentów w hodowli HEp-2 okazało się, że oprócz alloferonu także [5-13]-alloferon nie hamuje namnażania CVB-2 971 PT. Wykorzystany w badaniu szczep kliniczny jest wrażliwy na alloferon w hodowli komórek HEp-2. Białka [3-13]-alloferon i [6-13]-alloferon hamują jego namnażanie w stężeniach niższych niż IC₅₀ alloferonu.

Podsumowując, stwierdziliśmy, że chemiczna modyfikacja alloferonu wywołała zmiany aktywności przeciwwirusowej nowych białek, co pozwoliło na wyselekcjonowanie peptydów, które hamują namnażanie wirusów *in vitro*. Stwarza to możliwość uzyskania specyficznych i skutecznych inhibitorów, zwłaszcza tych wirusów, wobec których współczesna medycyna nie dysponuje możliwościami leczenia i/lub profilaktyki.

Publikacja 9. Antiviral medication in sexually transmitted diseases. Part II: HIV.

Praca jest drugą z cyklu trzech publikacji, w których opisano współczesne możliwości kontrolowania zakażeń wywołanych przez wirusy przenoszone drogą płciową. W tej części opisano związki mające zastosowanie w leczeniu osób zakażonych HIV i profilaktyce zakażeń tym wirusem. Przedstawiono również kierunki badań zmierzające do opracowania nowych chemioterapeutyków.

W publikacji wymieniono inhibitory sklasyfikowane do 6 klas chemioterapeutyków, są to: nukleotydowe i nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NRTI), nienukleozydowe

inhibitory odwrotnej transkryptazy (NNRTI), inhibitory proteazy (PI), inhibitory integrazy (II) i inhibitory wejścia (inhibitory fuzji; FI i inhibitory koreceptora CCR5).

Pierwszym lekiem przeciwwirusowym zastosowanym u osób zakażonych HIV była zydowudyna (AZT) zsyntetyzowana w 1964 r. jako lek przeciwnowotworowy. Oporność na AZT zaobserwowano już po 6. miesiącach jej stosowania w monoterapii. Wykazano, że brak skuteczności leczenia korelował z występowaniem mutacji w genie odwrotnej transkryptazy wirusa (T215Y, K70R, D67N, M41L, L210W). Do inhibitorów odwrotnej transkryptazy należy również lamiwidyna, obecna także w schemacie leczenia zakażenia HBV. Istotnym postępowaniem w leczeniu zakażonych HIV było wprowadzenie leków o odmiennym mechanizmie działania i należących do innych klas inhibitorów tj.: NNRTI i PI; obecnie w każdej z tych grup występuje odpowiednio 5 i 9 leków. Ostatnim (2006 r.) zatwierdzonym inhibitorem proteazy jest posiadający wysoką barierę genetyczną darunawir. Od 2007 dostępne są 3 inhibitory integrazy; raltegrawir posiada stosunkowo niską barierę oporności, związaną z trzema głównymi mutacjami: N155H, Q148H/K/R i Y143R. Mutacje indukowane przez ten lek odpowiadają również za wysoki stopień oporności na elwitegrawir. Dolutegrawir należy do II generacji inhibitorów integrazy i dostępny jest od 2012 r. Ostatnia grupa leków to inhibitory wejścia, jedynymi przedstawicielami są marawirok i enfuwirtyd. Marawirok jest inhibitorem receptora CCR5 dla chemokin, wybiórczo wiąże się z receptorem CCR5 i uniemożliwia przedostanie się CCR5-tropowych wirusów HIV-1 do wnętrza komórki. Enfuwirtyd natomiast blokuje fuzję między błoną komórkową wirusa i komórki docelowej. Obecnie w trakcie badań jest kilka innych inhibitorów wejścia, np.: cenikriwirok i sifuwirtyd (inhibitor fuzji III generacji) oraz charakteryzujący się 11-14-sto dniowym okresem półtrwania - albuwirtyd.

Istotnym postępowaniem było wykazanie, że leki przeciwretrowirusowe mogą być również stosowane jako profilaktyka przedekspozycyjna (fumarany dizoproksylu tenofowiru z emtrycytabiną) u osób niezakażonych HIV w celu zmniejszenia ryzyka nabycia tego zakażenia oraz jako profilaktyka poekspozycyjna po narażeniu na zakażenie wirusem.

Podczas przygotowywania publikacji na temat możliwości kontrolowania chorób wirusowych jeszcze bardziej zainteresował mnie temat związany z chemioterapią tych zakażeń. Postanowiłam wykonać testy w warunkach *in vitro* oceniające aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych (antimicrobial peptides; AMPs) oraz innych związków o potencjale przeciwwirusowym lub immunomodulującym. Efektem kilkuletniej pracy w

laboratorium są wyniki, które zaprezentowałam w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe.

Podsumowanie wyników

1. Pranobeks inozyny wpływa inhibicyjnie na namnażanie badanych, chorobotwórczych dla człowieka wirusów DNA. Redukuje miano zakaźne wirusa opryszczki zwykłej typu 1, hamuje również namnażanie adenowirusów (HAdV-2, HAdV-5) *in vitro*. Aktywność przeciwwirusowa zależy od szczepu wirusa oraz zastosowanej linii komórkowej.
2. Pranobeks inozyny wykazuje słabszą aktywność w redukcji mian zakaźnych wirusów RNA (wirus Coxsackie A16, enterowirus 71 i wirusy paragrypy: HPIV-2, HPIV-4) niż wykorzystanych w badaniu wirusów DNA.
3. Interferon- α redukował miano wszystkich wirusów wykorzystanych w eksperymentach, najsilniejsze działanie hamujące wykazał wobec wirusa Coxsackie A16.
4. Interferon- α wzmocnił aktywność przeciwwirusową pranobeksu inozyny. Skojarzenie inhibitorów, silniej niż monoterapia, redukowało miana badanych wirusów DNA i RNA, co może mieć znaczenie praktyczne. Najsilniejszy efekt inhibicyjny zaobserwowano w stosunku do wirusa Coxsackie A16 oraz adenowirusów.
5. Badane, syntetyczne odpowiedniki naturalnych peptydów (alloferon I i II) wpływają inhibicyjnie na HHV-1. Przeciwwirusowe działanie alloferonów zostało wzmocnione po podaniu limfocytów oraz limfocytów, których proliferacja została stymulowana fitohemaglutyniną.
6. Chemiczna modyfikacja struktury alloferonu powoduje zmiany aktywności przeciwwirusowej analogów białka natywnego.
 - a. Analogi alloferonu skrócone od N-końca łańcucha peptydowego działają inhibicyjnie na CVB-2 971 PT w hodowli LLC-MK2, w stężeniach nietoksycznych. W badaniu aktywności przeciw HHV-1_{MC} w hodowli komórek Vero wykazano, że IC₅₀ [4-13]-, [6-13]- i [7-13]-alloferonu jest niższe od IC₅₀ natywnego białka.
 - b. Wśród analogów skróconych od C-końca, związkiem wykazującym działanie przeciw HHV-1_{MC} porównywalne z alloferonem był [1-11]-alloferon.
 - c. Wszystkie badane analogi, w których reszta His¹ alloferonu została wymieniona na reszty aminokwasów aromatycznych hamują replikację HHV-1_{MC}, a wartość IC₅₀ tych peptydów jest zbliżona do IC₅₀ alloferonu.

- d. Wśród analogów zmodyfikowanych w pozycji 9 najwyższą aktywność przeciwwirusową posiada [Ala⁹]-alloferon. Średnie stężenie hamujące [Arg⁹]- [Lys⁹]-, [Trp⁹]-, [Tyr⁹]-, [Phe (*p*-OMe)⁹]-, jak również [Phe (*p*-Cl)⁹]-alloferonu jest niższe niż białka natywnego.
- e. Analogi alloferonu modyfikowane w pozycji 12 wykazały najniższą aktywność przeciwwirusową.

5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

Moje zainteresowania naukowe dotyczą również zagadnień związanych z diagnostyką laboratoryjną zakażeń wywołanych przez bakterie i wirusy oraz badaniem lekooporności klinicznych szczepów drobnoustrojów. Realizuję następujące tematy badawcze:

Znaczenie kliniczne oraz możliwości współczesnej laboratoryjnej diagnostyki zakażeń wirusowych

Aktualnie dostępnych jest wiele metod laboratoryjnych, które mogą być wykorzystane w rozpoznawaniu zakażeń wirusowych, począwszy od tych samodzielnie opracowanych w laboratoriach, do walidowanych testów komercyjnych. O wyborze decydują następujące czynniki: czułość i swoistość, rodzaj próbki materiału klinicznego pobranego od chorego, sposób jej pobrania i przechowywania, faza zakażenia, możliwości techniczne wykonania badania oraz jego koszt. Wyniki badań prowadzonych w tym zakresie zostały opublikowane w 11 pracach oryginalnych pełnotekstowych i w 2 opisach przypadków. Na podstawie aktualnej wiedzy i otrzymanych wyników, sformułowano następujące stwierdzenia:

1. Klasyczny PCR oraz test zmodyfikowany real-time PCR czy multiplex PCR mogą z powodzeniem zastąpić metodę referencyjną tj. izolację wirusów w hodowli komórek w rozpoznawaniu miejscowych zakażeń wirusem opryszczki zwykłej. Metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych mają współcześnie przewagę nad innymi metodami, gdyż: cechuje je wyższa czułość, procedury przedlaboratoryjne wpływają w mniejszym stopniu na wynik badania, czas badania jest znacznie krótszy, a DNA wirusów może być wykrywane w różnych materiałach klinicznych i w różnych fazach zakażenia.
2. Wykrywanie DNA HSV w surowicy za pomocą ilościowej reakcji real-time (qPCR) ma istotną wartość u pacjentów we wczesnym okresie po przeszczepowym (po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych). Wysoka czułość gwarantuje wykrycie reaktywacji wirusa przy

niskim poziomie wirerii, pomimo stosowania profilaktyki przeciwwirusowej (acyklowir), co może mieć również związek z opornością wirusów na analogi nukleozydów u tych pacjentów. Prowadzenie takich obserwacji ma aspekt praktyczny, bowiem wg piśmiennictwa szczepy HSV odporne na acyklowir izolowane są od ok. 30% biorców komórek krwiotwórczych. Badacze podkreślają, że w tej grupie chorych zaobserwowano wzrost lekooporności, co może mieć związek z obecnie rekomendowanym protokołem leczenia immunosupresyjnego.

3. Do oceny aktywności przeciwwirusowej leków i nowych związków o potencjale przeciwwirusowym stosuje się metody fenotypowe. Wykazano, że w przypadku HSV-1 procedura oparta na zastosowaniu pierwotnej hodowli mysich neuronów może być zastosowana zarówno do badania wrażliwości szczepów wirusów na acyklowir i cidofowir, jak i do oceny działania innych inhibitorów *in vitro*.

Zakażenia bakteriami beztlenowymi u chorych hospitalizowanych z uwzględnieniem monitorowania wrażliwości na antybiotyki

Diagnostyka laboratoryjna zakażeń bakteriami beztlenowymi stanowi dla mikrobiologów klinicznych jedno z najtrudniejszych wyzwań, mimo że techniki identyfikacji są sukcesywnie doskonalone. Przeprowadzone w tym zakresie badania pozwoliły na sformułowanie następujących stwierdzeń:

1. Metoda spektrometryczna (MALDI-TOF) jako jednostopniowa identyfikacja jest metodą z sukcesem zaadoptowaną do rutynowej identyfikacji bakterii beztlenowych. Pozwala na wiarygodną i dokładniejszą identyfikację istotnych klinicznie gatunków bakterii beztlenowych w porównaniu z dotychczas stosowanymi metodami fenotypowymi (Api 20A, Rapid 32A, Vitek 2), skraca również czas badania. Okazuje się jednak, że istotnym problemem diagnostycznym mogą być nadal zakażenia gatunkami zasiedlających środowisko człowieka, nie włączone do baz danych systemów identyfikujących bakterie. Opisałiśmy przypadek pourazowego zakażenia tkanek miękkich z zajęciem pochewek ścięgniętych, wykazując konieczność zapewnienia dostępu do metod molekularnych np. sekwencjonowania fragmentu genu 16S rRNA, aby wykonać pełne badanie bakteriologiczne.

2. Bakterie beztlenowe izolowane są z różnych materiałów klinicznych (krew, płyn z jamy brzusznej, fragmenty tkanek, ropa z ropnia itp.). U chorych hospitalizowanych na oddziałach transplantacyjnych i chirurgicznych w miejscu zakażeń występowały często pałeczki Gram-

ujemne, istotne kliniczne ze względu na zjadliwość i zdolność do wywoływania zakażeń uogólnionych. Na oddziałach ortopedycznych (zabiegowych) często identyfikowano bakterie Gram-dodatnie. Opisano jednak dwa powikłane przypadki kliniczne zakażeń z udziałem *Bacteroides fragilis* oraz problemy w ich leczeniu. Zasadność wykonywania oznaczania wrażliwości na antybiotyki bakterii beztlenowych była przedmiotem dyskusji mikrobiologów i lekarzy przez wiele ostatnich lat. Dziś wiadomo, że terapia empiryczna powinna być wdrożona na podstawie klinicznej oceny przebiegu zakażenia oraz wzoru oporności na leki przeciwbakteryjne w szpitalu i oddziale.

3. Monitorując lekowrażliwość bakterii beztlenowych możemy śledzić zmiany w ich profilu oporności na antybiotyki, co ma znaczenie praktyczne w leczeniu empirycznym. Od 2008 r biorę udział w badaniu lekowrażliwości bakterii bezwzględnie beztlenowych izolowanych z zakażeń od pacjentów hospitalizowanych. Zaobserwowaliśmy sukcesywny wzrost oporności bakterii z rodzajów *Bacteroides* i *Parabacteroides* na klindamycynę, toteż stosowanie tego antybiotyku w leczeniu empirycznym (szczególnie zakażeń w obrębie jamy brzusznej lub na oddziałach urazowo-ortopedycznych) może prowadzić do braku sukcesu terapeutycznego. Wykazaliśmy, że odsetek szczepów opornych izolowanych od chorych wynosił około 30%. Podobna tendencja występuje w innych krajach europejskich, gdzie oporność na klindamycynę jest wysoka i dotyczy od 28,5% do 60% izolatów bakterii beztlenowych w zależności od gatunku. Oporność na klindamycynę wśród szczepów *Bacteroides* i *Parabacteroides* związana jest głównie z produkcją metylazy rybosomalnej, kodowanej przez geny *erm*. U badanych szczepów najczęściej wykrywaliśmy *ermF*.

Wyniki tych obserwacji zostały opublikowane w 12 publikacjach (w tym list do redakcji i opis przypadku). Sumaryczny IF tych prac wynosi 10,71.

Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań komunikowane były także na 9 zjazdach krajowych i 12 międzynarodowych jako wystąpienia ustne lub w sesjach plakatowych.

Prace poglądowe

Jestem współautorką 28 prac poglądowych (sumaryczny IF 11,042), o następującej tematyce:

1. Zakażenia miejscowe, narządowe oraz wertykalne wywołane przez ludzkie alfaherpeswirusy oraz zakażenia z udziałem wirusa B19. Diagnostyka laboratoryjna i obraz kliniczny tych zakażeń.
2. Leki stosowane w terapii chorób wirusowych: struktura, mechanizm działania i problem lekooporności.

3. Immunoprofilaktyka zakażeń - w zakresie zdefiniowania przyczyn rezygnacji ze szczepień ochronnych oraz problemów w realizacji programu eliminacji i eradykacji odry, różyczki oraz zespołu różyczki wrodzonej w Regionie Europejskim WHO.

4. Zakażenia wywołane przez bakterie bezwzględnie beztlenowe u ludzi ze wskazaniem na problemy w diagnostyce mikrobiologicznej tych zakażeń oraz lekowrażliwość.

Podręczniki i skrypty

Jestem współautorką trzech rozdziałów w podręczniku: *Choroby wirusowe w praktyce klinicznej*, pod redakcją: Marta Wróblewska, Tomasz Dzieciatkowski. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2017. ISBN: 978-83-200-5419-4:

1. Anna Majewska, Sławomir Majewski: Zakażenia skóry, str. 113-135.
2. Sławomir Majewski, Anna Majewska: Zakażenia układu moczowo-płciowego, str.150-167.
3. Maria Katarzyna Baszewska-Kornacka, Anna Majewska: Zakażenia okołoporodowe, str. 168-194.

Jestem współautorką trzech rozdziałów, a także brałam udział w redakcji opracowania: *Zeszyt do ćwiczeń z mikrobiologii dla studentów Wydziału Nauki o Zdrowiu kierunków: Pielęgniarstwo i Położnictwo* pod redakcją: Grażyna Młynarczyk, Beata Sokół-Leszczyńska, Anna Majewska. Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej WUM, wydanie I (2011), wydanie I (poprawione) 2013.

Jestem współautorką rozdziału w opracowaniu *Zeszyt do ćwiczeń z mikrobiologii dla studentów kierunku Położnictwo Wydziału Nauki o Zdrowiu* pod redakcją: Grażyna Młynarczyk, Beata Sokół-Leszczyńska, Irina Niecwietajewa. Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej WUM, wydanie I (2018).

Recenzje

Od 2016 r. jestem stałym recenzentem w czasopiśmie *Forum Zakażeń*, a od maja 2018 r. w czasopiśmie Polskiego Towarzystwa Zakażeń Szpitalnych *Zakażenia XXI w.*

Ponadto, recenzowałam prace w czasopismach:

- *Journal of Global Antimicrobial Resistance*
- *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*
- *Journal of Obstetrics and Gynaecology*

- *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*
- *Archives of Community Medicine and Public Health*
- *Journal of Veterinary Research*
- *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*

Recenzowałam abstrakty zgłoszone na:

- 11th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists. Warszawa, 2015 w sesji Basic & Preclinical Science.
- 13th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists. Warszawa, 2017 w sesji Infectious Diseases
- 14th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists. Warszawa, 2018 w sesji Infectious Diseases

Udział w projektach badawczych

Kierownik projektu

1. Projekt badawczy 1M20/UKI/311, *Badanie wpływu pranobeksu inozyny oraz interferonu-α na wirusy chorobotwórcze dla człowieka* (2013–2014, zakończony).
2. Projekt badawczy 1M20/UKI/302, *Porównanie in vitro przeciwbakteryjnego wpływu produktów leczniczych Nifuroksazyd (Gedeon Richter) i zawiesiny z produktem leczniczym Ercefuryl (Sanofi-Aventis)* (2013, zakończony).

Wykonawca projektu

1. Projekt badawczy MNiSW nr NN204 085638, *Nowe analogi alloferonu i Neb-kolostatyny jako potencjalne czynniki antywirusowe i cytostatyczne. Synteza i ocena aktywności biologicznej* (2010-2013, zakończony).

Kierownik projektu: dr hab. Mariola Kuczer, Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski.

2. Projekt badawczy 2237/W/WCh/09, *Projektowanie i synteza nowych analogów alloferonu jako potencjalnych czynników antywirusowych* (2009-2010, zakończony)

Kierownik projektu: dr hab. Mariola Kuczer, Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski.

3. Projekt badawczy 1M19/UK1/283, *Badanie przeciwwirusowego i immunostymulującego efektu pranobeksu inozyny* (2011 – 2012) – zakończony

Kierownik projektu: prof. dr hab. med. Witold Lasek, Zakład Immunologii, WUM.

4. Projekt badawczy 1M20/UK/369 *Ocena działania przeciwdrobnoustrojowego preparatu Thonsilan* (2017, zakończony)

Kierownik projektu: dr Marta Kierzkowska, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, WUM.

Współpraca z instytucjami, organizacjami i towarzystwami naukowymi

Jestem Członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów oraz Polskiego Towarzystwa Wakcynologii.

Podczas pracy naukowej oraz realizując projekty badawcze współpracowałam z badaczami z Klinik i Zakładów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Wydziału Chemii, Uniwersytetu Wrocławskiego.

Podsumowanie aktywności naukowej

Sumaryczny IF	33,802
IF prac jako pierwszy/korespondencyjny autor	20,995
Liczba punktów MNiSW	649
Liczba prac	65
Liczba prac oryginalnych, pełnotekstowych	32
Index Hirscha wg. bazy Web of Science	6
Liczba cytowań wg. bazy Web of Science (bez autocytowań)	40

6. Osiągnięcia dydaktyczne, popularyzujące naukę i organizacyjne

Pracując w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego prowadzę zajęcia dydaktyczne; wykłady, seminaria oraz ćwiczenia z *mikrobiologii* dla studentów III roku Wydziałów Lekarskich oraz dla studentów Wydziału Nauki o Zdrowiu kierunku dietetyka (*mikrobiologia ogólna i żywności*) i położnictwo (*mikrobiologia i parazytologia*).

Od 2013 roku jestem koordynatorem zajęć dydaktycznych z przedmiotu mikrobiologia dla studentów Wydziałów Lekarskich (III rok). Biorę również aktywny udział w posiedzeniach Rady Pedagogicznej I Wydziału Lekarskiego, WUM.

Prowadziłam zajęcia dydaktyczne dla studentów Wydziału Lekarsko-Dentystycznego, Wydziału Nauki o Zdrowiu (kierunek pielęgniarstwo, ratownictwo medyczne i zdrowie publiczne) także w języku angielskim dla obcokrajowców (mikrobiologia z wirusologią).

Zajmowałam się organizacją zajęć fakultatywnych w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej dla studentów Wydziałów Lekarskich (1. Mikrobiologia kliniczna, 2. Racjonalna antybiotykoterapia w praktyce lekarza, 3. Drobnoustroje wokół nas) oraz prowadziłam seminaria na tych zajęciach.

Prowadziłam także zajęcia laboratoryjne w ramach fakultetu *Diagnostyka mikrobiologiczna* dla studentów IV roku Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej (kierunek: Analityka medyczna) oraz seminarium w ramach Comprehensive Basic Science Review (CBS) dla studentów anglojęzycznych.

Byłam koordynatorem zajęć dla studentów Wydziału Nauki o Zdrowiu kierunku ratownictwo (2012-2013), położnictwo (2010-2013).

Brałam czynny udział w przygotowaniu i prowadzeniu zajęć w ramach obowiązkowych kursów do specjalizacji z mikrobiologii (dla osób ubiegających się o tytuł specjalisty w dziedzinach mających zastosowanie z ochronie zdrowia). Prowadziłam również wykłady w ramach specjalizacji z mikrobiologii medycznej dla diagnostów laboratoryjnych.

Byłam promotorem pomocniczym pracy doktorskiej dotyczącej analizy fenotypowej i molekularnej szczepów klinicznych *Bacteroides* spp. i *Parabacteroides* spp. (obrona pracy 2017 r.) oraz promotorem 4 prac magisterskich. Dwie z nich dotyczyły laboratoryjnego rozpoznawania zakażeń ludzkimi herpeswirusami typu 1 i 2 i realizowane były przez studentów Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego (obrona 2010 i 2012 r.). Kolejne dwie prace, zostały przygotowane przez studentów Wydziału Nauki o Zdrowiu, kierunku Zdrowie publiczne, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego i dotyczyły oceny stanu wiedzy i świadomości turystów na temat zagrożeń mikrobiologicznych występujących w krajach strefy tropikalnej i subtropikalnej (obrona pracy 2016 r.) oraz postępów i problemów w realizacji globalnych programów eliminacji i eradykacji chorób zakaźnych (obrona pracy 2016 r.).

Byłam również promotorem 4 prac licencjackich przygotowanych przez studentów kierunku Zdrowie Publiczne, WNoZ WUM oraz recenzentem 3 prac magisterskich.

Brałam udział w Piątej edycji imprezy naukowo-edukacyjnej *Warszawski Uniwersytet Medyczny – Społeczeństwu Warszawy*.

Warszawa, dn. 1.06.2018r

...*Anna Mojca*.....