

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania
w Języku Angielskim
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej



Maciej Karasiński

Możliwości wykorzystania ceragenin CSA-13, CSA-44
i CSA-131 w leczeniu zakażeń o etiologii
Acinetobacter baumannii

Praca na stopień doktora nauk medycznych

wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Roberta Buckiego

oraz

Dr n. med. Urszuli Wnorowskiej

Białystok 2024

Podziękowania

Z całego serca pragnę podziękować mojemu promotorowi, Prof. dr hab. Robertowi Buckiemu, za nieocenioną pomoc, wsparcie w trakcie całego procesu badawczego, zaangażowanie, profesjonalizm i cenne rady, które były fundamentem mojej pracy. Jestem również wdzięczny za cierpliwość i wyrozumiałość, które były dla mnie ogromnym wsparciem.

Szczególne podziękowania kieruję do mojej promotorki pomocniczej, Dr n. med. Urszuli Wnorowskiej, za jej nieocenioną pomoc merytoryczną oraz cenne wskazówki, które przyczyniły się do doskonalenia mojej pracy naukowej.

Chciałbym również podziękować współpracownikom naukowym za ich wkład w badania, inspirację oraz cenne dyskusje, które znacząco wzbogaciły tę pracę.

Dziękuję mojej rodzinie, w szczególności moim rodzicom, Grażynie i Andrzejowi, za ich nieustające wsparcie, miłość i cierpliwość. Wasza obecność i wiara we mnie były dla mnie ogromnym źródłem siły i motywacji.

Dziękuję wszystkim osobom, które wspierały mnie w trakcie pracy nad rozprawą. Wasza pomoc, życzliwość i dobra energia były dla mnie nieocenione i pomogły mi w osiągnięciu tego celu.

Spis treści

I.	Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską.....	5
II.	Zestawienie publikacji Doktoranta.....	6
III.	Wykaz stosowanych skrótów	7
IV.	Wstęp.....	10
	4.1. Znaczenie kliniczne bakterii z rodzaju <i>Acinetobacter</i> oraz gatunku <i>Acinetobacter baumannii</i>	10
	4.2. Zakażenia wywołane przez <i>Acinetobacter baumannii</i> jako globalny problem współczesnej medycyny.....	13
	4.3. Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe i ich wykorzystanie w rozwoju nowych leków przeciwbakteryjnych i immunomodulujących.....	14
	4.4. Cerageniny jako potencjalne czynniki terapeutyczne w zwalczaniu szczepów bakterii wielolekoopornych	16
V.	Omówienie prac składających się na pracę doktorską	20
	5.1. Cel pracy	20
	5.2. Materiały i metody	21
	5.2.1. Materiały badawcze.....	21
	5.2.2. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej badanych ceragenin oraz konwencjonalnych leków przeciwbakteryjnych.....	21
	5.2.3. Ocena zdolności ceragenin do hamowania tworzenia biofilmu <i>A. baumannii</i>	22
	5.2.4. Ocena zdolności ceragenin do zwalczania biofilmu <i>A. baumannii</i> na rurkach intubacyjnych	22
	5.2.5. Badania komórek <i>A. baumannii</i> poddanych działaniu ceragenin z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych	23
	5.2.6. Ocena cytotoksyczności ceragenin wobec komórek nabłonkowych raka płuc linii A549 przy użyciu testu MTT	23
	5.2.7. Ocena adhezji szczepów <i>A. baumannii</i> do komórek nabłonkowych raka płuc linii A549	24
	5.2.8. Analiza statystyczna	24

5.3. Wyniki	25
5.3.1. Porównanie aktywności przeciwbakteryjnej badanych ceragenin do konwencjonalnych leków przeciwbakteryjnych stosowanych w leczeniu zakażeń o etiologii <i>A. baumannii</i>	25
5.3.2. Hamowanie tworzenia biofilmu przez <i>A. baumannii</i> w obecności ceragenin i konwencjonalnych leków przeciwbakteryjnych	26
5.3.3. Potencjał eradykacyjny ceragenin przeciwko <i>A. baumannii</i> tworzącym biofilm na powierzchni rurek intubacyjnych	27
5.3.4. Zmiany morfologii komórek <i>A. baumannii</i> poddanych działaniu ceragenin zaobserwowane z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych	27
5.3.5. Cytotoksyczność ceragenin wobec komórek nabłonkowych linii A549 w stężeniach bakteriobójczych	28
5.3.6. Właściwości antyadhezyjne CSA-13	28
VI. Dyskusja	29
VII. Wnioski	34
VIII. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	35
8.1. Praca oryginalna	35
8.2. Praca przeglądowa	52
IX. Streszczenie w języku polskim	72
X. Streszczenie w języku angielskim	73
XI. Piśmiennictwo	74
XII. Spis rycin	86
XIII. Dorobek naukowy	87
13.1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską	87
13.2. Wykaz innych publikacji naukowych	87
XIV. Oświadczenia Współautorów	89
14.1. Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu (praca oryginalna)	89
14.2. Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu (praca przeglądowa)	103
XV. Zgoda Komisji Bioetycznej	114

I. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Praca oryginalna:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Piktel Ewelina, Bucki Robert: *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. International Journal of Molecular Sciences 2024, 25, 7036. <https://doi.org/10.3390/ijms25137036>

IF = 4.9, MNiSW = 140.00, data opublikowania: 27.06.2024

Praca przeglądowa:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Durnaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Piktel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert: *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. Pathogens 2023, 12, 1346. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111346>

IF = 3.3, MNiSW = 100.00, data opublikowania: 13.11.2024

II. ZESTAWIENIE PUBLIKACJI DOKTORANTA

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Publikacje włączone do rozprawy doktorskiej	2	8.2	240.00
Publikacje, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	5	11.3	340.00
Streszczenia zjazdowe	-	-	-
Razem	7	19.5	580.00

III. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AACs – ang. aminoglycoside acetyltransferases
- ABC – ang. ATP binding cassette
- ACB – kompleks *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*
- AFM – mikroskop sił atomowych (ang. atomic force microscope)
- AHL – laktony acylo-homoserynowe (ang. acyl-homoserine lactones)
- AMP – peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. antimicrobial peptides)
- AmpC – ang. chromosomal Ambler class C β -lactamase
- ANTs – ang. aminoglycoside nucleotidyltransferases
- APHs – ang. aminoglycoside phosphotransferases
- ATCC – ang. American Type Culture Collection
- BMP – białko morfogenetyczne kości (ang. bone morphogenetic protein)
- CarO – białko błony zewnętrznej związane z opornością na karbapenemy (ang. carbapenem resistance-associated outer membrane protein)
- CFU – jednostka tworząca kolonię (ang. colony forming unit)
- CRAB – oporny na karbapenemy *Acinetobacter baumannii* (ang. carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*)
- CSA – cerageniny (ang. ceragenins, cationic steroid antibiotics)
- CTX-M – ang. cefotaximase
- EGF – epidermalny czynnik wzrostu (ang. epidermal growth factor)
- ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.
- FBS – płodowa surowica bydłęca (ang. fetal bovine serum)
- FPRL1 – receptor peptydu formylowego 1 (ang. formyl peptide receptor 1)
- GES – ang. Guiana extended-spectrum β -lactamase
- HAP – szpitalne zapalenie płuc (ang. hospital-acquired pneumonia)
- HMP – ang. heat-modifiable protein
- IL-8 – interleukina- 8 (ang. interleukin 8)
- IMP – imipenemaza (ang. imipenemase)
- KPC – ang. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
- LPS – lipopolisacharyd (ang. lipopolysaccharide)

MALDI-TOF MS – spektrometria masowa z desorpcją/ionizacją laserem wspomagana matrycą (ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry)

MATE – ang. multidrug and toxic compounds extrusion

MBC – najmniejsze stężenie bakteriobójcze (ang. minimum bactericidal concentration)

MFS – ang. major facilitators superfamily

MH – agar Muellera-Hintona

MIC – najmniejsze stężenie hamujące (ang. minimum inhibitory concentration)

MTT – bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazoly-2-ylo)-2,5-difenylotetrazolu (ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

NDM – ang. New Delhi metallo β -lactamase

Omp – białko błony zewnętrznej (ang. outer membrane protein)

OMV – pęcherzyki błony zewnętrznej (ang. outer membrane vesicles)

OprD – ang. outer membrane porin protein

OXA – oksacylinaza (ang. oxacillinase)

P2Y6, P2X7 – receptory purynergiczne typu P2Y6, P2X7 (ang. purinergic receptors subtype P2Y6, P2X7)

PBP – białko wiążące penicylinę (ang. penicillin-binding protein)

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. phosphate buffered saline)

PER – ang. *Pseudomonas*-extended-resistant

PLC – fosfolipaza C (ang. phospholipase C)

PLD – fosfolipaza D (ang. phospholipase D)

QI – obrazowanie trybowo-ilościowe za pomocą NanoWizard (ang. mode-quantitative imaging with the NanoWizard)

QS – zjawisko komunikacji bakterii z pomocą cząstek sygnałowych (ang. quorum sensing)

RND – ang. resistance-nodulation-cell division

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)

SHV – ang. sulfhydryl variable

SIM – ang. Seoul imipenemase

SMR – ang. small-multidrug resistance

TEM – ang. Temoniera β -lactamase

TNF-alfa – czynnik martwicy nowotworów (ang. Tumour Necrosis Factor alpha)

- VAP – zapalenie płuc związane z mechaniczną wentylacją płuc (ang. ventilator-associated pneumonia)
- VEB – ang. Vietnamese extended-spectrum β -lactamase
- VIM – ang. Verona integron–encoded metallo β -lactamase
- WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

IV. WSTĘP

4.1. Znaczenie kliniczne bakterii z rodzaju *Acinetobacter* oraz gatunku *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) należy do rodziny *Moraxellaceae* i rodzaju *Acinetobacter*. Kształt jego komórek zbliżony jest do formy przejściowej między kulistym ziarenkowem (*coccus*) a wydłużoną pałeczką (*bacillus*), określaną *coccobacillus* [1]. Gdy bakteria ta jest hodowana w temperaturze 37°C, tworzy na podłożu stałym śluzowate, gładkie, szaro-białe kolonie [1]. Klinicznie istotne *Acinetobacter* spp., które najczęściej wywołują infekcje w środowisku szpitalnym, należą głównie do kompleksu *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* (ACB), obejmującego takie gatunki jak: *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, a także nowo zidentyfikowane *A. seifertii* i *A. dijkschoorniae* [2]. W ciągu ostatniej dekady rozwój metod molekularnych znacznie poprawił identyfikację szczepów *Acinetobacter*. Wśród dostępnych metod, spektrometria masowa z desorpcją/ionizacją laserem wspomaganą matrycą (MALDI-TOF MS) okazała się najbardziej pomocna [3].

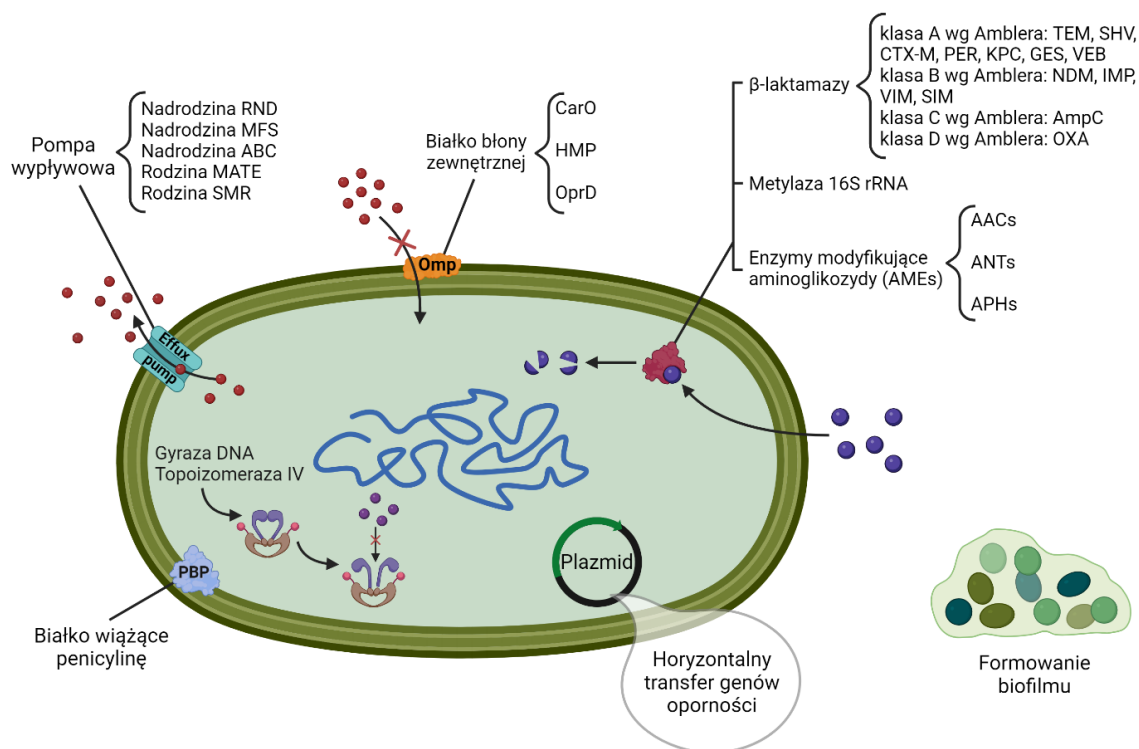
Ta Gram-ujemna, katalazo-dodatnia, oksydazo-ujemna, bezwzględnie tlenowa, niefermentująca bakteria jest szeroko rozpowszechniona w różnych środowiskach. Bakterie z rodzaju *Acinetobacter* występują w wodzie, glebie, żywności, ściekach, bytują również u zwierząt (koty domowe, psy) i u ludzi. U osób zdrowych bakterie te mogą kolonizować skórę, spojówkę oka, błonę śluzową jamy ustnej, przewodu pokarmowego i narządów moczowo-płciowych [4]. Tak szerokie rozpowszechnienie oraz narastająca oporność *A. baumannii* na antybiotyki, stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi [1]. W medycynie, największe znaczenie ma występowanie *A. baumannii* w środowisku szpitalnym. Ten oportunistyczny drobnoustrój może być izolowany ze sprzętu medycznego wielokrotnego użytku (np. urządzenia do monitorowania ciśnienia, stetoskopy, laryngoskopy, nawilżacze), z bielizny szpitalnej, ze zlewów, klamek do drzwi, a nawet rękawiczek i fartuchów personelu szpitalnego [5]. *Acinetobacter baumannii* może zarówno kolonizować pacjentów, jak również być przyczyną trudnych w leczeniu zakażeń przebiegających z wysoką śmiertelnością. Wewnątrzszpitalna transmisja *A. baumannii*, tak jak w przypadku wielu innych drobnoustrojów powodujących zakażenia szpitalne, następuje najczęściej przez ręce personelu medycznego (spowodowana nieprzestrzeganiem procedury higieny rąk) lub przez kontakt pacjentów z zanieczyszczonymi powierzchniami w środowisku szpitalnym [6]. Warto zauważyć, że niektóre badania sugerują możliwość

transmisji *A. baumannii* także drogą kropelkową [7, 8]. Czynniki ryzyka zakażenia *A. baumannii* obejmują: hospitalizację na oddziałach intensywnej terapii, oddziałach leczenia oparzeń, neonatologii, a także przerwanie ciągłości powierzchni skóry/błon śluzowych, immunosupresję, obecność cewników wewnątrznaczyniowych, stosowanie inwazyjnych procedur medycznych, zaawansowany wiek pacjenta, obniżenie odporności związanej np. z terapią nowotworów złośliwych, stosowanie wentylacji mechanicznej, wcześniejszą kolonizację tym drobnoustrojem, przedłużony pobyt w szpitalu, oraz ciężki stan ogólny pacjenta [9].

Badania materiału genetycznego i analiza ekspresji genów *A. baumannii* pozwoliły stwierdzić, że bakteria ta zawiera 16 wysp genowych kodujących różnorodne czynniki zjadliwości [4], pośród których liczne najprawdopodobniej pozostają nadal nieznanne. Jednym z ważniejszych czynników zjadliwości tej bakterii jest zdolność do tworzenia biofilmu. Do innych istotnych czynników zjadliwości należą: białka błony zewnętrznej OmpA, Omp 33-36, Omp 22, uczestniczące w inwazji komórek gospodarza i indukcji procesu apoptozy [10, 11]; lipopolisacharyd (LPS) stymulujący odpowiedź immunologiczną w komórkach gospodarza; system pozyskiwania żelaza, magnezu i cynku, który w wyniku konkurencji o mikroelementy prowadzi do śmierci komórek gospodarza; fosfolipazy C i D (PLC i PLD) uczestniczące w procesie inwazji; pile typu IV uczestniczące w procesie rozpoznawania właściwości reologicznych środowiska zewnętrznego i procesie tworzenia biofilmu, a także układ wydzielniczy typu II, V i VI uczestniczący w regulacji procesu adherencji do komórek gospodarza i procesie tworzenia biofilmu [12].

A. baumannii cechuje się dużą opornością na środki dezynfekcyjne oraz opornością na wysuszenie, przez co może przetrwać nawet kilka miesięcy na powierzchniach urządzeń medycznych, klamkach, materacach, w łazienkach czy na dozownikach mydeł/płynów dezynfekcyjnych [13-15]. Naturalnie występujące w materiale genetycznym *A. baumannii* geny kodujące β -laktamazy AmpC oraz OXA-51 warunkują oporność na niektóre antybiotyki β -laktamowe, a zdolność do nabywania kolejnych mechanizmów oporności powoduje, że *Acinetobacter baumannii* jest jednym z najbardziej opornych drobnoustrojów wywołujących zakażenia u człowieka [1, 13]. Bakterie te zdolne są do horyzontalnego transferu genów oporności w obrębie własnego gatunku, a także do pozyskiwania genów oporności od innych bakterii. Transfer może odbywać się przez koniugację, transformację, transdukcję lub za pośrednictwem pęcherzyków błony zewnętrznej (OMV) [16, 17]. Wielolekooporne szczepy *Acinetobacter baumannii* dysponują szerokim arsenałem różnorodnych mechanizmów oporności na różne grupy antybiotyków. Najważniejsze z nich

to: wytwarzanie enzymów rozkładających/modyfikujących antybiotyki, obniżenie przepuszczalności błony zewnętrznej, zwiększona ekspresja pomp usuwających antybiotyki z komórki, modyfikacja miejsca docelowego działania antybiotyku [8]. Przykładowo, oporność *A. baumannii* na fluorochinolony może być spowodowana mutacją w genach *gyrA* i *parC*, które kodują odpowiednio gyrazę DNA i topoiizomerazę IV [18], oporność na aminoglikozydy może wynikać z enzymatycznej modyfikacji antybiotyku i/lub metylacji 16S rRNA, a w przypadku karbapenemów istotne znaczenie mają karbapenemazy, z których najczęściej występują enzymy zwane oksacylinazami (OXA), zaliczane do klasy D β -laktamaz [4]. Z klinicznego punktu widzenia szczególnie niepokojąca jest narastająca oporność na karbapenemy, które do pewnego czasu były skutecznymi lekami, często wykorzystywanymi w leczeniu zakażeń wywołanych przez *A. baumannii* [19]. Mechanizmy oporności u *Acinetobacter baumannii* przedstawia Rycina 1.



Rycina 1. Główne mechanizmy oporności *A. baumannii*. Zaadaptowano na podstawie publikacji [4].

Aktualnie jako leczenie pierwszego wyboru w przypadku zakażeń wywołanych przez *Acinetobacter baumannii* zaleca się zastosowanie leczenia skojarzonego, najlepiej z udziałem preparatów zawierających sulbaktam [20]. Należy jednak zaznaczyć, że szczepy wielolekooporne *A. baumannii* często wykazują wrażliwość jedynie na kolistynę. Kolistyna jest antybiotykiem bakteriobójczym składającym się z 10 aminokwasów (sekwencja: KTKKKLLKKT; MW = 1145) i cząsteczki kwasu tłuszczowego (kwas 6-metylooktanowy). Sześć aminokwasów składowych ma ładunek dodatni, a zawartość hydrofobowa wynosi 20% [21]. Mechanizm działania kolistyny polega na oddziaływaniu z błoną komórkową i błoną zewnętrzną bakterii. Kolistyna wiążąc się z lipidem A powoduje destabilizację i uszkodzenie błon komórkowych, co w efekcie prowadzi do śmierci komórki. Niestety coraz liczniejsze doniesienia informują o oporności *Acinetobacter baumannii* na kolistynę. Mechanizm oporności polega na modyfikacji lipidu A, która jest wynikiem mutacji punktowych w operonie *pmrAB* i genach *mcr* [19, 22, 23]. Przedstawione dane ukazują wyjątkowo niebezpieczną sytuację związaną z bardzo ograniczonymi możliwościami leczenia zakażeń wywoływanych przez *A. baumannii*.

4.2. Zakażenia wywołane przez *Acinetobacter baumannii* jako globalny problem współczesnej medycyny

A. baumannii należy do grupy bakterii określanej akronimem „ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.). Jest to grupa bakterii, która w skali globalnej lekooporności wywołuje zakażenia będące istotnym zagrożeniem dla życia i zdrowia, zwłaszcza u pacjentów hospitalizowanych z czynnikami ryzyka zakażeń [24]. Większość bakterii tej grupy to mikroflora fizjologiczna (*E. faecium*, *Enterobacter* spp.) lub bakterie ze środowiska zewnętrznego (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*) stanowiące bakterie oportunistyczne. Grupę „ESKAPE” wyróżniono ze względu na łatwość nabywania przez te bakterie genów oporności [13].

Oporny na karbapenemy *A. baumannii* (CRAB) powoduje ciężkie, często śmiertelne zakażenia szpitalne i z tego powodu jest klasyfikowany jako patogen krytyczny na liście patogenów priorytetowych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w zakresie badań i rozwoju nowych antybiotyków. Na liście opublikowanej w 2017 r. przez WHO znajduje się 56 bakterii, które ze względu na oporność na antybiotyki stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego [25]. Do zakażeń o etiologii *A. baumannii* dochodzi przede wszystkim u pacjentów hospitalizowanych w oddziałach intensywnej terapii i wiąże się

z wysoką śmiertelnością [13, 24, 26]. Stosowanie inwazyjnych procedur prowadzących do naruszalności ciągłości barier anatomicznych (np. cewnikowanie naczyń, stosowanie cewników urologicznych, respiratoroterapia) oraz szeroko stosowana antybiotykoterapia zaburzająca naturalną mikrobiotę gospodarza stanowią istotne czynniki ryzyka zakażeń wywołanych przez ten drobnoustroj [13]. Zakażenia obejmują najczęściej szpitalne zapalenie płuc (HAP), zapalenie płuc związane z wentylacją mechaniczną płuc (VAP), zakażenie łożyska naczyniowego, zakażenie ran chirurgicznych i oparzeniowych oraz układu moczowego [13, 27, 28]. Z przeprowadzonej metaanalizy wynika, że 80% szczepów *A. baumannii* odpowiedzialnych za HAP oraz VAP na całym świecie to szczepy charakteryzujące się wielolekoopornością, natomiast w Europie Zachodniej to aż 91% [29].

Szczepy *A. baumannii* dzięki obecności białek adhezyjnych mogą przylegać do komórek lub powierzchni abiotycznych i tworzyć biofilm [30]. Występowanie tych bakterii w postaci skupiska mikroorganizmów otoczonego macierzą zewnątrzkomórkową zapewnia znaczną oporność na antybiotyki. Komórki w strukturze biofilmu stają się od 10 do 1000 razy mniej wrażliwe na środki przeciwdrobnoustrojowe w porównaniu do tych samych bakterii występujących w formie planktonicznej [31, 32]. Wchodzące w skład błony zewnętrznej tych Gram-ujemnych bakterii lipopolisacharydy (LPS) indukują reakcję zapalną poprzez aktywację receptora TLR4, prowadząc do zwiększonego wytwarzania i wydzielania cytokin prozapalnych, takich jak: TNF- α i IL-8 [33, 34]. Ze względu na wielolekooporność *A. baumannii* walka z tym patogenem jest niezmiernie trudna, a ograniczona liczba efektywnie działających antybiotyków skłania do poszukiwania bardziej skutecznych alternatywnych metod leczenia [25].

4.3. Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe i ich wykorzystanie w rozwoju nowych leków przeciwbakteryjnych i immunomodulujących

Wielu badaczy podejmuje próby opracowania nowych leków przeciwdrobnoustrojowych i metod terapii zakażeń wywołanych przez szczepy bakterii opornych na obecnie stosowane leki przeciwdrobnoustrojowe. W ostatnim dwudziestolecu duże nadzieje wiąże się z opisaniem właściwości przeciwdrobnoustrojowych naturalnych peptydów (AMP) stanowiącymi element układu odpornościowego większości organizmów [35]. Organizmy żywe, funkcjonujące w łańcuchu pokarmowym są cały czas narażone na agresję ze strony innych form żywych. W procesie ewolucyjnego współistnienia było to z pewnością jedną z przyczyn rozwój układu odpornościowego. Już u najwcześniejszych form żywych w tym bakterii, owadów i roślin istotnym elementem

niespecyficznej obrony są wspomniane wyżej peptydy przeciwdrobnoustrojowe. U człowieka są one istotną grupą substancji funkcjonujących w pierwszej linii obrony, to jest na powierzchni skóry i błon śluzowych [36, 37].

Zakładając, iż peptydy przeciwdrobnoustrojowe są ewolucyjnie stare, interesujące jest pytanie dotyczące oporności bakterii na ich działanie lub braku możliwości drobnoustroju do wytworzenia mechanizmów umożliwiających taką oporność. Na bazie tych dwóch pytań w okresie ostatnich 20 lat przeprowadzono dużą ilość badań celem identyfikacji AMP u różnych gatunków roślin i zwierząt, a także poznania ich natury fizykochemicznej i mechanizmów działania [38]. Dziś wiemy, że większość AMP to krótkie, amfipatyczne łańcuchy peptydowe zawierające od 10 do 100 aminokwasów, posiadające dodatni ładunek umożliwiający elektrostatyczne oddziaływanie z negatywnie naładowaną powierzchnią bakterii, w wyniku którego dochodzi do połączenia cząsteczek peptydów z powierzchnią zewnętrzną bakterii a następnie wbudowania peptydu w struktury błony komórkowej. Spowodowane tą interakcją uszkodzenie błony plazmatycznej komórki bakterii skutkuje utratą funkcji błony powierzchniowej (utrata kontroli wymiany substancji pomiędzy cytoplazmą komórki a środowiskiem zewnętrznym) w wyniku czego dochodzi do śmierci komórki [39-41]. AMP uszkadzają błonę przez „zerwanie wiązań lipidowych”, podobnie jak to się dzieje pod wpływem detergentów. Dochodzi również do tworzenia miceli z fragmentów błony po zniszczeniu dwuwarstwy lipidowej [42].

Warto zaznaczyć, że poza bezpośrednim działaniem przeciwdrobnoustrojowym naturalne AMP wykazują również zdolność aktywacji różnorodnych receptorów błonowych (np. receptorów FPRL1, EGF, P2Y6, P2X7) i wielokierunkowe działanie immunomodulujące, przeciwnowotworowe i regeneracyjne [43-46]. Dlatego należy przypuszczać, że syntetyczne peptydy, jak i ich lipidowe mimetyki mogą stać się źródłem nowych leków, w których poszczególne wymienione powyżej efekty działania będą spotencjalizowane. Zakłada się również, że w procesie syntezy peptydów będzie można wyeliminować ich działanie hemolityczne, za które najprawdopodobniej odpowiadają odmienne sekwencje aminokwasowe [47].

AMP pomimo szerokiego spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego mają istotne ograniczenia wynikające z ich natury chemicznej. Jako peptydy są rozkładane przez proteazy, a ich produkcja jest stosunkowo droga [48]. Ze względu na te ograniczenia zaczęto poszukiwania alternatywnych rozwiązań, w wyniku których opracowano syntetyczne lipidowe analogi AMP. Kationowe lipidy, których przykładem są cerageniny (CSA), będące mimetykami AMP, które pod względem fizykochemicznym odzwierciedlają naturę,

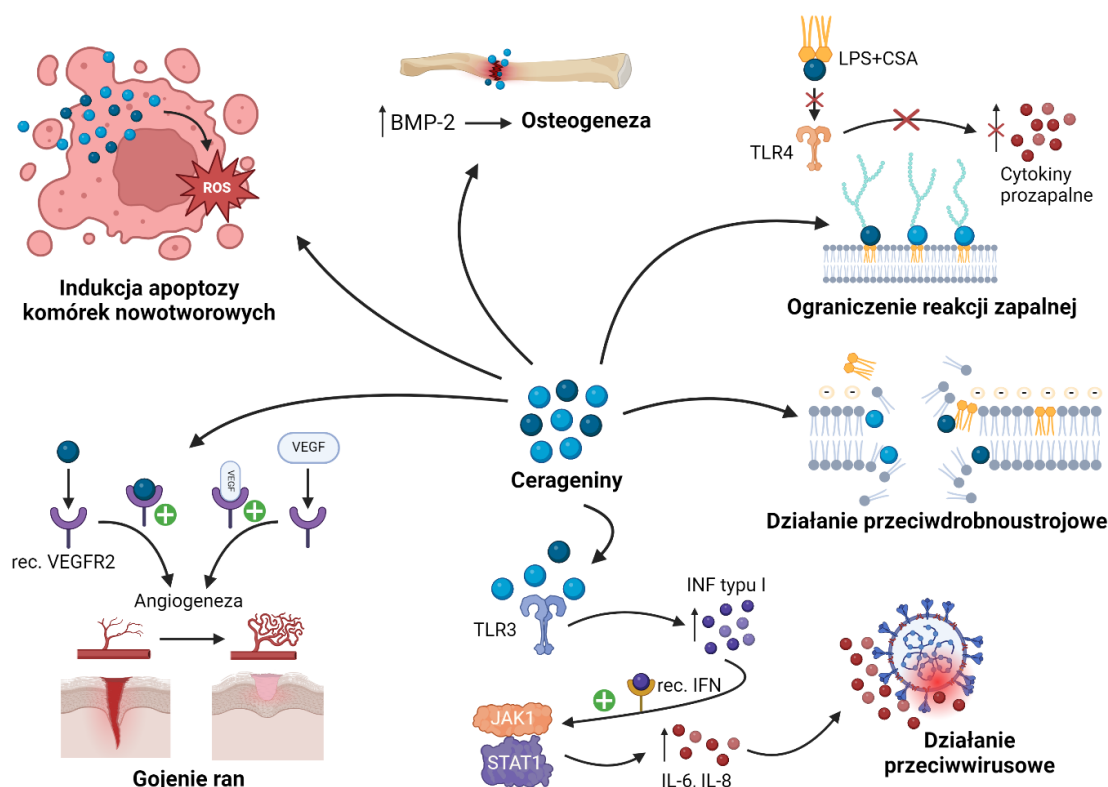
tj. są związkami amfipatycznymi, posiadającymi ładunek dodatni i mającymi zdolności insercji błonowej. Należy podkreślić, że cerageniny wykazują potencjał aplikacyjny jako antybiotyki drobnocząsteczkowe [49, 50].

4.4. Cerageniny jako potencjalne czynniki terapeutyczne w zwalczaniu szczepów bakterii wielolekoopornych

Struktura chemiczna ceragenin oparta jest na kwasie cholowym i zapewnia im stabilność w obecności proteaz [51]. Cerageniny oznaczone numerycznie od CSA-1 do CSA-50 należą do I generacji, natomiast pozostałe do II generacji [52]. W pierwszej generacji tych związków znajdują się substancje o większej aktywności w stosunku do ziarenkowców Gram-dodatnich, natomiast w drugiej te o większej aktywności w stosunku do pałeczek Gram-ujemnych; np. CSA-131 cechujący się dużą aktywnością w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa*. Różnice aktywności CSA wynikają w dużej części z obecności różnych podstawników acylowych przy atomach węgla i różnic w długości ich łańcuchów [53]. CSA-131, zawierający łańcuch lipidowy składający się z 12 atomów węgla, wykazuje najwyższą aktywność w stosunku do pałeczek Gram-ujemnych, CSA-13 i CSA-44 posiadające łańcuchy lipidowe składające się z 8 atomów węgla cechuje niższa w porównaniu do CSA-131 aktywność wobec pałeczek Gram-ujemnych [54-57]. Obecność różnych podstawników stanowi także o różnicy ilości ładunków dodatnich i ich dystrybucji (różna gęstość ładunku) w różnych cząsteczkach CSA. Warto wspomnieć, iż niedawno przeprowadzone badanie, w którym aktywność przeciwdrobnoustrojową CSA-13, CSA-142 i CSA-192 badano wobec 20 szczepów *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* wykazało, że CSA-13 ma najmniejsze wartości MIC. W analizie wyników przeprowadzonych badań autorzy podkreślili, że CSA-142 i CSA-192 wykazały również dobrą aktywność wobec badanych mikroorganizmów, a właściwości bakteriobójcze i grzybobójcze CSA-142 i CSA-192 pokazują, że mogą one być dobrą alternatywą dla CSA-13 [58].

Cerageniny jako związki naśladujące działanie AMP, wykazują szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego, przy niskim potencjale toksycznego wpływu na organizm gospodarza [48, 59, 60]. Niewielkie różnice pomiędzy MIC i MBC świadczą o działaniu bakteriobójczym ceragenin [61], a ich działanie przeciwdrobnoustrojowe jest znacznie silniejsze niż AMP [62]. Poza działaniem przeciwbakteryjnym cerageniny ograniczają odpowiedź zapalną przez sekwestracje endotoksyn (CSA hamują łączenie LPS z TLR4) [33], wykazują działanie przeciwnowotworowe [63], jak również działanie

przeciwwirusowe, przeciwpierwotniakowe [64, 65] i grzybobójcze [51, 64-66]. Te właściwości zapewniają również skuteczność wobec mikroflory mieszanej [60]. Można przypuszczać, iż szerokowachlarzowa aktywność CSA pozwoli na ich wykorzystanie w terapii empirycznej zakażeń. Cerageniny, nasilając angiogenezę wspomagają gojenie ran [67], a poprzez wzrost ekspresji BMP-2 stymulują osteogenezę (Rycina 2) [68].

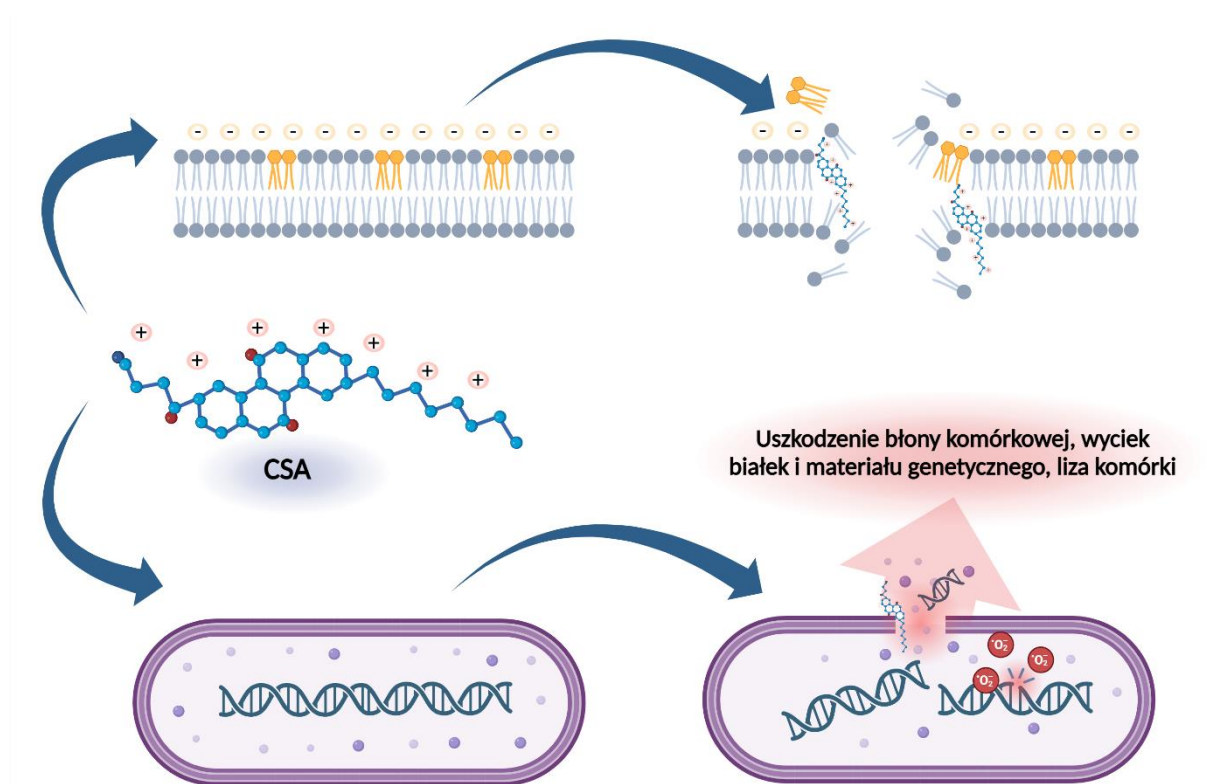


Rycina 2. Wielokierunkowe działanie ceragenin.

Ze względu na znacznie prostszą strukturę, koszty syntezy ceragenin są znacznie niższe od kosztów syntezy AMP, co stanowi istotną zaletę i daje potencjalnie możliwość szerokiego zastosowania tych związków [48].

Działanie ceragenin jest podobne do działania AMP [49]. Warto również zwrócić uwagę na analogię w mechanizmie działania CSA i kolistyny. Badania mikroskopowe potwierdzają zdolność CSA do interakcji z błonami plazmatycznymi, o czym świadczy obecność zniekształceń, mikropęknięć oraz zmian powierzchni komórek w obecności tych związków (Rycina 3) [55]. Poprzez zwiększenie przepuszczalności błony, cerageniny mogą uwrażliwić bakterie na hydrofobowe antybiotyki, które samodzielnie nie są w stanie skutecznie przeniknąć przez błonę [69]. Opisywane zastosowanie ceragenin z konwencjonalnymi antybiotykami wykazuje działanie synergistyczne lub addytywne [50,

56, 61, 70, 71]. Działanie synergistyczne opisano między innymi dla CSA-13 i kolistyny w stosunku do klinicznych szczepów *A. baumannii* opornych na karbapenemy [72]. Warto zauważyć, że w dotychczasowych badaniach nie wykazano efektu antagonistycznego [56, 59, 72]. Dodatkowo zaobserwowano zwiększoną ilość wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach będących pod wpływem działania ceragenin [73].



Rycina 3. Schemat przedstawiający działanie ceragenin.

Kolejną ważną cechą ceragenin jest ich aktywność w stosunku do biofilmu drobnoustrojów. Prace doświadczalne wskazują na potencjalną możliwość wykorzystania CSA zarówno w prewencji powstawania biofilmu na powierzchniach abiotycznych, jak i eradykacji już uformowanych biofilmów [48]. CSA wpływają na zwiększenie jego „płynności” oraz obniżenie lepkości [74]. Możliwym wydaje się zastosowanie na silikonowych wyrobach medycznych powłoki ceragenin, zapobiegającej przed lokalnym wzrostem flory bakteryjnej i grzybiczej [75].

Jedną z głównych zalet ceragenin jest jak dotąd niezobserwowane powstawanie oporności w warunkach *in vitro* [76, 77]. Obiecujące wyniki przedstawiają badania dotyczące braku nabywania oporności na cerageniny przez bakterie Gram-ujemne. Stanowi to ogromną przewagę nad antybiotykami stosowanymi konwencjonalnie [48]. Dzięki

naśladowaniu mechanizmu działania AMP, który skutecznie funkcjonuje od milionów lat toczącego się procesu ewolucji, istnieje nadzieja na opracowanie skutecznych leków o znikomym potencjale wytworzenia przez drobnoustroje oporności na te związki [78].

Aktywność ceragenin może być modulowana po ich przyłączeniu do powierzchni nanocząstek metali. Nanocząstki charakteryzuje rozmiar w przedziale 1-100 nm, w co najmniej jednym wymiarze [79]. Włączenie ceragenin do nanosystemów typu rdzeń-powłoka poprawia ich aktywność biologiczną; tj. ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe. Dodatkowo cerageniny jako składniki nanosystemów wykazują mniejszą toksyczność w stosunku do komórek gospodarza. [80, 81]. Nanosystemy mogą zostać wykorzystane w kontrolowanym systemie dostarczania leków. Nanostruktury mogą otaczać i dostarczać cerageniny do miejsc infekcji, zwiększając w ten sposób ich lokalne stężenie i skuteczność [82, 83]. Włączenie ceragenin do nanosystemów zawierających magnetyczne nanocząsteczki tlenku żelaza ogranicza ich toksyczność, redukując hemolizę oraz zwiększa właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Ze względu na mechanizm oddziaływania z błonami plazmatycznymi, zastosowanie ceragenin w wysokim stężeniu powoduje uszkodzenie krwinek czerwonych. Zastosowanie nanocząsteczek tlenku żelaza znacząco redukuje hemolizę mimo stosowania wysokich stężeń ceragenin [84]. Sprzężenie ceragenin z nanocząstkami złota zwiększa aktywność przeciwdrobnoustrojową w porównaniu z ich działaniem bez połączenia z nanocząstkami złota, wykazując przy tym minimalny efekt hemolityczny [85]. Nanocząstki złota charakteryzują się wysoką penetracją do komórek, zdolnością generowania ROS, dobrą biokompatybilnością oraz niską toksycznością [86-88]. Warto zaznaczyć, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa nanocząstek złota jest zależna od ich kształtu [89].

Można przypuszczać, że kontynuacja badań aktywności biologicznej ceragenin i nanosystemów zawierających te pochodne kwasu cholowego stanie się źródłem nowych leków przeciwdrobnoustrojowych znajdujących praktyczne zastosowanie w leczeniu zakażeń. Warto dodać, że dotychczas cerageniny zostały dopuszczone do użycia jako substancje do powlekania rurek intubacyjnych i są to produkty dostępne na rynku w Kanadzie i kilku krajach Ameryki Łacińskiej. Trwają też badania kliniczne celem potwierdzenia korzyści z ich stosowania [90].

V. OMÓWIENIE PRAC SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA PRACĘ DOKTORSKĄ

5.1. Cel pracy

Narastająca oporność na antybiotyki prowadzi do ograniczenia możliwości skutecznego leczenia zakażeń, zwłaszcza u pacjentów hospitalizowanych. Konieczne staje się poszukiwanie nowych metod zwalczania zakażeń wywoływanych przez bakterie lekooporne.

Głównym celem pracy była ocena działania przeciwbakteryjnego ceragenin, jako potencjalnych substancji do opracowania nowych metod leczenia zakażeń o etiologii *Acinetobacter baumannii*. Badania przeprowadzono w głównej mierze na wyizolowanych szczepach z materiału diagnostycznego pobranego od pacjentów.

Cele szczegółowe niniejszej pracy były następujące:

1. Ocena aktywności ceragenin CSA-13, CSA-44 i CSA-131 wobec laboratoryjnych i klinicznych szczepów *A. baumannii* izolowanych od pacjentów oddziałów intensywnej terapii.
2. Porównanie aktywności bakteriobójczej CSA-13, CSA-44 i CSA-131 z obecnie stosowanymi lekami przeciwdrobnoustrojowymi (ciprofloksacyna, kolistyna, meropenem) w terapii zakażeń o tej etiologii.
3. Ocena aktywności ceragenin CSA-13, CSA-44 i CSA-131 wobec biofilmu *A. baumannii* utworzonego na powierzchni silikonu oraz w zapobieganiu jego tworzenia.
4. Ocena wpływu ceragenin CSA-13 oraz CSA-131 na morfologię komórek *A. baumannii* z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych.
5. Ocena cytotoksyczności ceragenin wobec komórek nabłonkowych ludzkiego nowotworu płuc linii A549.
6. Ocena wpływu CSA-13 na adhezję *A. baumannii* do komórek nabłonkowych ludzkiego nowotworu płuc linii A549.

5.2. Materiały i metody

5.2.1. Materiały badawcze

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem szczepu laboratoryjnego (wzorcowego) pochodzącego z American Type Culture Collection (ATCC 19606, USA) oraz 65 (S01-S65) szczepów klinicznych wyizolowanych z popłuczyn oskrzelowych, płwociny, wymazu z gardła i wymazu z rany. Izolaty *A. baumannii* hodowano na płytkach agarowych i analizowano przy użyciu systemu VITEK®2 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francja). Szczepy oznaczone kolejno S01, S02, S04, S05, S06 i S08 zostały zidentyfikowane jako szczepy *A. baumannii* odporne na karbapenemy (CRAB). Dodatkowo w badaniach wykorzystano komórki nabłonkowe ludzkiego nowotworu płuc linii A549.

W trakcie realizacji badań wykorzystano cerageniny (CSA-13, CSA-44 oraz CSA-131) pozyskane w ramach współpracy z prof. Paulem B. Savagem z Brigham Young University (Provo, USA). Konwencjonalne leki przeciwdrobnoustrojowe, tj. kolistyna (#C4461), ciprofloksacyna (#17850) oraz meropenem (#PHR1772), uzyskano z Sigma Aldrich (USA). Wszystkie badane związki przygotowano w sterylnym roztworze soli fizjologicznej i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu przeprowadzenia eksperymentów. Sterylne rurki dotchawicze pochodziły od firmy Zarys (Polska).

Badania stanowiące przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej uzyskały pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (nr: APK.002.406.2023).

5.2.2. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej badanych ceragenin oraz konwencjonalnych leków przeciwbakteryjnych

Celem oceny właściwości przeciwbakteryjnych badanych związków, przeprowadzono pomiar najmniejszego stężenia hamującego (MIC, ang. minimum inhibitory concentration) oraz najmniejszego stężenia bakteriobójczego (MBC, ang. minimum bactericidal concentration) stosując metodę mikrorozcieńczeń w bulionie. Stężenia badanych związków wahały się od 0,125 do 256 µg/ml. MIC określono jako najniższe stężenie ceragenin lub leków przeciwbakteryjnych, które hamowało wzrost bakterii. MBC określono jako redukcję co najmniej 99,9% żywych komórek bakterii na agarze stałym. Celem dalszego określenia aktywności bakteriobójczej zastosowano test zliczania kolonii (ang. killing assay) wobec komórek *A. baumannii* opornych na karbapenemy (S02, S04, S06) oraz szczepu laboratoryjnego (ATCC19606). Podczas tego badania wykorzystano zawiesinę bakterii, do której dodano badane substancje w stężeniach

1-5 µg/ml. Po godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, zawiesiny rozcieńczano 10-1000-krotnie w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS), płytki umieszczano na lodzie, następnie pobierano po 10 µl zawiesiny i wysiewano na płytkach agarowych Muellera-Hintona (MH) celem określenia liczby uformowanych kolonii (CFU). Liczbę kolonii określono po całonocnej hodowli w porównaniu z kontrolą (0 µg/ml).

5.2.3. Ocena zdolności ceragenin do hamowania tworzenia biofilmu *A. baumannii*

Skuteczność ceragenin (CSA-13, CSA-44 i CSA-131) i konwencjonalnych leków przeciwbakteryjnych (kolistyny, ciprofloksacyny i meropenemu) w zapobieganiu tworzenia biofilmu badano inkubując odporne na karbapenemy szczepy *A. baumannii* (S02, S04, S06) w dawkach 1-50 µg/ml badanych związków przez 72 godziny w temperaturze 37°C. Po okresie inkubacji pożywka zawierająca bakterie planktoniczne została usunięta, a studzienki delikatnie przepłukano trzykrotnie PBS. W celu zabarwienia biofilmu (ocena względnej masy biofilmu) użyto resazuryne w końcowym stężeniu 200 µg/ml i pozostawiano do dalszej inkubacji na jedną godzinę. Aby ocenić żywotność komórek bakterii w obrębie biofilmów, zastosowano analizę fluorymetryczną ($\lambda_{ex/em} = 520/590$ nm).

5.2.4. Ocena zdolności ceragenin do zwalczania biofilmu *A. baumannii* na rurkach intubacyjnych

Sterylnie rurki intubacyjne pocięto na ~50 mm segmenty. Przygotowano zawiesinę bakterii zawierającą 10^6 CFU/ml *A. baumannii* (S02, S04, S06 oraz ATCC). Fragmenty rurek umieszczono we wcześniej przygotowanej zawieszynie, w objętości 1,5 ml, w studzienkach płytek do hodowli komórkowych. Następnie dodano CSA-13 i CSA-131 w dawkach od 0 do 20 µg/ml. Po 24 godzinach segmenty rurek intubacyjnych przeniesiono do studzienek zawierających PBS. Delikatnie przemyte sterylnym PBS fragmenty rurek intubacyjnych poddawano sonikacji przez 15 minut celem usunięcia bakterii przylegających do ich powierzchni. Kolonie bakteryjne zliczono po seryjnym rozcieńczeniu otrzymanych zawiesin i hodowli na agarze MH przez ~18 godzin w temperaturze 37°C.

5.2.5. Badania komórek *A. baumannii* poddanych działaniu ceragenin z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych

Do pomiarów wykorzystano szczep *A. baumannii* oporny na karbapenemy (S02). Zawiesinę *A. baumannii* ($OD_{600} \sim 0,1$) inkubowano z cerageninami CSA-13 i CSA-131 o stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$ i 10 $\mu\text{g/ml}$. Następnie 200 μl badanych próbek przenoszono na powierzchnię miki, uprzednio sfunkcjonalizowanej poli-L-lizyną; 100 μl 0,01% roztworu poli-L-lizyny (Sigma-Aldrich, #25988-63-0), inkubowano z pociętymi plastrami miki. Przyleganie komórek bakteryjnych do powierzchni miki osiągnięto podczas 30 minutowej inkubacji. Obrazy komórek bakteryjnych i charakterystykę ich właściwości mechanicznych wykonano z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych NanoWizard 4 BioScience (AFM-JPK/Bruker, MA, USA). Ze względu na siły boczne występujące podczas gromadzenia danych, które mogły powodować przemieszczanie się komórek po powierzchni, skanujący AFM działał w trybie QI (Bruker/JPK QI™ mode-Quantitative Imaging). Wsporniki AFM z azotku krzemu (Bruker, MSCT-A) miały nominalną stałą sprężystości 0,07 N/m i zmierzoną stałą sprężystości w zakresie 0,067–0,099 N/m, przy użyciu metody dostrajania termicznego. Komórki bakteryjne zostały zlokalizowane przy użyciu map $20 \times 20 \mu\text{m}$; następnie utworzono mapy topografii o rozmiarze $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$, z rozdzielczością 128 pikseli na linię, w warunkach wilgotnych. Mapy QI wykorzystano do określenia sztywności powierzchni bakterii (tryb JPK Slope) i sił adhezji między komórkami a sondą AFM (tryb JPK Adhesion). Sztywność komórek bakterii obliczono na podstawie krzywych siła-odkształcenie z map QI. Nachylenie krzywych siły zarejestrowano na mice, a powierzchnie bakterii dopasowano za pomocą regresji liniowej i wykorzystano jako parametr sztywności ($\text{nN}/\mu\text{m}$) odzwierciedlający sztywność bakterii.

5.2.6. Ocena cytotoksyczności ceragenin wobec komórek nabłonkowych raka płuc linii A549 przy użyciu testu MTT

Aby ocenić cytotoksyczne działanie badanych ceragenin (CSA-13, CSA-44 i CSA-131) przeprowadzono test MTT z wykorzystaniem komórek nabłonkowych ludzkiego nowotworu płuc linii A549. Komórki hodowano na płytkach 48-dółkowych dodając w czasie rozpoczęcia hodowli $15\text{-}20 \times 10^3$ komórek na studzienkę. Następnie komórki poddawano działaniu ceragenin w stężeniu od 1 do 50 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny. Po okresie inkubacji komórki delikatnie przemywano PBS celem usunięcia wszelkich pozostałości ceragenin. Po etapie płukania żywotność traktowanych cerageninami komórek oceniano za pomocą testu MTT. Do każdej studzienki dodano roztwór MTT o końcowym

stężeniu 0,5 mg/ml, a następnie płytki inkubowano przez dodatkowe 4 godziny w standardowych warunkach hodowli komórkowej. Po zakończeniu okresu inkubacji, kryształy formazanu utworzone przez metabolicznie aktywne komórki były rozpuszczane przy użyciu etanolu. Absorbancję rozpuszczonego formazanu oceniano przy długości fali 550 nm, przy użyciu czytnika mikroplętek Varioskan Lux. Uzyskane wartości absorbancji wykorzystano następnie do ilościowego określenia względnej żywotności komórek w porównaniu z komórkami hodowanymi bez dodatku ceragenin. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Następnie przeprowadzono analizę statystyczną w celu oceny istotności zaobserwowanych różnic między badanymi grupami.

5.2.7. Ocena adhezji szczepów *A. baumannii* do komórek nabłonkowych raka płuc linii A549

Celem oceny adhezji bakterii do komórek nabłonka płuc traktowanych CSA, komórki nabłonkowe ludzkiego nowotworu płuc linii A549 inkubowano z CSA-13 przez 1 godzinę w stężeniach od 0 do 10 $\mu\text{g/ml}$ a następnie dodawano bakterie *A. baumannii* – laboratoryjny szczep ATCC19606 oraz szczepy odporne na karbapenemy (S02, S04, S06) – w ilości 10^8 CFU/ml i kontynuowano inkubację przez dwie godziny w 37°C w 5% CO₂. Zakażone komórki nabłonkowe ludzkiego nowotworu płuc linii A549 poddano pięciokrotnemu płukaniu PBS, a do ich lizy użyto 0,5% Triton X-100. Liczbę bakterii, które przyłączyły się do powierzchni komórek nabłonkowych ludzkiego nowotworu płuc linii A549 zliczono po umieszczeniu rozcieńczonych lizatów na agarze z krwią (Blood-Agar Columbia, Becton Dickinson Microbiology Systems, East Rutherford, NJ, USA) i inkubacji w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

5.2.8. Analiza statystyczna

Zebrane dane i różnice określono za pomocą jednostronnego testu t-Studenta. Za wartość istotną statystycznie uznano $p < 0,05$. Wyniki stanowią średnią z trzech pomiarów.

5.3. Wyniki

5.3.1. Porównanie aktywności przeciwbakteryjnej badanych ceragenin do konwencjonalnych leków przeciwbakteryjnych stosowanych w leczeniu zakażeń o etiologii *A. baumannii*

Wartości MIC szczepu laboratoryjnego *A. baumannii* ATCC 199606 mieszczą się w zakresie od 0,5 do 1 µg/ml, a MBC wynosi 2 µg/ml dla konwencjonalnych leków przeciwbakteryjnych, co wskazuje na jego wrażliwość na ciprofloksacynę, meropenem i kolistynę. Podczas analizy wrażliwości na leki przeciwbakteryjne izolatów klinicznych zaobserwowano, że wartości MIC dla ciprofloksacyny w większości przypadków wahały się od 16 do 256 µg/ml, podczas gdy jeden szczep kliniczny miał wartość MIC wynoszącą 1 µg/ml. Zakres wartości MIC dla meropenemu wynosił 4-256 µg/ml. Większość bakterii miała wartości MBC wyższe niż 256 µg/ml. Zakres wartości MIC dla kolistyny wynosił od 0,5 do 64 µg/ml, przy czym wartości MBC dla większości szczepów mieściły się w przedziale od 1 do 16 µg/ml. Wskazuje to na niską wrażliwość na ciprofloksacynę oraz meropenem większości badanych szczepów. Kolistyna wykazuje dobrą skuteczność przeciwko badanym szczepom bakterii.

Wartości MIC testowanych ceragenin (CSA-13, CSA-44 i CSA-131) dla szczepów *A. baumannii* opornych na karbapenemy (S01, S02, S04, S05, S06 i S08) wynosiły 1-4 µg/ml dla CSA-13, 0,5-8 µg/ml dla CSA-44, i 1-4 µg/ml dla CSA-131. Szczegółowo, wartości MIC dla cerageniny CSA-13 zawierały się w zakresie stężeń od 1 do 8 µg/ml, przy czym większość szczepów wykazywała wartości MIC od 1 do 4 µg/ml. Wartości MBC dla cerageniny CSA-13 wahały się od 2 do 16 µg/ml, przy czym większość szczepów wykazywała wartości MBC od 2 do 8 µg/ml. Co ważne, spośród 66 testowanych izolatów tylko trzy szczepy wykazywały podwyższone wartości MIC i MBC wynoszące odpowiednio 8 µg/ml oraz 16 µg/ml, co sugeruje ich niższą wrażliwość na CSA-13. Podobnie zakres wartości MIC dla CSA-44 zawierał się w zakresie od 0,5 do 4 µg/ml oraz MBC od 1 do 8 µg/ml dla większości szczepów; tylko trzy szczepy wykazywały wyższe wartości MIC/MBC wynoszące 8-16 µg/ml. Analogicznie wartości MIC CSA-131 zawierała się w przedziale od 1 do 4 µg/ml, a wartości MBC pomiędzy 1 a 8 µg/ml dla przeważającej liczby szczepów, a maksymalne wyższe MIC/MBC wynoszące 8/16 µg/ml wykazały trzy szczepy. Potwierdza to wysoką wrażliwość większości badanych szczepów na badane cerageniny.

W teście zliczania kolonii dla szczepu laboratoryjnego efekt bakteriobójczy zaobserwowano przy zastosowaniu CSA-13, CSA-131 oraz kolistyny w stężeniu 0,5 µg/ml

oraz CSA-44, ciprofloksacyny i meropenemu w stężeniu 2 µg/ml. Dla użytych w teście zliczania kolonii szczepów *A. baumannii* opornych na karbapenemy (S02, S05, S06) efekt bakteriobójczy uzyskano przy zastosowaniu stężeń CSA-13 0,5-1 µg/ml, CSA-44 2-5 µg/ml, CSA-131 0,5-1 µg/ml oraz kolistyny 0,1-1 µg/ml, natomiast przy zastosowaniu ciprofloksacyny i meropenemu nie osiągnięto efektu bakteriobójczego przy najwyższym badanym stężeniu 5 µg/ml. W niniejszym badaniu najlepszym efektem bakteriobójczym cechują się CSA-13, CSA-131 oraz kolistyna, dobry efekt bakteriobójczy uzyskano przy użyciu cerageniny CSA-44, natomiast ciprofloksacyna i meropenem nie wykazały właściwości bakteriobójczych w stosunku do badanych szczepów.

5.3.2. Hamowanie tworzenia biofilmu przez *A. baumannii* w obecności ceragenin i konwencjonalnych leków przeciwbakteryjnych

CSA-13 w stężeniu 5 µg/ml skutecznie hamowała powstawanie biofilmu badanych szczepów *A. baumannii* opornych na karbapenemy. CSA-44 oraz CSA-141 skutecznie zahamowały tworzenie biofilmu przy stężeniu 20 µg/ml. Równie skuteczna okazała się kolistyna, która w zależności od szczepu wykazała efekt hamowania powstawania biofilmu przy stężeniach 0,5-5 µg/ml. Ciprofloksacyna hamowała tworzenie biofilmu szczepu laboratoryjnego przy stężeniu 2 µg/ml oraz szczepu S06 przy stężeniu 50 µg/ml, natomiast szczep S02 oraz S04 hamowała tylko częściowo. Ze względu na oporność badanych szczepów, meropenem nie zahamował tworzenia biofilmu szczepów S02, S04 oraz S06 w maksymalnym badanym stężeniu 50 µg/ml.

Wyniki naszych badań wskazują, że CSA-13 wykazuje najwyższy poziom aktywności przeciwbiofilmowej, zarówno przeciwko szczepowi laboratoryjnemu, jak i szczepom opornym na karbapenemy (S02, S04, S06). Co istotne, całkowity brak tworzenia biofilmu zaobserwowano przy stężeniu 5 µg/ml CSA-13 i 20 µg/ml CSA-44 oraz CSA-131. Wszystkie badane cerageniny wykazywały większą aktywność w zapobieganiu tworzeniu się biofilmu aniżeli ciprofloksacyna i meropenem, a tylko kolistyna miała porównywalne właściwości przeciwbiofilmowe do CSA-13. Wyniki wskazują, że CSA-13 ma obiecujące właściwości przeciwbiofilmowe i może być bardzo skutecznym elementem przyszłych terapii zakażeń CRAB. Ponadto duża skuteczność CSA-44 i CSA-131 w eliminowaniu biofilmów *A. baumannii* sugeruje, że związki te mogą być użytecznymi substytutami innych terapii.

5.3.3. Potencjał eradykacyjny ceragenin przeciwko *A. baumannii* tworzącym biofilm na powierzchni rurek intubacyjnych

Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami, *A. baumannii* tworzy biofilm na silikonowych powierzchniach rurek dotchawiczych. Zastosowanie ceragenin (CSA-13 i CSA-131) w takiej hodowli wykazało silną aktywność eradykacyjną biofilmu komórek *A. baumannii* opornych na karbapenemy. W stężeniu 10 µg/ml CSA-13 skutecznie wyeliminowała komórki bakteryjne w biofilmie na badanych segmentach rurek intubacyjnych. Ponadto zastosowanie 5 µg/ml CSA-13 doprowadziło do zmniejszenia masy biofilmu o około 80% w przypadku laboratoryjnego i klinicznych szczepów *A. baumannii*. Także zastosowanie CSA-131 wykazało zależny od stężenia efekt eradykacji biofilmu na rurkach silikonowych. Jego skuteczność okazała się jednak nieznacznie mniejsza w porównaniu z CSA-13.

5.3.4. Zmiany morfologii komórek *A. baumannii* poddanych działaniu ceragenin zaobserwowane z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych

Wyniki obrazowania AFM przedstawiają reprezentatywną morfologię komórek bakteryjnych po dodaniu CSA-13 i CSA-131 w dawce 5 oraz 10 µg/ml. W komórkach bakteryjnych *A. baumannii* poddanych działaniu cerageniny CSA-13 i CSA-131 zaobserwowano zmiany morfologiczne, tj. mikropęknięcia, w porównaniu z komórkami kontrolnymi, zwłaszcza w dawce 10 µg/ml. Analiza AFM nie wykazała istotnych zmian w morfologii bakterii poddanych działaniu ceragenin w dawce 5 µg/ml. W przypadku zastosowania CSA-13 kształt bakterii stał się bardziej owalny. Sztywność powierzchni bakterii zmniejszyła się po dodaniu testowanych ceragenin. W przypadku CSA-13 (w dawce 10 µg/ml) sztywność komórek bakteryjnych zmniejszyła się o około 46% w porównaniu z komórkami kontrolnymi, a w przypadku CSA-131 (w dawce 10 µg/ml) sztywność zmniejszyła się o około 32%. Wyniki wskazują, że zmiany w organizacji lipidów błony plazmatycznej mogą być związane ze zmianami właściwości mechanicznych powierzchni komórek. Warto podkreślić, iż po dodaniu CSA-13 (w maksymalnej dawce 10 µg/ml) siły adhezji powierzchni bakteryjnych zmniejszyły się o 6,1%.

5.3.5. Cytotoksyczność ceragenin wobec komórek nabłonkowych linii A549 w stężeniach bakteriobójczych

Zgodnie z przeprowadzonym testem MTT wobec ludzkich komórek raka płuc linii A549, cerageniny CSA-13, CSA-44 i CSA-131 wykazywały działanie zależne od dawki. Zmniejszały one znacząco żywotność komórek przy wyższych stężeniach (20 µg/ml i 50 µg/ml) w porównaniu z grupą kontrolną. CSA-44 i CSA-131 wykazywały łagodny spadek żywotności komórek w wyższych stężeniach (powyżej 20 µg/ml), z mniej zauważalną cytotoksycznością.

5.3.6. Właściwości antyadhezyjne CSA-13

Test adhezji przeprowadzony przy użyciu komórek nabłonkowych ludzkiego nowotworu płuc linii A549 wykazał, że CSA-13 znacząco wpływa na adhezję szczepu laboratoryjnego ATCC19606 i opornego na karbapenemy *A. baumannii* (S02, S04, S06) do komórek gospodarza. Skuteczność CSA-13 w hamowaniu adhezji bakterii wzrastała proporcjonalnie do jej stężenia. W zakresie badanych stężeń CSA-13 wykazywała znaczący efekt hamujący, z najbardziej widocznym efektem w stężeniu 10 µg/ml, w którym adhezja bakterii była średnio o 11% niższa po dodaniu CSA-13 w porównaniu z kontrolą. Wyniki te podkreślają, jak skutecznie CSA-13 hamuje przyleganie *A. baumannii* do komórek nabłonka, wskazując, że CSA-13 może być stosowana jako substancja powstrzymująca inwazję *A. baumannii* do komórek gospodarza.

VI. DYSKUSJA

Ze względu na wielolekooporność szpitalnych szczepów *Acinetobacter baumannii* leczenie zakażeń o tej etiologii jest dużym wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Leki przeciwbakteryjne używane w terapii CRAB mają ograniczone działanie z powodu nabytych i wrodzonych mechanizmów oporności drobnoustroju [91-93]. W przypadku wielolekoopornych szczepów *A. baumannii* (MDR-AB), skojarzone leczenie z użyciem kolistyny często jest terapią ostatniej szansy, a i tak może zakończyć się niepowodzeniem ze względu na możliwość pojawienia się oporności w trakcie leczenia oraz liczne działania niepożądane leku takie jak nefrotoksyczność [19, 22, 23]. Poszukiwanie innowacyjnych metod leczenia staje się kluczowe dla skutecznej walki z zakażeniami wywołanymi przez ten drobnoustrój. Przykładem tych działań są obecnie badane dwie potencjalne metody leczenia zakażeń wywołanych przez CRAB: terapia fagowa oraz zastosowanie AMPs i ich mimetyków [94, 95]. Głównym celem badań przeprowadzonych w ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej była ocena skuteczności działania ceragenin w stosunku do wielolekoopornych szczepów *A. baumannii* pochodzących od pacjentów. Wyniki jednoznacznie wskazują na potencjał ceragenin do klinicznego zastosowania w terapii infekcji o etiologii *A. baumannii*.

Badanie właściwości przeciwbakteryjnych CSA-13, CSA-44 oraz CSA-131 wobec 65 szczepów *A. baumannii* potwierdza niezwykle skuteczną przeciwdrobnoustrojową ceragenin, często przewyższającą skuteczność tradycyjnych leków przeciwdrobnoustrojowych, takich jak ciprofloksacyna i meropenem, szczególnie w zwalczaniu szczepów CRAB. Uzyskane wyniki są spójne z danymi opisanymi w literaturze, wskazującymi na skuteczność CSA-13 i CSA-131 wobec szczepów *A. baumannii* opornych zarówno na kolistynę, jak i karbapenemy [58, 72, 96]. Uzyskane wartości MIC wśród badanych szczepów dla CSA-13 i CSA-131 nie przekraczały 4 µg/ml, a dla CSA-44 – 8 µg/ml, a efekt bakteriobójczy wobec testowanych szczepów CRAB w teście zliczania kolonii uzyskano podczas zastosowania CSA-13 i CSA-131 w stężeniach 0,5-1 µg/ml, a CSA-44 2-5 µg/ml.

Rozwój biofilmu bakteryjnego, będący formą adaptacji, pozwala patogenom na przetrwanie w niesprzyjających warunkach. Proces ten znacząco zwiększa oporność drobnoustrojów na standardowe terapie antybiotykowe [97]. Zdolność *A. baumannii* do tworzenia biofilmu zarówno na powierzchniach biotycznych, jak i abiotycznych bez wątpienia przyczynia się do przetrwania drobnoustroju w warunkach szpitalnych,

co znacząco zwiększa ryzyko wystąpienia zakażeń szpitalnych oraz szpitalnych ognisk epidemicznych. Przeprowadzone badania podkreślają skuteczne działanie przeciwbiofilmowe CSA-13. W niskiej dawce 5 µg/ml, CSA-13 całkowicie zahamowała tworzenie biofilmu zarówno przez badany szczep laboratoryjny, jak i kliniczne szczepy odporne na karbapenemy. Do uzyskania porównywalnego efektu należało użyć CSA-44 i CSA-131 w stężeniach 20 µg/ml. Otrzymane wyniki porównujące różne cerageniny wskazują, że CSA-13 jest szczególnie skuteczna w zapobieganiu tworzeniu biofilmu nawet w niskich stężeniach. Podobne dane z różnymi szczepami bakterii i grzybów zostały opisane w literaturze [49, 74, 98, 99]. Warto zaznaczyć, że CSA-13 była tak samo skuteczna jak kolistyna, która jest dobrze znana z właściwości przeciwbiofilmowych.

Wyniki potwierdzające właściwości przeciwbiofilmowe ceragenin w stosunku do szczepów szpitalnych wskazują na potencjalne możliwości wykorzystania tych związków w zapobieganiu infekcjom związanych ze stosowaniem ciał obcych. Szczególnie godna uwagi jest zdolność ceragenin do hamowania rozwoju biofilmu na rurkach tracheostomijnych [100]. Z klinicznego punktu widzenia biofilm na biomateriałach wprowadzanych do organizmu człowieka jest problemem głównie ze względu na większą oporność na antybiotyki oraz trudności w eradykacji zakażenia bez konieczności usunięcia ciała obcego.

Quorum sensing (QS) odgrywa kluczową rolę w powstawaniu biofilmu, w tym biofilmu tworzonego przez *A. baumannii* i stanowi istotny mechanizm zapewniający przetrwanie, patogenność i oporność bakterii na antybiotyki [101-104]. *A. baumannii* wykorzystuje system QS oparty na przekazywaniu sygnałów za pomocą laktonów acylo-homoserynowych (AHL), które koordynują ekspresję genów odpowiedzialnych za tworzenie biofilmu [105]. Cerageniny mają zdolność hamowania procesu komunikacyjnego opartego na AHL, co ogranicza koordynację bakterii niezbędną do inicjowania i podtrzymania wzrostu biofilmu. Działanie to może wynikać z bezpośredniej interakcji ceragenin z cząsteczkami QS lub ich receptorami, co z kolei prowadzi do zaburzeń w przekazywaniu sygnałów. W rezultacie następuje zmniejszenie produkcji biofilmu oraz zwiększenie podatności bakterii na stres środowiskowy i działanie środków przeciwdrobnoustrojowych.

Obecność pili u *A. baumannii* zwiększa zdolność bakterii do wywoływania infekcji, poprzez ułatwienie procesu adhezji, który jest niezbędnym etapem w kolonizacji i rozwijaniu zakażeń [106]. Regulacja ekspresji pili jest warunkowana przez złożoną sieć, która obejmuje sygnalizację c-di-GMP i niektóre białka regulatorowe, takie jak PdeB [107,

108]. Białka te odgrywają rolę w kontrolowaniu tworzenia i aktywności pili. Cerageniny mogą potencjalnie zakłócać tworzenie lub działanie pili, a tym samym ograniczać zdolność adhezji *A. baumannii* do powierzchni. Działanie to może wynikać z mechanizmu bezpośredniej interakcji poprzez wiązanie ceragenin z białkami pili oraz ich podjednostkami, upośledzając ich funkcje lub ingerencję w szlaki regulacyjne odpowiedzialne za ekspresję pili, takie jak sygnalizacja c-di-GMP lub aktywność PdeB.

Wykonane badania wskazują, że badane bakterie były w stanie tworzyć biofilm na powierzchni silikonowych segmentów rurek dotchawiczych. Z kolei cerageniny skutecznie eliminują taki biofilm, co wskazuje na potencjalną możliwość zastosowania CSAs jako środków do powlekania powierzchni różnych biomateriałów szeroko stosowanych w medycynie. Wyniki te są spójne z wcześniejszymi raportami opublikowanymi w literaturze. Pollard i wsp. opisali skuteczność CSA-13 w eliminowaniu biofilmu tworzonego w wyniku wzrostu zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych w stężeniach porównywalnych do ciprofloksacyny [109]. W innym badaniu CSA-13 wykazała wysoką skuteczność w eliminowaniu biofilmów z udziałem *A. baumannii*, zarówno jedno-, jak i wielogatunkowych, natomiast CSA-131 wykazała nieco niższą skuteczność, co jest zgodne z przeprowadzonymi badaniami własnymi [110]. Badanie obejmujące eradykację biofilmu 20 szczepów *Legionella pneumophila* wskazało skuteczność badanych ceragenin, a wymagane stężenia CSA-13 i CSA-131 do osiągnięcia celu były zbliżone [111]. Wysoką skuteczność CSA-13 w eradykacji biofilmu *P. aeruginosa* potwierdza badanie Bozkurt Güzel'a i wsp. [99] Powłoki zawierające CSA-13 zostały z powodzeniem zastosowane w różnych materiałach medycznych, takich jak: stalowe płytki do stabilizacji złamań, implanty tytanowe czy soczewki kontaktowe, gdzie skutecznie hamowały powstawanie biofilmu i zapobiegały infekcji *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus aureus*. Wskazuje to na możliwość wykorzystania CSA w różnych sytuacjach klinicznych wymagających użycia biomateriałów [112-114]. Wszechstronne właściwości ceragenin, w tym silna aktywność przeciwdrobnoustrojowa i przeciwbiofilmowa, wysoka stabilność w płynach ustrojowych oraz właściwości fizyczne, czynią je cennymi kandydatami do zastosowań medycznych. Literatura wskazuje, że cienkie warstwy zawierające CSA-131 mogą chronić rurki dotchawicze, protezy głosowe jak i porty naczyniowe przed formowaniem biofilmów *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* i *Candida auris* [75, 100, 115, 116]. W literaturze są nieliczne badania dotyczące *A. baumannii*, co podkreśla potrzebę pogłębionych analiz i dalszych prac w tym obszarze.

Wyjątkowość badań własnych polega na wykorzystaniu mikroskopii sił atomowych (AFM) celem rejestrowania obrazów i pomiaru zmian właściwości fizycznych komórek *A. baumannii* po dodaniu ceragenin. Metodologia ta uzupełnia tradycyjne testy mikrobiologiczne, poszerzając wiedzę o sposobie działania bakteriobójczego ceragenin. Kilka opisanych w literaturze badań z obrazowaniem AFM dotyczyło wpływu środków przeciwdrobnoustrojowych, takich jak AMP i ich pochodnych, na strukturę powierzchni bakterii i grzybów z rodzaju *Candida* [117-119]. Badania te znacznie pogłębiły zrozumienie mechanizmów działania badanych substancji. Badania stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej wykazały, że cerageniny CSA-13 i CSA-131 w stężeniach 5 i 10 $\mu\text{g/ml}$ powodują uszkodzenia błony zewnętrznej komórek *A. baumannii*. Podobny efekt pokazano w pracy [55], w której badano wpływ wybranych ceragenin na morfologię komórek *K. pneumoniae* BAA-2473. Insercja ceragenin w strukturę lipidową błony bakteryjnej skutkuje zmianą organizacji dwuwarstwy lipidowej błony, prowadząc do jej uszkodzenia, co prowadzi do lizy komórki. Własne oraz przytoczone wyniki badań pokazują, że AFM może służyć do precyzyjnego obrazowania wpływu testowanych związków przeciwdrobnoustrojowych na komórki drobnoustrojów. Przeprowadzony eksperyment pokazał, że CSA-13 i CSA-131 wyraźnie obniżają sztywność komórek. Wyniki te sugerują, że cerageniny wpływają na organizację lipidów w błonach komórkowych, co zmienia mechaniczne właściwości powierzchni bakterii. W przypadku CSA-13 zaobserwowano większy spadek sztywności w porównaniu do CSA-131, co wskazuje na różny ilościowo efekt działania badanych substancji. Kolejnym aspektem, na który zwrócono uwagę, jest wyraźny wpływ cerageniny na zdolność bakterii do przylegania do powierzchni. Zastosowanie CSA-13 spowodowało redukcję sił adhezji bakterii o 6,1%, co wskazuje na obniżenie zdolności adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni abiotycznych, co może sprzyjać zapobieganiu powstawania biofilmu. Z kolei zastosowanie CSA-131 spowodowało wzrost sił adhezji o 13,3%, co sugeruje sposób oddziaływania z błoną bakteryjną o innym mechanizmie molekularnym. Redukcję sił adhezji podczas stosowania ceragenin zaobserwowano również w innych badaniach [55, 99]. Zgodnie z wcześniej opublikowanymi wynikami badań, bakterie w obecności ceragenin przechodzą przez różne stadia w zależności od czasu działania ceragenin i zastosowanego stężenia. Początkowo, po dodaniu do zawiesiny komórek bakterii ceragenin w niskim stężeniu (poniżej wartości MIC) dochodzi do zwiększenia sztywności powierzchni komórkowej, a później, gdy pojawiają się morfologiczne oznaki uszkodzenia, sztywność ta maleje [120]. Obserwacje własne wzbogacają rosnący zbiór dowodów

potwierdzających terapeutyczny potencjał ceragenin w zwalczaniu bakterii lekoopornych, co odpowiada na istotne potrzeby współczesnej medycyny.

Potencjalne bezpieczne zastosowanie terapeutyczne ceragenin potwierdza fakt, iż dawki konieczne do uzyskania efektu bakterioobójczego wobec *A. baumannii* mieszczą się w znanych granicach biokompatybilności. Należy jednak zauważyć, że linia komórkowa A549, wykorzystana w niniejszym badaniu, pochodzi z ludzkich komórek raka płuc, co może zwiększać cytotoksyczność ceragenin w porównaniu z pierwotnymi liniami komórkowymi. Wynika to z faktu, iż zarówno AMP, jak i cerageniny są uznawane za środki przeciwnowotworowe, wykazując podwyższoną aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych [66, 121]. Komórki nowotworowe różnią się składem błony komórkowej od pierwotnych, nietransformowanych komórek. Niemniej jednak, badania z wykorzystaniem komórek nabłonkowych raka płuc linii A549 dostarczają informacji o minimalnym poziomie aktywności przeciwbakteryjnej, który nie powoduje uszkodzenia komórek eukariotycznych. Przeprowadzony test adhezji przy użyciu komórek nabłonkowych raka płuc linii A549 wskazuje na silne właściwości antyadhezyjne CSA-13. Ceragenina ta wyraźnie ograniczyła adhezję szczepu laboratoryjnego ATCC19606 i opornych na karbapenemy szczepów *A. baumannii* (S02, S04, S06) do badanych komórek. Hamowanie adhezji bakterii było zależne od stężenia cerageniny, a największy efekt zaobserwowano przy stężeniu 10 µg/ml, gdzie adhezja była mniejsza o około 11% w porównaniu do kontroli. Wyniki te wskazują, że CSA-13 może odgrywać rolę w opracowywaniu nowych terapii zakażeń *A. baumannii* opornych na karbapenemy, poprzez zapobieganie przyleganiu bakterii do komórek nabłonka, co stanowi ważny etap w procesie inwazji komórek gospodarza i rozwoju infekcji.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wskazują na obiecującą skuteczność ceragenin wobec szczepów *Acinetobacter baumannii* oraz potencjalną możliwość wykorzystania tych związków w zapobieganiu i leczeniu zakażeń wywoływanych przez ten wielolekooporny drobnoustrój.

VII. WNIOSKI

1. Cerageniny wykazują wysoką skuteczność przeciwbakteryjną przeciwko badanym szczepom klinicznym *A. baumannii*.
2. Najsilniejsze działanie bakteriobójcze w stosunku do *A. baumannii* wykazuje ceragenina CSA-13 i CSA-131, i jest ono porównywalne do działania kolistyny.
3. Cerageniny zapobiegają tworzeniu biofilmu *A. baumannii*.
4. CSA-13 oraz CSA-131 cechuje wysoka zdolność eradykacji biofilmu utworzonego przez *A. baumannii* na powierzchni silikonowych rurek dotchawiczych.
5. Cerageniny powodują zmniejszenie sztywności komórek *A. baumannii*.
6. CSA-13, CSA-44 oraz CSA-131 w najniższych skutecznych stężeniach bakteriobójczych wobec badanych szczepów *A. baumannii* wykazują niską cytotoksyczność w stosunku do komórek nabłonkowych raka płuc linii A549.

VIII. KOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

8.1. Praca oryginalna

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Piktel Ewelina, Bucki Robert: *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. International Journal of Molecular Sciences 2024, 25, 7036. <https://doi.org/10.3390/ijms25137036>.

IF = 4.9, MNiSW = 140.00



Article

Investigating the Effectiveness of Ceragenins against *Acinetobacter baumannii* to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies

Maciej Karasiński ¹, Urszula Wnorowska ¹, Tamara Daniluk ¹, Piotr Deptuła ², Milena Łuckiewicz ², Paulina Paprocka ³, Bonita Durnas ³, Karol Skłodowski ¹, Beata Sawczuk ⁴, Paul B. Savage ⁵, Ewelina Piktel ² and Robert Bucki ^{1,*}

¹ Department of Medical Microbiology and Nanobiomedical Engineering, Medical University of Białystok, 15-222 Białystok, Poland; maciek.karasinski@gmail.com (M.K.); urszula.wnorowska@umb.edu.pl (U.W.); tamara.daniluk@umb.edu.pl (T.D.); karol.sklodowsky@gmail.com (K.S.)

² Independent Laboratory of Nanomedicine, Medical University of Białystok, 15-222 Białystok, Poland; piotr.deptula@umb.edu.pl (P.D.); milenaluckiewicz@gmail.com (M.L.); ewelina.piktel@umb.edu.pl (E.P.)

³ Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, Collegium Medicum, Jan Kochanowski University in Kielce, 25-317 Kielce, Poland; paulina.paprocka@ujk.edu.pl (P.P.); bonita.durnas@ujk.edu.pl (B.D.)

⁴ Department of Prosthodontics, Medical University of Białystok, Skłodowskiej 24a, 15-276 Białystok, Poland; beata.sawczuk@wp.pl

⁵ Department of Chemistry and Biochemistry, Brigham Young University, Provo, UT 84602, USA; pbsavage@chem.byu.edu

* Correspondence: buckirobert@gmail.com



Citation: Karasiński, M.; Wnorowska, U.; Daniluk, T.; Deptuła, P.; Łuckiewicz, M.; Paprocka, P.; Durnas, B.; Skłodowski, K.; Sawczuk, B.; Savage, P.B.; et al. Investigating the Effectiveness of Ceragenins against *Acinetobacter baumannii* to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 7036. <https://doi.org/10.3390/ijms25137036>

Academic Editor: Andreas Burkovski

Received: 30 May 2024

Revised: 21 June 2024

Accepted: 24 June 2024

Published: 27 June 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: A growing body of experimental data indicates that ceragenins (CSAs), which mimic the physicochemical properties of the host's cationic antimicrobial peptide, hold promise for the development of a new group of broad-spectrum antimicrobials. Here, using a set of in vivo experiments, we assessed the potential of ceragenins in the eradication of an important etiological agent of nosocomial infections, *Acinetobacter baumannii*. Assessment of the bactericidal effect of ceragenins CSA-13, CSA-44, and CSA-131 on clinical isolates of *A. baumannii* ($n = 65$) and their effectiveness against bacterial cells embedded in the biofilm matrix after biofilm growth on abiotic surfaces showed a strong bactericidal effect of the tested molecules regardless of bacterial growth pattern. AFM assessment of bacterial cell topography, bacterial cell stiffness, and adhesion showed significant membrane breakdown and rheological changes, indicating the ability of ceragenins to target surface structures of *A. baumannii* cells. In the cell culture of A549 lung epithelial cells, ceragenin CSA-13 had the ability to inhibit bacterial adhesion to host cells, suggesting that it interferes with the mechanism of bacterial cell invasion. These findings highlight the potential of ceragenins as therapeutic agents in the development of antimicrobial strategies against bacterial infections caused by *A. baumannii*.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; ceragenins; biofilm; atomic force microscopy; antimicrobial; anti-adhesive strategies

1. Introduction

Due to the increasing number of infections caused by bacteria with various resistance mechanisms, there is an urgent need to conduct research aimed at the synthesis of new antibiotics. An important area of research in this field is the search for natural antimicrobial peptides and the synthesis of their improved mimics. Ceragenins are an example of such a group of compounds. Although ceragenins are non-peptide, cholic acid-based compounds, they imitate the action of antimicrobial peptides and exhibit a wide spectrum of antimicrobial effects [1–3]. The mechanism of action of ceragenins is determined by the positive charge, which, through physical interactions with the negatively charged

cell membrane of microorganisms, results in ceragenin incorporation into the bilayer structure, followed by its disruption and microorganism death. The mechanism of action can be explained by the “carpet” hypothesis, which suggests that antimicrobial molecules rupture the bacterial membrane and produce micelles due to the tension generated by the antimicrobial once it reaches its critical concentration on the membrane surface [4]. Moreover, ceragenins were reported to bind to lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) of Gram-negative and Gram-positive bacteria, and for this reason they inhibit innate immune recognition. A mechanism of membrane disruption based on the production of reactive oxygen species has also been described [5]. These compounds show low potential for toxic effects against host cells at concentrations of effective bactericidal activity, making them relatively safe substances [6,7]. Due to the much simpler structure, the cost associated with the ceragenins’ synthesis is much lower compared to AMPs or their amino acid-based mimics. This is an important feature in terms of the possibility of using ceragenins on a large scale. Additionally, ceragenins as cholic acid derivatives are not enzymatically inactivated by proteases, retaining their activity at bacterial infection sites in proteolytic enzymes released mostly from neutrophils [6]. Ceragenins show synergistic or additive effects with conventional antibiotics or with other ceragenins. It is noteworthy that, so far, an antagonistic effect was not observed [7,8]. An important feature of ceragenin is its anti-biofilm activity—both inhibiting its formation (preventive) and eradicating bacterial cells in pre-form biofilm mass (curative) [9]. The possibility of resistance generation to ceragenins is small compared to conventionally used antibiotics. Bacteria are able to develop adaptive resistance mainly through modification of lipid A, while in the absence of ceragenins’ effects on their cells, they revert to susceptible forms [10].

On a global scale, the clinical significance of this pathogen results from its outstanding ability to develop and acquire various mechanisms of antibiotic resistance [11]. These aerobic, pleomorphic, and non-motile bacteria are resistant to all β -lactams, including carbapenems, and display a strong ability to rapidly change under selective environmental pressures [12]. In most cases, a significant proportion of *A. baumannii* clinical isolates originated from respiratory samples of hospitalized patients, and this etiology is of particular importance in the individual diagnosis of ventilator-associated pneumonia (VAP) in the ICU [13–15]. *A. baumannii* is equipped with various virulence factors, including LPS, siderophore-mediated iron acquisition systems, and factors regulating biofilm formation and adhesion [16]. The ability of *A. baumannii* to adhere and form biofilms on various surfaces (pili formation and exopolysaccharide production, respectively) largely determines its importance in the hospital setting [17,18]. Interestingly, its adherence to host cells can cause Omp38-mediated apoptosis [19]. Here, we present experimental evidence from in vitro studies demonstrating the potent bactericidal activity of ceragenins against various clinical isolates of *A. baumannii*, the ability of ceragenins to combat *A. baumannii* biofilm on abiotic surfaces, and the ability to prevent its attachment to host cell surfaces.

2. Results

2.1. Ceragenins CSA-13 and CSA-131 Showcase Potent Antibacterial Efficacy against *A. baumannii* and CRAB Strains

The microdilution method was used to evaluate the MIC and MBC of ceragenins (CSA-13, CSA-44, and CSA-131; Figure 1) and conventional antibiotics (ciprofloxacin, meropenem, and colistin) against a single laboratory strain and 65 clinical strains of *A. baumannii* (Figure 2).

As demonstrated, the MIC values of laboratory strain ATCC 199606 range between 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the MBC is 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, showing a high level of susceptibility to ciprofloxacin, meropenem, and colistin. When analyzing the antibiotic susceptibility of clinical isolates, it was noted that the MIC values for ciprofloxacin ranged in a majority of cases from 16 to 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while one clinical strain had a significantly low MIC value of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which indicates a high susceptibility to ciprofloxacin. In the same way, the MBC for these bacteria was found to be 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, showing that it can kill bacteria effectively at a low dose. There was a range of MIC values for meropenem of 4–256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Most bacteria

had MBC values higher than 256 µg/mL. Colistin demonstrated a range of MIC values of 0.5–64 µg/mL, with MBC values for a majority of strains ranging from 1 to 16 µg/mL.

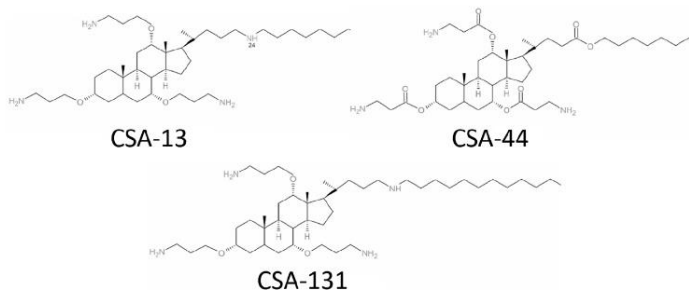


Figure 1. Structural formulae of ceragenins CSA-13, CSA-44, and CSA-131.

A. baumannii	CSA-13		CSA-44		CSA-131		Ciprofloxacin		Meropenem		Colistin	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ATCC 19606	2	4	4	8	8	16	0.5	2	1	2	1	2
S01*	1	2	0.5	1	1	1	256	>256	32	64	0.5	0.5
S02*	2	4	4	8	8	8	64	>256	128	>256	8	16
S03	2	4	1	2	1	2	128	>256	64	128	1	2
S04*	4	8	2	4	2	4	64	>256	>256	>256	4	8
S05*	2	4	4	8	2	4	64	>256	256	>256	32	32
S06*	4	8	8	16	2	4	128	>256	128	>256	4	8
S07	2	4	8	8	2	4	128	>256	>256	>256	64	128
S08*	4	8	2	8	4	8	64	>256	>256	>256	1	2
S09	4	8	4	8	4	8	64	>256	4	8	2	4
S10	4	8	4	8	4	8	16	>256	4	8	2	2
S11	4	8	2	4	2	4	16	>256	64	128	0.5	2
S12	4	8	4	8	1	4	1	2	64	128	16	32
S13	4	8	4	8	2	4	64	>256	64	>256	8	16
S14	4	8	4	8	8	16	32	64	>256	>256	2	4
S15	4	8	4	8	4	8	32	64	>256	>256	2	4
S16	4	8	4	8	4	8	64	128	64	128	4	8
S17	4	8	4	8	4	8	>256	>256	>256	>256	4	8
S18	4	8	4	8	4	8	32	64	>256	>256	4	8
S19	4	8	4	8	4	8	128	>256	>256	>256	4	8
S20	2	4	4	8	4	8	>256	>256	>256	>256	2	4
S21	8	16	4	8	8	16	64	128	>256	>256	8	16
S22	4	8	4	8	4	8	64	128	>256	>256	8	16
S23	4	8	4	8	2	4	64	128	>256	>256	4	8
S24	4	8	4	8	4	8	64	128	>256	>256	1	2
S25	4	8	4	8	2	4	32	64	>256	>256	1	2
S26	4	8	4	8	4	8	64	128	>256	>256	2	4
S27	4	8	4	8	4	8	64	128	>256	>256	2	4
S28	128	4	4	8	4	8	128	>256	>256	>256	2	4
S29	2	4	4	8	2	4	128	>256	>256	>256	2	4
S30	4	8	4	8	2	4	32	64	128	>256	2	4
S31	4	8	4	8	4	8	64	128	>256	>256	2	4
S32	8	16	8	16	4	8	64	128	>256	>256	2	4
S33	4	8	4	8	4	8	>256	>256	>256	>256	2	4
S34	2	4	2	4	4	8	64	128	>256	>256	2	4
S35	2	4	2	4	2	4	32	64	4	8	2	4
S36	2	4	2	4	4	8	64	128	4	8	2	4
S37	2	4	2	4	2	2	32	64	4	8	1	2
S38	2	4	4	8	4	8	16	32	32	64	2	4
S39	4	8	4	8	2	4	128	>256	>256	>256	2	4
S40	2	4	4	8	4	8	32	64	128	128	4	8
S41	2	4	4	8	4	8	64	128	64	128	2	4
S42	4	8	2	4	1	2	32	64	>256	>256	1	2
S43	4	8	4	8	4	8	64	128	>256	>256	1	2
S44	4	8	4	8	2	4	64	128	>256	>256	2	4
S45	4	8	2	8	2	4	32	64	>256	>256	2	4
S46	4	8	4	8	4	8	128	>256	>256	>256	2	4
S47	4	8	4	8	4	8	64	128	128	>256	2	4
S48	4	8	4	8	4	8	32	64	32	64	2	4
S49	4	8	4	8	2	4	>256	>256	32	64	2	4
S50	4	8	4	16	4	8	64	128	>256	>256	2	4
S51	4	8	4	8	4	8	64	128	>256	>256	2	4
S52	4	8	4	8	4	8	128	>256	>256	>256	4	8
S53	4	8	4	8	4	8	64	128	>256	>256	4	8
S54	4	8	4	8	4	8	64	128	>256	>256	4	8
S55	4	8	4	8	4	8	32	64	>256	>256	2	4
S56	4	8	4	8	4	8	64	128	>256	>256	2	4
S57	4	8	4	8	4	8	64	128	>256	>256	2	4
S58	8	16	4	8	2	4	64	128	>256	>256	2	4
S59	2	4	2	4	4	8	32	64	128	>256	1	2
S60	4	8	4	8	4	8	16	32	>256	>256	2	4
S61	4	8	2	4	2	4	32	64	64	128	1	2
S62	2	4	2	4	2	4	64	128	>256	>256	1	2
S63	4	8	2	4	2	4	16	32	>256	>256	1	2
S64	4	8	2	4	2	4	32	128	128	>256	1	2
S65	2	4	2	4	2	4	16	32	64	128	1	2

Figure 2. Minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs) of ceragenins (CSA-13, CSA-44, and CSA-131) and conventional antibiotics (ciprofloxacin, meropenem, colistin) against laboratory (ATCC 19606) and clinical strains of A. baumannii (n = 65). * Indicates the carbapenem-resistant A. baumannii strains tested here in other experimental settings.

In contrast to the variable susceptibility of isolates to conventional antibiotics, ceragenins had effective antibacterial action against the majority of tested strains. The MIC values of tested ceragenins (CSA-13, CSA-44, and CSA-131) for carbapenem-resistant *A. baumannii* strains (S01, S02, S04, S05, S06, and S08) were assessed. MIC values of 1–4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for CSA-13, 0.5–8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for CSA-44, and 1–4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for CSA-131 were observed. Remarkably, these values were found to be in alignment with the low MICs observed for *A. baumannii* strains not resistant to carbapenems. In detail, the MIC values for ceragenin CSA-13 ranged from 1 to 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with most strains showing MIC values within this range. Importantly, among the 66 isolates tested, only three strains exhibited elevated MIC values of 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, suggesting a lower susceptibility to CSA-13. Similarly, the strains exhibited MBC values of 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Similarly, the CSA-44 displayed a range of MIC values, varying from 0.5 to 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for a majority of strains; only two strains had higher MIC/MBC values of 8/16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Typically, CSA-131 showed MBC values between 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and MIC values between 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Overall, the low MIC values of the ceragenins demonstrated a considerable efficacy in inhibiting bacterial growth against a broad spectrum of *A. baumannii* strains, including those present in clinical environments.

In order to assess the bactericidal effects of ceragenins and conventional antibiotics on CRAB strains, we employed a standard bacteria-killing assay experiment. The susceptibility data obtained from our research clearly indicate that ceragenins exhibit more potent bactericidal activity against CRAB strains compared to standard antibiotics such as ciprofloxacin and meropenem (Figure 3).

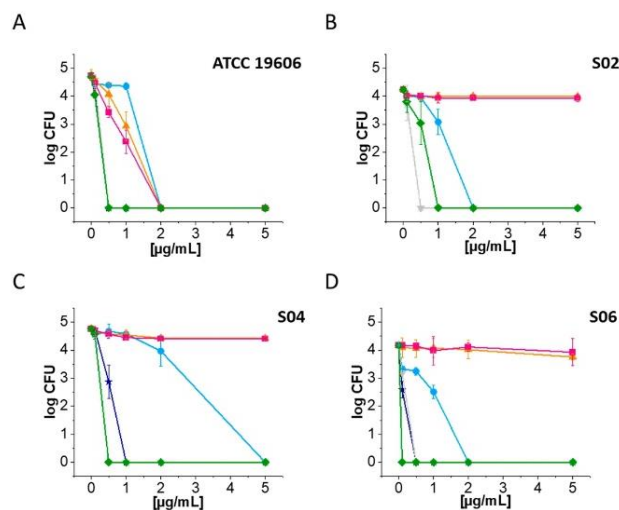


Figure 3. Bactericidal activities of ceragenins (CSA-13, dark blue stars; CSA-44, blue circles; CSA-131, grey triangles) and conventional antibiotics (ciprofloxacin, orange triangles; meropenem, pink squares; colistin, green rhombus) against *A. baumannii* (ATCC 19606) (A) and clinical strains of carbapenem-resistant *A. baumannii* (S02, (B); S04, (C); S06, (D)) determined with use of colony counting assay (killing assay).

Furthermore, CSA-13 and CSA-131 exhibited significantly greater efficacy against *A. baumannii* strains (Figure 3A–D), within the concentration range of 0.5–1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Conversely, no significant bactericidal effect was noted for CRAB strains after treatment with ciprofloxacin and meropenem, even at a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 3A–D).

2.2. Atomic Force Microscopy Measurements of *A. baumannii* Cells Subjected to Deragenin Addition

Visualization of the morphological alteration of *A. baumannii* cells subjected to ceragenins CSA-13 and CSA-131 using AFM is shown in Figure 4.

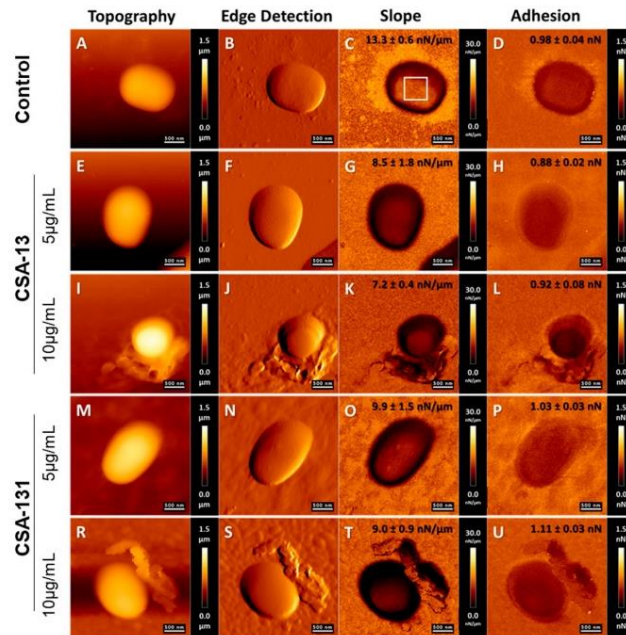


Figure 4. Atomic force microscopy measurements (JPK QI™ mode—Quantitative Imaging) of carbapenem-resistant *A. baumannii* cells (clinical strain No. 2) subjected to ceragenin treatment. Examination of AFM topography, cell stiffness (Slope), and adhesion upon addition of CSA-13 and CSA-131 at 5 µg/mL and 10 µg/mL, respectively.

An AFM study was performed to confirm the antibacterial effect of selected ceragenins on *A. baumannii* cells and the destruction of cell membranes caused by ceragenins. Figure 4 presents the representative morphology of bacterial cells after CSA-13 and CSA-131 treatment. The obtained results indicate that the mechanism of ceragenins action consists of their interaction with the bacterial membrane. Morphological alterations in bacterial *A. baumannii* cells subjected to ceragenin CSA-13, and CSA-131, i.e., microcracks, were observed compared to the untreated cells, especially at a dose of 10 µg/mL (Figure 4I,R). AFM analysis showed no significant change in the morphology of the treated bacteria using ceragenins at a lower dose of 5 µg/mL. In the case of CSA-13 treatment, the shape of the bacteria became more oval (Figure 4J). The stiffness of the bacterial surface decreased upon tested ceragenin addition. In the case of CSA-13 (at a dose of 10 µg/mL), the stiffness of bacterial cells decreased by 45.9% compared to the untreated cells; in the case of CSA-131 treatment (at a dose of 10 µg/mL), the stiffness decreased by 32.3%. The results indicate that changes in the of membrane lipid organization may be related to changes in the mechanical properties of cell surfaces. In case of CSA-13 treatment (at a maximum dose of 10 µg/mL), the adhesion forces of bacterial surfaces decreased by 6.1%. In the case of CSA-131, the adhesion forces increased by 13.3% (Figure 4U).

2.3. Biofilm Eradication of Carbapenem-Resistant *A. baumannii* after CSA-13 Addition at Low Concentration

The results of our study indicate that CSA-13 showed the highest level of antibiofilm activity against both the laboratory strain and carbapenem-resistant *A. baumannii* (S02, S04,

S06) that were evaluated. Significantly, the complete elimination of biofilm was observed at a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CSA-13 or 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CSA-44 or CSA-131. It is important to note that all ceragenins were better at preventing biofilm formation than ciprofloxacin and meropenem (Figure 5A–D), and only colistin had comparable antibiofilm properties to CSA-13.

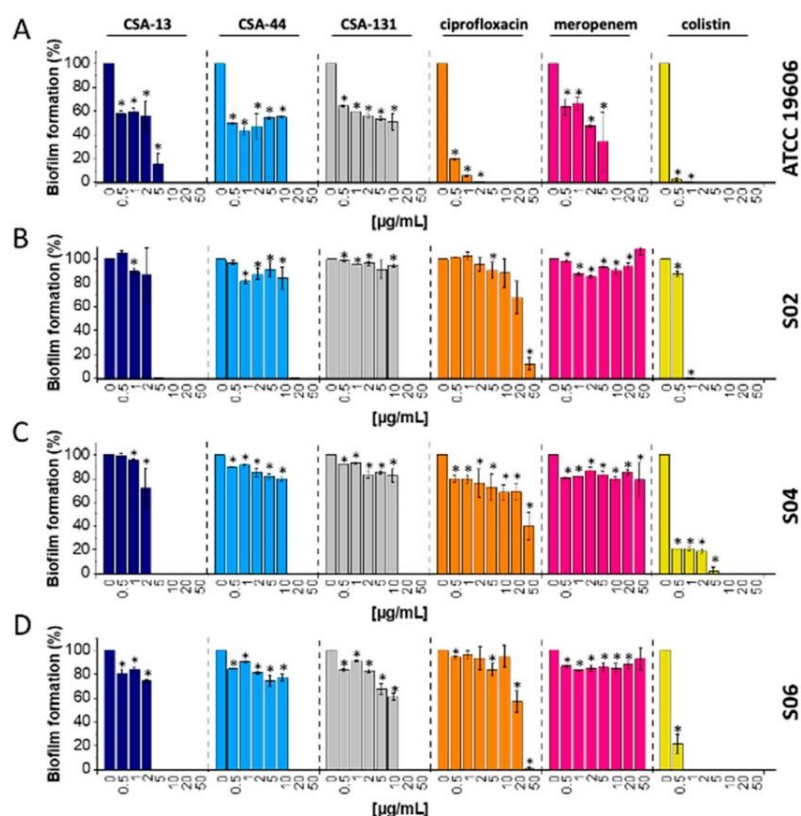


Figure 5. Anti-biofilm effects of ceragenins and conventional antibiotics against *A. baumannii*. Increasing concentrations (0–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of ceragenins (CSA-13, dark blue columns; CSA-44, blue columns; CSA-131, grey columns) and conventional antibiotics (ciprofloxacin, orange columns; meropenem, pink columns; colistin, yellow columns) were used to treat laboratory (ATCC 19606, (A)) and clinical strains of carbapenem-resistant *A. baumannii* (S02, (B); S04, (C); S06, (D)). After treatment, the remaining biofilm was stained with resazurin to assess its viability. The results are presented as mean \pm SD. * Indicates statistical significance ($p < 0.05$) when compared to control.

The results show that CSA-13 has promising antibiofilm qualities and could be a very effective way to treat CR *A. baumannii* infections. Furthermore, the great effectiveness of CSA-44 and CSA-131 in eliminating *A. baumannii* biofilms suggests that they may be useful substitutes for other therapies.

2.4. Ceragenins Exhibited Significant Potential as Antibiofilm Agents against *A. baumannii* Forming Biofilm on Tracheostomy Tube Surface

As anticipated, *A. baumannii* grows in biofilm formed on silicone endotracheal tube surfaces. The application of ceragenins (CSA-13 and CSA-131) to such a culture revealed strong antibiofilm activity against CR *A. baumannii* cells. More precisely, at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CSA-13 effectively eradicated bacterial cells within biofilm on the tested

tube segments (Figure 6A). In addition, the application of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CSA-13 led to a decrease in biofilm by about 80% or more in the case of laboratory and clinical strains of *A. baumannii*. Additionally, the application of CSA-131 showed a concentration-dependent antibiofilm effect on silicone tube biofilm growth (Figure 6B). Its effectiveness was found to be marginally less than that of CSA-13, though. However, CSA-131 demonstrated a noteworthy decrease in biofilm eradication even at reduced concentrations, indicating its promise as an antibiofilm agent against *A. baumannii* on tracheostomy tubes.

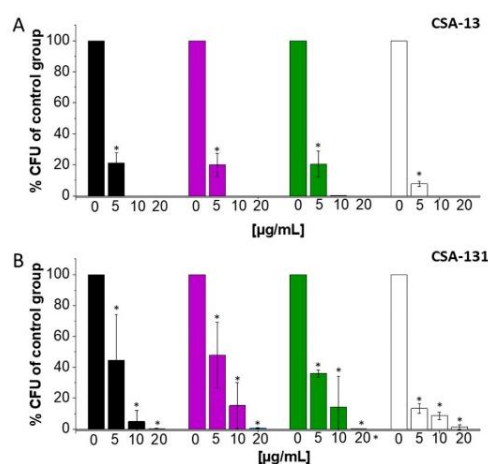


Figure 6. Decrease of *A. baumannii* cell viability in the biofilm pre-formed on the surface of silicone biomedical tubes after CSA-13 (A) and CSA-131 (B) treatment. The percentage of biofilm-embedded bacteria for laboratory strain (ATCC 19606, black columns) and carbapenem-resistant clinical strains of *A. baumannii* (S02, purple columns; S04, green columns; S06, white columns) was estimated after sonication of the preformed biofilm attached to the surface in the final moment of exposure to the surface in the tested ceragenin. The results are presented as mean \pm SD. * Indicates statistical significance ($p < 0.05$) when compared to control.

2.5. Ceragenins Display Low Cytotoxicity against A549 Cells at Bactericidal Concentrations

The MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity of ceragenins towards A549 epithelial cells. As demonstrated, CSA-13, CSA-44, and CSA-131 displayed dose-dependent effects. To be more precise, ceragenins significantly reduced cell viability at higher concentrations (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as compared to the control group (Figure 7). On the other hand, CSA-44 and CSA-131 exhibited a mild decline in cell viability at higher concentrations (beyond 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), with less noticeable cytotoxicity.

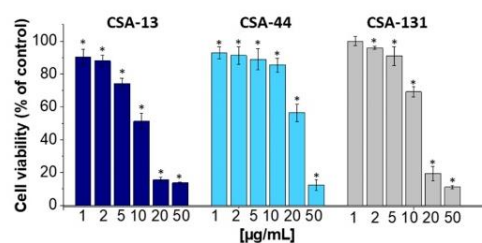


Figure 7. Viability of lung epithelial A549 cells upon 24 h exposure to ceragenins (CSA-13, dark blue columns; CSA-44, blue columns; CSA-131, grey columns) at doses ranging from 1 to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The viability of cells was determined using MTT assay. The results are presented as mean \pm SD. * Indicates statistical significance ($p < 0.05$) when compared to control.

2.6. Anti-Adhesive Properties of CSA-13

The adhesion assay performed using the A549 cell line revealed that CSA-13 significantly affected the laboratory strain ATCC19606 and carbapenem-resistant *A. baumannii*'s (S02, S04, S06) adherence to the host cells (Figure 8). The effectiveness of CSA-13 in inhibiting bacterial adhesion increased proportionally to its concentration. At different doses, CSA-13 exhibited a significant inhibitory effect, with the most prominent effect at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, where bacterial adhesion was, on average, 11% lower upon CSA-13 treatment compared to the untreated control. These results highlight how well CSA-13 inhibits *A. baumannii* attachment to epithelial cells, indicating that CSA-13 may be used as a therapeutic drug to stop carbapenem-resistant *A. baumannii* cell invasion.

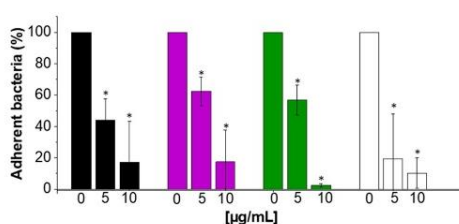


Figure 8. The impact of ceragenin CSA-13 on the adherence of the laboratory strain of *A. baumannii* (ATCC 19606, black columns) and clinical strains of carbapenem-resistant *A. baumannii* (S02, purple columns; S04, green columns; S06, white columns) to lung epithelial A549 cells. The adherence of bacterial cells to A549 was determined after 2 h exposure. The results are presented as mean \pm SD. * Indicates statistical significance ($p < 0.05$) when compared to control.

3. Discussion

Carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) causes severe, often fatal nosocomial infections, and for this reason it is classified as a priority pathogen 1 (critical) on the World Health Organization's (WHO) list of priority pathogens for research and development of new antibiotics [20]. Very few antimicrobials available for clinical use are effective against it—in monotherapy, sulbactam is one drug used to treat *A. baumannii*; most other treatment options include the combination of different medications with sulbactam [21–24]. For this reason, there is a need for the advancement or revelation of novel treatments, meticulously conducted clinical studies of current antimicrobial treatment strategies, and combinations to limit the spread of MDR *A. baumannii* infection in healthcare settings. Phage therapy and small molecules are two potential treatments for CRAB that are currently under investigation [25,26]. Moreover, the antibacterial alternatives available to CRAB are severely limited by acquired and inherent resistance mechanisms [24,27,28]. For multidrug-resistant *A. baumannii* (MDR-AB), the colistin (Polymyxin E; produced by *P. polymyxa* var. *colistinus*) is presently used as an initial treatment option [29]; however, due to the negative consequences of nephrotoxicity and the increasing incidence of resistance, its use poses significant challenges [30]. The primary objective of our study was to assess the efficacy of ceragenin in combating *A. baumannii* infection, particularly carbapenem-resistant *A. baumannii*. The results unambiguously demonstrate the favorable potential of ceragenins for clinical utilization against *A. baumannii* infections.

An investigation into the antibacterial properties against 65 strains of *A. baumannii* revealed that ceragenins have remarkable antimicrobial efficacy, frequently surpassing that of traditional antibiotics like ciprofloxacin and meropenem, particularly when combating CRAB strains. The unique thing about our study is that we tested the antibacterial abilities of ceragenins against a large group of clinical strains of *A. baumannii*. Our findings are consistent with previous research demonstrating the effectiveness of CSA-13 and CSA-131 against isolates of *A. baumannii* that are resistant to both colistin and carbapenem [31]. Additionally, it was shown that, with a MIC₅₀ value of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CSA-13 and CSA-131 were effective against resistant *A. baumannii* [31]. The findings from the killing assay

study demonstrate that both CSA-13 and CSA-131 show substantial antibacterial efficacy against the laboratory strain and all the clinical strains of *A. baumannii* that were evaluated. Moreover, one noteworthy advantage of ceragenins is that they are soluble in water, in contrast to many antimicrobial peptides (AMPs), which precipitate in aqueous solutions. This characteristic guarantees that ceragenins will keep their antibacterial effectiveness without aggregation-related problems. Thus, the solubility of ceragenins represents a significant advancement in the development of AMP-mimetic compounds, providing a more reliable and effective therapeutic option.

Our study's uniqueness consists of utilizing atomic force microscopy to record bacterial images in live settings and measure physical alterations in bacterial cells of *A. baumannii* after ceragenin addition. This methodology improves traditional microbiological testing by providing a more thorough understanding of how tested antibiotics carry out their bactericidal effects. Moreover, our data about the mechanical characteristics of treated cells provide an understanding of the biophysical impacts of ceragenins, which could aid in developing and enhancing these drugs for therapeutic use. Several AFM investigations have examined the impact of antibiotics, such as antimicrobial peptides, on the bacterial surface [32–34]. This research, conducted over time, has significantly enhanced our understanding of the mechanisms by which different antibiotics work. The study demonstrated that exposure to CSA-13 and CSA-131 at doses of 5 and 10 µg/mL caused damage to the outer membrane of *A. baumannii* cells, resulting in observable alterations in the topography of CR *A. baumannii* cells. This is confirmed by the results in [35], where the effect of selected ceragenins on the morphology of *Klebsiella pneumoniae* BAA-2473 cells was studied. Interaction between ceragenins and bacterial membrane affects membrane molecule rearrangement, leading to its disruption. Consistent with prior hypotheses that suggest AFM should be regarded as a precise instrument for assessing pathogens' susceptibility to antimicrobial agents, our investigations demonstrated the pathogens' membrane damage, which was further accompanied by intracellular content leakage or even complete cell lysis [36]. Our study showed that both CSA-13 and CSA-131 resulted in substantial decreases in cell stiffness. These results strongly suggest that ceragenins induce substantial alterations in the arrangement of membrane lipids, leading to modifications in the mechanical characteristics of the bacterial cell surface. CSA-13 exhibits a more significant decrease in stiffness, suggesting that it has the potential to produce a more noticeable disruption in the integrity of the membrane when compared to CSA-131. In addition, our data uncovered a distinct impact of ceragenin on the bacterial ability to adhere to surfaces. Administration of CSA-13 resulted in a 6.1% drop in adhesion forces, suggesting a decline in the capacity of bacterial cells to attach to surfaces. This could be advantageous in the prevention of biofilm development. Conversely, the addition of CSA-131 resulted in a 13.3% increase in adhesion forces, indicating a distinct stage of interaction with the bacterial membrane. The observed increase in adhesion forces may be attributed to the reorganization of membrane components, which enhance surface binding capabilities, in agreement with our previous observation that bacteria, upon ceragenins addition, undergo different stages, from increasing bacteria wall stiffness at the initial stage to its decrease later, when morphological manifestation of bacterial cell damage is visible [37]. These findings add to the increasing amount of evidence that supports the therapeutic potential of ceragenins against antibiotic-resistant bacteria, addressing an important requirement in contemporary healthcare.

A cellular adaptation known as bacterial biofilm development enables pathogens to endure in hostile environments, especially by fortifying their resistance to conventional antibiotic treatment [38]. The unique characteristics of ceragenins demonstrate their promise as a successful strategy for treating bacterial infections like CR *A. baumannii*. The demonstrated abilities of *A. baumannii* strains to form biofilms on both living and non-living surfaces, which shields them from antibacterial and antiseptic treatments as well as the host immune response, are particularly noteworthy. Undoubtedly, the capacity of *A. baumannii* to thrive as a biofilm can potentially enhance its endurance in the hospital setting, hence elevating the probability of nosocomial infections and outbreaks. Our research also highlights

CSA-13's remarkable antibiofilm action. At a low dosage of 5 µg/mL, CSA-13 completely eradicated carbapenem-resistant *A. baumannii* biofilms; greater concentrations of CSA-44 and CSA-131 (20 µg/mL) were required to obtain comparable outcomes (Figure 5). Comparing CSA-13 to other ceragenins, the data collected indicate that CSA-13 is particularly effective at preventing and disrupting biofilm formation at lower concentrations. Other works also present similar data with different strains of bacteria and fungi [39,40]. It is remarkable that CSA-13 was just as effective as colistin, which is well-known for having potent antibiofilm capabilities, at preventing the formation of biofilms.

The results proving the antibiofilm characteristics of ceragenins in medical applications fill a vital gap in the management of infections related to medical equipment. Especially remarkable is the ability of ceragenins to disrupt biofilm development on tracheostomy tubes [41]. Clinically, biofilm on medical devices is a major concern because of its importance in chronic infections and antibiotic resistance. *A. baumannii*'s potential for pathogenicity is dictated by multiple characteristics, including as putative virulence factors like outer membrane protein A (OmpA), lipopolysaccharides, K1 capsular polysaccharide, and external appendages like pili [42–44]. Moreover, *A. baumannii*'s capacity for virulence has been linked to plasmids carrying genes for organic peroxide resistance [45,46]. One of the most persistent and antibiotic-resistant infections is due in large part to its improved capacity to form biofilms and its ability to colonize and survive on a wide variety of biotic and abiotic surfaces [47]. Quorum sensing (QS) is critical for the production of biofilms in *A. baumannii*, which is a mechanism necessary for the survival, pathogenicity, and resistance to antibiotics of the bacteria [48–51]. The immune system and antibiotics are just two of the hostile environments that bacteria are protected from by biofilms. *A. baumannii*'s QS system uses signaling molecules such as acyl-homoserine lactones (AHLs) to coordinate the expression of genes involved in the creation and maintenance of biofilms [52]. One proposed mechanism by which ceragenins may exert their antibacterial and anti-adhesive properties is by disrupting quorum sensing signals. Ceragenins may potentially hinder the communication process mediated by AHL, impeding the coordinated behavior necessary for creating and maintaining biofilms. This interference might be caused by the direct binding of the substance to QS molecules or their receptors, inhibiting the pathways responsible for signal transduction. Consequently, ceragenins cause a decrease in the production of biofilms and an increase in the vulnerability of bacteria to environmental pressures and antimicrobial substances.

The Csu pili in *A. baumannii* play a crucial role in the production of biofilms on both abiotic surfaces, like medical equipment, and biotic surfaces, like epithelial cells [53]. The Csu pili also enhance virulence by facilitating bacterial adhesion, a critical process for colonization and infection [54]. The regulation of Csu pili expression is governed by a complex network that involves c-di-GMP signaling and certain regulatory proteins such as PdeB [55]. These proteins play a role in controlling the formation and activity of pili. Ceragenins might have the potential to interfere with the formation or operation of Csu pili, hence impeding the capacity of *A. baumannii* to attach to surfaces and create biofilms. This interruption could arise from various mechanisms: (i) direct interaction via binding of ceragenins directly to the pili or their subunits, preventing proper assembly or function; and (ii) interfering with the regulatory pathways controlling pili expression, such as the c-di-GMP signaling network or PdeB activity. Ceragenins may have the potential to impact these pathways, resulting in a decrease in the generation or effectiveness of pili. By affecting these pathways, ceragenins could reduce the production or functionality of pili, leading to diminished adhesion and biofilm formation.

Our findings indicate that CR *A. baumannii* was able to easily build biofilms on silicone tube segments, indicating the biomedical surfaces' vulnerability to bacterial colonization (Figure 6). On the other hand, ceragenin presence successfully eradicates biofilm, indicating the potential as a medical device protection agent. Our observation is in great agreement with previous reports. For example, Pollard et al. described the efficacy of CSA-13 in eliminating both Gram-positive and Gram-negative biofilms at concentrations comparable

to ciprofloxacin while still killing drug-resistant pathogens [56]. Moreover, ceragenins have been effectively used in fracture fixation plates and contact lenses to stop and eradicate *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms, demonstrating their adaptability in a range of medical settings [57]. The versatile characteristics of ceragenins, including strong antibacterial and antibiofilm properties, high stability in body fluids, and physical properties, make them valuable candidates for medical applications. Thin films containing CSA-131 may protect endotracheal tubes from microbial colonization, preventing infection and irritation linked to intubation, according to recent research by Hashemi et al. [58].

The potential, safe therapeutic application of ceragenins is indicated by the fact that the doses needed for bactericidal action against *A. baumannii* are within well-recognized biocompatibility ranges. Since the A549 cell line used in our study is a human lung cancer cell line, cytotoxicity with ceragenins may be higher than with primary cell lines because both AMPs and ceragenins are thought to be anticancer agents because they exhibit increased cytotoxic activity against transformed cells like cancer cells [59,60]. Cancer cells have a different membrane makeup than primary, non-transformed cells. As such, data on the cytotoxicity of ceragenins may not be entirely reliable when derived from experiments conducted on transformed cancer cells. Research utilizing primary cells might yield more accurate cytotoxicity measurements. However, these investigations using the A549 cell line reveal details regarding a minimum window of activity against bacteria that does not cause damage to eukaryotic cells. Particular consideration should be taken regarding CSA-13's anti-adhesive qualities. Ceragenin CSA-13 considerably reduced the adhesion of laboratory strain ATCC19606 and carbapenem-resistant *A. baumannii* (S02, S04, S06) to host cells, according to an adhesion assay using the A549 cell line. Bacterial adherence was inhibited concentration-dependently; the greatest effect was seen at 10 µg/mL, at which point bacterial adhesion was around 11% less than in the control. These results show how CSA-13 may be explored in developing new methods to treat carbapenem-resistant *A. baumannii* infections by preventing the microorganism from attaching to epithelial cells, an essential stage in the infection process.

4. Materials and Methods

4.1. Clinical Bacterial Isolates and Antimicrobial Compounds

The study utilized a laboratory strain of *A. baumannii* was purchased from American Type Culture Collection (ATCC 19606, USA) and 65 clinical strains of *A. baumannii* isolated from the bronchial lavage, sputum, throat swab, and swab from a tracheostomy wound that tested positive in conventional diagnostic microbiology laboratories. The isolates were cultured on agar plates and analyzed using the VITEK[®] 2 system (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Ceragenins, namely CSA-13, CSA-44, and CSA-131, were synthesized using the method reported previously [14]. Colistin (#C4461), ciprofloxacin (#17850), and meropenem (#PHR1772) from Sigma Aldrich (USA) were the conventional, control antibiotics used in this study. All agents were dissolved in sterile saline and stored at a temperature of 4 °C until the experiments were conducted. Sterile endotracheal tubes were sourced from Zarys company (Poland).

4.2. Mechanisms of Resistance of the Tested Clinical Strains of *A. baumannii*

Strains S01 (S-strain; 02-number 2), S02, S04, S05, S06 and S08, isolated from sputum, were identified as carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) strains were tested using a combination disc assay, following the guidelines outlined by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST; www.eucast.org) (accessed on 12 May 2023).

4.3. Antimicrobial Activity Assessment

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of ceragenins (CSA-13, CSA-44, and CSA-131) and conventional antibiotics (colistin, ciprofloxacin, and meropenem) were assessed against laboratory ($n = 1$) and clinical strains ($n = 65$) of *A. baumannii* and carbapenem-resistant *A. baumannii* in Muller-Hinton

broth using the microdilution method with concentrations of the drugs varied between 0.125 µg/mL and 256 µg/mL. The lowest concentration of ceragenins and antibiotics that, during an overnight culture, produced no discernible growth was known as the MIC. Each dilution series of the overnight MIC had samples quantitatively plated on agar to obtain the MBC values. At least 99.9% of the viable counts were reduced by the MBC, the lowest concentration of antimicrobial agents. In another series of tests, the killing assay method was used to investigate the capacity of treated carbapenem-resistant *A. baumannii* (S02, S04, S06) cells to form colonies after incubation with investigated substances at doses between 1 and 5 µg/mL. Following a 1 h incubation at 37 °C, the suspensions were diluted 10- to 1000-fold in PBS, the plates were placed on ice, and 10 µL aliquots were plated on MH agar to measure the CFUs. Cell survival was expressed upon overnight culture when compared to untreated controls (0 µg/mL).

4.4. Atomic Force Microscopy Measurements of *A. baumannii* Cells Subjected to Ceragenin Treatment

A. baumannii carbapenem-resistant strains (S02) grown on MacConkey agar were resuspended in PBS (OD₆₀₀: ~0.1), followed by incubation with 5 µg/mL and 10 µg/mL of CSA-13 and CSA-131 ceragenins. Next, 200 µL of bacterial samples was transferred onto the mica surface previously functionalized with Poly-L-lysine; –100 µL of 0.01% Poly-L-lysine solution (Sigma-Aldrich, #25988-63-0) was incubated with cut mica slices. The attachment of bacterial cells to the mica surface was achieved during a 0.5 h incubation. Images of bacterial cells and characterization of their mechanical properties were collected using a NanoWizard 4 BioScience atomic force microscope (AFM–JPK/Bruker, MA, USA) equipped with a liquid cell setup. Because of the lateral forces occurring during data collection, which may have caused cells to move across the surface, the contact mode scanning AFM was operated in QI mode (Bruker/JPK QI™ mode—Quantitative Imaging). Silicon nitride AFM cantilevers (Bruker, MSCT-A) had a nominal spring constant of 0.07 N/m and measured spring constant in the range of 0.067–0.099 N/m, using the thermal tune method. The bacterial cells were located using 20 × 20 µm maps; then, topography maps with a size of 3 µm × 3 µm were created, with a resolution of 128 pixels per line, in wet conditions. QI maps were used to determine bacteria surface stiffness (JPK Slope Mode) and adhesion forces between the cells and the AFM probe (JPK Adhesion Mode). The rigidity of bacteria cells was calculated based on force-indentation curves from QI maps. The slope of the force curves was recorded on mica, and bacterial surfaces were fitted using linear regression and used as a stiffness parameter (nN/µm) reflecting bacterial stiffness.

4.5. Activity against Biofilms

The effectiveness of ceragenins (CSA-13, CSA-44, and CSA-131) and conventional antibiotics (colistin, ciprofloxacin, and meropenem) to prevent biofilm formation was investigated by incubating carbapenem-resistant *A. baumannii* (S02, S04, S06) with varying doses (1–50 µg/mL) of the studied compounds for 72 h at 37 °C. An overnight pathogen culture was diluted to 10⁵ CFU/mL before the antimicrobial exposition. After the incubation period, the planktonic bacteria-containing growth media was removed, and the wells were gently washed three times with PBS. To stain the biofilm, resazurin at a final concentration of 200 µg/mL was utilized and left for further incubation for 1h. To ascertain the viability of biofilms, fluorometric analysis (λ = 520/590 nm) was employed.

4.6. Evaluation of Ceragenins' Antibiofilm Capabilities on Tracheostomy Tubes

Sterile culture tubes were utilized to place 50 mm segments of silicone tracheostomy tubes. Inoculation solutions containing 10⁶ CFU/mL of laboratory and carbapenem-resistant *A. baumannii* (S02, S04, S06) were prepared and used to inoculate the tracheostomy segments in a volume of 1.5 mL. CSA-13 and CSA-131 were then introduced at doses ranging from 0 to 20 µg/mL. After 24 h, the tracheostomy segments were removed, gently washed with sterile PBS, and sonicated for 15 min using a bath sonicator to detach the

bacteria adhered to the tubes' surface. Colonies were counted after the resultant solutions were serially diluted, plated on MH agar, and incubated for 24 h at 37 °C.

4.7. Cell Culture

Pneumocyte cell line A549, type II, obtained from a human lung carcinoma (LGC Standards, UK) was cultured in DMEM medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma Aldrich). The culture was maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. Every three to four days, A549 cells were routinely passaged. Before infection with laboratory and carbapenem-resistant *A. baumannii* (S02, S04, S06), A549 cells were cultured in DMEM devoid of FBS and antibiotics after being thoroughly cleaned three times in preheated phosphate-buffered saline (PBS).

4.8. Assessment of Ceragenin Cytotoxicity towards A549 Epithelial Cells Using MTT Assay

To evaluate the cytotoxic effects of the tested ceragenins (CSA-13, CSA-44, and CSA-131) on A549 epithelial cells, a methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was conducted. In detail, A549 cells were seeded onto 48-well plates at a density of 15–20 × 10³ cells per well. Subsequently, the cells were treated with varying concentrations of ceragenins for 24 h. Following the treatment period, the cells were gently washed with phosphate-buffered saline (PBS) to remove any residual ceragenins. Following the washing step, the viability of the treated cells was assessed using the MTT assay. A solution of MTT to reach a final concentration of 0.5 mg/mL was added to each well, and the plates were then incubated for an additional 4 h at standard cell culture conditions. After the completion of the incubation period, the formazan crystals formed by metabolically active cells were solubilized using an appropriate solvent. Subsequently, the spectrophotometric absorbance of the solubilized formazan was measured at 550 nm using a Varioskan Lux microplate reader. The absorbance values obtained were then used to quantify the relative cell viability compared to samples without ceragenins. All experiments were performed in triplicate to ensure the reliability of the results. Statistical analysis was conducted to assess the significance of any observed differences between treatment groups.

4.9. Adhesion Assay

To assess the adherence of bacteria to the lung epithelial cells, A549 cells were infected with 10⁸ CFU/mL of laboratory (ATCC19606) and carbapenem-resistant *A. baumannii* (S02, S04, S06) for two hours at 37 °C in 5% CO₂. After that, five washings with preheated PBS were performed on infected A549 cells, and 0.5% Triton X-100 was used to lyse them. The number of bacteria that attached to A549 cells was counted after diluted lysates were plated onto blood agar (Blood-Agar Columbia, Becton Dickinson Microbiology Systems, East Rutherford, NJ, USA) and incubated at 37 °C for 24 h.

4.10. Statistical Analysis

Collected data and differences were determined using the one-tailed Student's *t*-test. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. The results are the average of three measurements.

5. Conclusions

Ceragenins, by efficiently destroying bacterial membranes and preventing biofilm development, show great promise as therapeutic agents for treating *A. baumannii* infections, especially against carbapenem-resistant strains. Important new information on the biophysical effects of ceragenins on bacterial cells was obtained in this work by the use of atomic force microscopy, and adhesion studies demonstrated their capacity to stop bacterial attachment to host cells. These results highlight the value of adhesion and AFM research in our knowledge of and progress toward ceragenins as new antibacterial therapies.

Author Contributions: Conceptualization, M.K., U.W. and R.B.; methodology, M.K., U.W., T.D., P.D., M.L., E.P., K.S. and B.S.; software, M.K., U.W., E.P., B.D. and P.P.; formal analysis, M.K., U.W. and R.B.; investigation, M.K., U.W., T.D., M.L., E.P. and R.B.; resources, P.P., T.D., B.D., P.B.S. and R.B.; data curation, M.K. and U.W.; writing—original draft preparation, M.K., U.W. and P.D.; writing—review and editing, P.B.S., B.D., T.D. and R.B.; visualization, M.K., U.W., E.P. and P.D.; supervision, R.B.; project administration, M.K. and R.B.; funding acquisition, U.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants from the Medical University of Białystok: number B.sub.24.414 (UW). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: The procedures followed were in accordance with the ethical standards of our medical college ethical committee and with the Helsinki Declaration. Bacterial samples isolated from patients were approved by the Medical University of Białystok Ethics Committee. The reference number is APK.002.406.2023 and was approved on 19 October 2023.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article; further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Conflicts of Interest: PBS and RB are paid consultants to N8 Medical, which focuses on commercialization of medical devices that incorporate ceragenins.

References

- Luo, Y.; Song, Y. Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hashemi, M.M.; Rovig, J.; Holden, B.S.; Taylor, M.F.; Weber, S.; Wilson, J.; Hilton, B.; Zaugg, A.L.; Ellis, S.W.; Yost, C.D.; et al. Ceragenins are active against drug-resistant *Candida auris* clinical isolates in planktonic and biofilm forms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1537–1545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schmidt, E.J.; Boswell, J.S.; Walsh, J.P.; Schellenberg, M.M.; Winter, T.W.; Li, C.; Allman, G.W.; Savage, P.B. Activities of cholic acid-derived antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *47*, 671–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Karasinski, M.; Wnorowska, U.; Durnas, B.; Krol, G.; Daniluk, T.; Sklodowski, K.; Gluszek, K.; Piktel, E.; Okla, S.; Bucki, R. Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections. *Pathogens* **2023**, *12*, 1346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sklodowski, K.; Chmielewska, S.J.; Depciuch, J.; Deptula, P.; Piktel, E.; Daniluk, T.; Zakrzewska, M.; Czarnowski, M.; Ciesluk, M.; Durnas, B.; et al. Ceragenin-Coated Non-Spherical Gold Nanoparticles as Novel Candidacidal Agents. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kzakova, O.; Giniyatullina, G.; Babkov, D.; Wimmer, Z. From Marine Metabolites to the Drugs of the Future: Squalamine, Trodusquemine, Their Steroid and Triterpene Analogues. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Paprocka, P.; Mankowska, A.; Sklodowski, K.; Krol, G.; Wollny, T.; Lesiak, A.; Gluszek, K.; Savage, P.B.; Durnas, B.; Bucki, R. Bactericidal Activity of Ceragenin in Combination with Ceftazidime, Levofloxacin, Co-Trimoxazole, and Colistin against the Opportunistic Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathogens* **2022**, *11*, 621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bozkurt-Guzel, C.; Inci, G.; Oyardi, O.; Savage, P.B. Synergistic Activity of Ceragenins Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains in Both Checkerboard and Dynamic Time-Kill Assays. *Curr. Microbiol.* **2020**, *77*, 1419–1428. [[CrossRef](#)]
- Hashemi, M.M.; Rovig, J.; Weber, S.; Hilton, B.; Forouzan, M.M.; Savage, P.B. Susceptibility of Colistin-Resistant, Gram-Negative Bacteria to Antimicrobial Peptides and Ceragenins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pollard, J.E.; Snarr, J.; Chaudhary, V.; Jennings, J.D.; Shaw, H.; Christiansen, B.; Wright, J.; Jia, W.; Bishop, R.E.; Savage, P.B. In vitro evaluation of the potential for resistance development to ceragenin CSA-13. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2665–2672. [[CrossRef](#)]
- Ahuatzin-Flores, O.E.; Torres, E.; Chávez-Bravo, E. *Acinetobacter baumannii*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Pathogen in New Habitats: A Systematic Review. *Microorganisms* **2024**, *12*, 644. [[CrossRef](#)]
- Bansal, K.; Saroha, T.; Patil, P.P.; Kumar, S.; Kumar, S.; Singhal, L.; Gautam, V.; Patil, P.B. Evolutionary trends of carbapenem-resistant and susceptible *Acinetobacter baumannii* isolates in a major tertiary care setting from North India. *Infect. Genet. Evol.* **2024**, *117*, 105542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pei, Y.; Huang, Y.; Pan, X.; Yao, Z.; Chen, C.; Zhong, A.; Xing, Y.; Qian, B.; Minhua, S.; Zhou, T. Nomogram for predicting 90-day mortality in patients with *Acinetobacter baumannii*-caused hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia in the respiratory intensive care unit. *J. Int. Med. Res.* **2023**, *51*, 03000605231161481. [[CrossRef](#)]
- Alnimr, A. Antimicrobial Resistance in Ventilator-Associated Pneumonia: Predictive Microbiology and Evidence-Based Therapy. *Infect. Dis. Ther.* **2023**, *12*, 1527–1552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Miron, M.; Blaj, M.; Ristescu, A.I.; Iosep, G.; Avădanei, A.-N.; Iosep, D.-G.; Crisan-Dabija, R.; Ciocan, A.; Perțea, M.; Manciu, C.D.; et al. Hospital-Acquired Pneumonia and Ventilator-Associated Pneumonia: A Literature Review. *Microorganisms* **2024**, *12*, 213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Shadan, A.; Pathak, A.; Ma, Y.; Pathania, R.; Singh, R.P. Deciphering the virulence factors, regulation, and immune response to *Acinetobacter baumannii* infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2023**, *13*, 1053968. [[CrossRef](#)]
17. Chandrasekhar, N. Hospital-Acquired Urinary Tract Infections. In *Advances and Challenges in Urine Laboratory Analysis*; Tomasz, J., Agnieszka, D., Eds.; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2023; p. Ch. 2.
18. Papadopoulou, M.; Deliolanis, I.; Polemis, M.; Vatopoulos, A.; Psychogiou, M.; Giakkoupi, P. Characteristics of the Genetic Spread of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Greek Hospital. *Genes* **2024**, *15*, 458. [[CrossRef](#)]
19. Choi, C.H.; Lee, E.Y.; Lee, Y.C.; Park, T.I.; Kim, H.J.; Hyun, S.H.; Kim, S.A.; Lee, S.K.; Lee, J.C. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 1127–1138. [[CrossRef](#)]
20. Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327. [[CrossRef](#)]
21. Bartal, C.; Rolston, K.V.I.; Neshar, L. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Colonization, Infection and Current Treatment Options. *Infect. Dis. Ther.* **2022**, *11*, 683–694. [[CrossRef](#)]
22. Shields, R.K.; Paterson, D.L.; Tamma, P.D. Navigating Available Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus Complex Infections. *Clin. Infect. Dis.* **2023**, *76*, S179–S193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rafailidis, P.; Panagopoulos, P.; Koutserimpas, C.; Samonis, G. Current Therapeutic Approaches for Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. *Antibiotics* **2024**, *13*, 261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chen, H.; Liu, Q.; Chen, Z.; Li, C. Efficacy of sulbactam for the treatment of *Acinetobacter baumannii* complex infection: A systematic review and meta-analysis. *J. Infect. Chemother.* **2017**, *23*, 278–285. [[CrossRef](#)]
25. Broncano-Lavado, A.; Santamaría-Corral, G.; Esteban, J.; García-Quintanilla, M. Advances in bacteriophage therapy against relevant multidrug-resistant pathogens. *Antibiotics* **2021**, *10*, 672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Choi, J.; Jang, A.; Yoon, Y.K.; Kim, Y. Development of novel peptides for the antimicrobial combination therapy against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Microbiol, I.; Saikia, S.; Chetia, P. Antibiotics: From Mechanism of Action to Resistance and Beyond. *Indian. J. Microbiol.* **2024**. [[CrossRef](#)]
28. Mancuso, G.; De Gaetano, S.; Midiri, A.; Zummo, S.; Biondo, C. The Challenge of Overcoming Antibiotic Resistance in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria: “Attack on Titan”. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1912. [[CrossRef](#)]
29. Weinberg, S.; Villedieu, A.; Bagdasarian, N.; Karah, N.; Teare, L.; Elamin, W. Control and management of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: A review of the evidence and proposal of novel approaches. *Infect. Prev. Pract.* **2020**, *2*, 100077. [[CrossRef](#)]
30. Ageitos, J.; Sánchez-Pérez, A.; Calo-Mata, P.; Villa, T. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *133*, 117–138. [[CrossRef](#)]
31. Vila-Farrés, X.; Callarisa, A.E.; Gu, X.; Savage, P.B.; Giralt, E.; Vila, J. CSA-131, a ceragenin active against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2015**, *46*, 568–571. [[CrossRef](#)]
32. Paiva, T.O.; Viljoen, A.; Dufrière, Y.F. Seeing the unseen: High-resolution AFM imaging captures antibiotic action in bacterial membranes. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 6196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Nasompag, S.; Siritongsuk, P.; Thammawithan, S.; Srichaiyapol, O.; Prangkio, P.; Camesano, T.A.; Sinthuvanich, C.; Patramanon, R. AFM Study of Nanoscale Membrane Perturbation Induced by Antimicrobial Lipopeptide C14 KYR. *Membranes* **2021**, *11*, 495. [[CrossRef](#)]
34. Grzeszczuk, Z.; Rosillo, A.; Owens, Ó.; Bhattacharjee, S. Atomic Force Microscopy (AFM) As a Surface Mapping Tool in Microorganisms Resistant Toward Antimicrobials: A Mini-Review. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 517165. [[CrossRef](#)]
35. Chmielewska, S.J.; Skłodowski, K.; Piktel, E.; Suprewicz, L.; Fiedoruk, K.; Daniluk, T.; Wolak, P.; Savage, P.B.; Bucki, R. NDM-1 Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae are Highly Susceptible to Ceragenins CSA-13, CSA-44, and CSA-131. *Infect. Drug Resist.* **2020**, *13*, 3277–3294. [[CrossRef](#)]
36. Bucki, R.; Niemirowicz-Laskowska, K.; Deptuła, P.; Wilczewska, A.Z.; Misiak, P.; Durnaś, B.; Fiedoruk, K.; Piktel, E.; Mystkowska, J.; Janmey, P.A. Susceptibility of microbial cells to the modified PIP 2-binding sequence of gelsolin anchored on the surface of magnetic nanoparticles. *J. Nanobiotechnol.* **2019**, *17*, 81. [[CrossRef](#)]
37. Lekka, M.; Pogoda, K.; Gostek, J.; Klymenko, O.; Prauzner-Bechcicki, S.; Wiltowska-Zuber, J.; Jaczewska, J.; Lekki, J.; Stachura, Z. Cancer cell recognition–mechanical phenotype. *Micron* **2012**, *43*, 1259–1266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lee, H.W.; Koh, Y.M.; Kim, J.; Lee, J.C.; Lee, Y.C.; Seol, S.Y.; Cho, D.T.; Kim, J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14*, 49–54. [[CrossRef](#)]
39. Wnorowska, U.; Lysik, D.; Piktel, E.; Zakrzewska, M.; Okła, S.; Lesiak, A.; Spalek, J.; Mystkowska, J.; Savage, P.B.; Janmey, P.; et al. Ceragenin-mediated disruption of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS ONE* **2024**, *19*, e0298112. [[CrossRef](#)]

40. Latorre, M.C.; Pérez-Granda, M.J.; Savage, P.B.; Alonso, B.; Martín-Rabadán, P.; Samaniego, R.; Bouza, E.; Muñoz, P.; Guembe, M. Endotracheal tubes coated with a broad-spectrum antibacterial ceragenin reduce bacterial biofilm in an in vitro bench top model. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76*, 1168–1173. [[CrossRef](#)]
41. Spatek, J.; Daniluk, T.; Godlewski, A.; Deptuła, P.; Wnorowska, U.; Ziembicka, D.; Cieśluk, M.; Fiedoruk, K.; Ciborowski, M.; Kretowski, A. Assessment of Ceragenins in prevention of damage to voice prostheses caused by *Candida* biofilm formation. *Pathogens* **2021**, *10*, 1371. [[CrossRef](#)]
42. Choi, C.H.; Lee, J.S.; Lee, Y.C.; Park, T.I.; Lee, J.C. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 216. [[CrossRef](#)]
43. Harding, C.M.; Hennon, S.W.; Feldman, M.F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 91–102. [[CrossRef](#)]
44. Weber, B.S.; Harding, C.M.; Feldman, M.F. Pathogenic *Acinetobacter*: From the Cell Surface to Infinity and Beyond. *J. Bacteriol.* **2015**, *198*, 880–887. [[CrossRef](#)]
45. Giannouli, M.; Antunes, L.C.; Marchetti, V.; Triassi, M.; Visca, P.; Zarrilli, R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect. Dis.* **2013**, *13*, 282. [[CrossRef](#)]
46. Bonomo, R.A.; Szabo, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *43*, S49–S56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Khazaal, S.S.; Al-Saryi, N.; Ibrahim, S.A. Immunomodulation by *Acinetobacter baumannii* of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia. *Meta Gene* **2020**, *24*, 100672. [[CrossRef](#)]
48. Wang, M.; Lian, Y.; Wang, Y.; Zhu, L. The role and mechanism of quorum sensing on environmental antimicrobial resistance. *Environ. Pollut.* **2023**, *322*, 121238. [[CrossRef](#)]
49. Roy, S.; Chowdhury, G.; Mukhopadhyay, A.K.; Dutta, S.; Basu, S. Convergence of Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii* Infection. *Front. Med.* **2022**, *9*, 793615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Zhong, S.; He, S. Quorum Sensing Inhibition or Quenching in *Acinetobacter baumannii*: The Novel Therapeutic Strategies for New Drug Development. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 558003. [[CrossRef](#)]
51. Seleem, N.M.; Abd El Latif, H.K.; Shaldam, M.A.; El-Ganiny, A. Drugs with new lease of life as quorum sensing inhibitors: For combating MDR *Acinetobacter baumannii* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *39*, 1687–1702. [[CrossRef](#)]
52. Cui, B.; Guo, Q.; Li, X.; Song, S.; Wang, M.; Wang, G.; Yan, A.; Zhou, J.; Deng, Y. A response regulator controls *Acinetobacter baumannii* virulence by acting as an indole receptor. *PNAS Nexus* **2023**, *2*, pgad274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Gedefie, A.; Demsis, W.; Ashagrie, M.; Kassa, Y.; Tesfaye, M.; Tilahun, M.; Bisetegn, H.; Sahle, Z. *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review. *Infect. Drug Resist.* **2021**, *14*, 3711–3719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ahmad, I.; Nadeem, A.; Mushtaq, F.; Zlatkov, N.; Shahzad, M.; Zavalov, A.V.; Wai, S.N.; Uhlin, B.E. *Csu* pili dependent biofilm formation and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2023**, *9*, 101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Upmanyu, K.; Haq, Q.M.R.; Singh, R. Factors mediating *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: Opportunities for developing therapeutics. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2022**, *3*, 100131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pollard, J.; Wright, J.; Feng, Y.; Geng, D.; Genberg, C.; Savage, P.B. Activities of ceragenin CSA-13 against established biofilms in an in vitro model of catheter decolonization. *Anti-Infect. Agents Med. Chem. Former. Curr. Med. Chem. Anti-Infect. Agents* **2009**, *8*, 290–294. [[CrossRef](#)]
57. Williams, D.L.; Sinclair, K.D.; Jeyapalina, S.; Bloebaum, R.D. Characterization of a novel active release coating to prevent biofilm implant-related infections. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2013**, *101*, 1078–1089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Hashemi, M.M.; Rovig, J.; Bateman, J.; Holden, B.S.; Modelzelewski, T.; Gueorguieva, I.; von Dyck, M.; Bracken, R.; Genberg, C.; Deng, S. Preclinical testing of a broad-spectrum antimicrobial endotracheal tube coated with an innate immune synthetic mimic. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 143–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Oyardi, Ö.; Savage, P.B.; Erturan, Z.; Bozkurt-Guzel, C. In vitro assessment of CSA-131 and CSA-131 poloxamer form for the treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* infections in cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76*, 443–450. [[CrossRef](#)]
60. Wnorowska, U.; Fiedoruk, K.; Piktel, E.; Prasad, S.V.; Sulik, M.; Janion, M.; Daniluk, T.; Savage, P.B.; Bucki, R. Nanoantibiotics containing membrane-active human cathelicidin LL-37 or synthetic ceragenins attached to the surface of magnetic nanoparticles as novel and innovative therapeutic tools: Current status and potential future applications. *J. Nanobiotechnol.* **2020**, *18*, 3. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



8.2. Praca przeglądowa

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Durnaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Piktel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert: *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. *Pathogens* 2023, 12, 1346. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111346>.

IF = 3.3, MNiSW = 100.00

Review

Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections

Maciej Karasiński ¹ , Urszula Wnorowska ¹, Bonita Durnaś ², Grzegorz Król ², Tamara Daniluk ¹, Karol Skłodowski ¹, Katarzyna Głuszek ², Ewelina Piktel ³, Sławomir Okła ⁴ and Robert Bucki ^{1,*} 

- ¹ Department of Medical Microbiology and Nanobiomedical Engineering, Medical University of Białystok, Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok, Poland; maciek.karasinski@gmail.com (M.K.); urszula.wnorowska@umb.edu.pl (U.W.); tamara.daniluk@umb.edu.pl (T.D.); karol.sklodowsky@gmail.com (K.S.)
- ² Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, Collegium Medicum, Jan Kochanowski University in Kielce, IX Wieków Kielce 19A, 25-317 Kielce, Poland; bonita.durnas@onkol.kielce.pl (B.D.); g.krol@op.pl (G.K.); katarzyna.gluszek@ujk.edu.pl (K.G.)
- ³ Independent Laboratory of Nanomedicine, Medical University of Białystok, Mickiewicza 2B, 15-222 Białystok, Poland; ewelina.piktel@umb.edu.pl
- ⁴ Holy Cross Oncology Center of Kielce, Artwińskiego 3, 25-734 Kielce, Poland; slawomir.okla@gmail.com
- * Correspondence: buckirobert@gmail.com

Abstract: The growing number of infections caused by multidrug-resistant bacterial strains, limited treatment options, multi-species infections, high toxicity of the antibiotics used, and an increase in treatment costs are major challenges for modern medicine. To remedy this, scientists are looking for new antibiotics and treatment methods that will effectively eradicate bacteria while continually developing different resistance mechanisms. Ceragenins are a new group of antimicrobial agents synthesized based on molecular patterns that define the mechanism of antibacterial action of natural antibacterial peptides and steroid-polyamine conjugates such as squalamine. Since ceragenins have a broad spectrum of antimicrobial activity, with little recorded ability of bacteria to develop a resistance mechanism that can bridge their mechanism of action, there are high hopes that this group of molecules can give rise to a new family of drugs effective against bacteria resistant to currently used antibiotics. Experimental data suggests that core-shell nanosystems, in which ceragenins are presented to bacterial cells on metallic nanoparticles, may increase their antimicrobial potential and reduce their toxicity. However, studies should be conducted, among others, to assess potential long-term cytotoxicity and in vivo studies to confirm their activity and stability in animal models. Here, we summarized the current knowledge on ceragenins and ceragenin-containing nanoantibiotics as potential new tools against emerging Gram-negative rods associated with nosocomial infections.

Keywords: healthcare-associated infections; ceragenins; nanosystems; nanoantibiotics; multidrug-resistance Gram-negative bacteria



Citation: Karasiński, M.; Wnorowska, U.; Durnaś, B.; Król, G.; Daniluk, T.; Skłodowski, K.; Głuszek, K.; Piktel, E.; Okła, S.; Bucki, R. Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections. *Pathogens* **2023**, *12*, 1346. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111346>

Academic Editor: Maria Antonia De Francesco

Received: 5 October 2023

Revised: 30 October 2023

Accepted: 9 November 2023

Published: 13 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Nosocomial infections, also known as healthcare-associated infections (HAIs), have emerged as a significant issue, posing a severe threat to patient lives and a challenge to healthcare systems worldwide. HAIs appear no earlier than 48 h following admission to a hospital, although symptoms can also occur subsequent to a patient's release [1]. According to the World Health Organization [2], the incidence of these occurrences is approximately 7% in underdeveloped countries and 10% in industrialized nations. In the European context, it has been reported that around 3.2 million people are impacted by HAI on an annual basis [3]. The precise global mortality rate associated with healthcare-associated infections remains uncertain; nevertheless, many studies indicate a 30-day mortality rate

of approximately 10% among patients who have contracted HAI [4,5]. The incidence of excess mortality resulting from HAI appears to be more pronounced among patients who are critically ill, even when considering admission prognostic variables and severity scores. In the USA, in the context of acute care hospitals, it has been estimated that the annual expenses associated with the five primary forms of HAI amount to around \$9.8 billion, alone among the adult inpatient populations [6]. There are a number of HAI, but among the most common are central line-associated bloodstream infections (CLABSI), catheter-associated urinary tract infections (CAUTI), skin and soft tissue infections (SSTI), surgical site infections (SSI), ventilator-associated pneumonia (VAP), hospital-acquired pneumonia (HAP), and *Clostridioides difficile* infection (CDI), with bacteria causing about 90% of HAI [7] (Table 1).

Table 1. Risk factors and etiological agents of health care-associated infections. The table presented is derived mainly from information extracted from the following publication [7].

Type of Nosocomial Infections	Pathogens	Risk Factors	References
Central Line-Associated Blood Stream Infection (CLABSI)	Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Escherichia coli</i>	Chronic illness, neutropenia, malnutrition, parenteral nutrition, extremes of ages, and bone marrow transplantations, prolonged hospitalization before catheterization, prolonged time of catheterization, multi-lumen CVC, type of catheter material, multiple CVC, urgent insertion, and lack of sterile barriers or breaks in the aseptic technique	[8–12]
Catheter-Associated Urinary Tract Infection (CAUTI)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i> spp., and <i>Candida</i> spp.	Duration of catheterization, female sex, paraplegia, cerebrovascular disease, older age, diabetes mellitus, history of UTI in the preceding year, and recent antibiotic use within 90 days	[8,10,12–15]
Skin and Soft Tissue Infection (SSI)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Enterococcus</i> spp.	Duration of surgery, wound class, hypothermia and hypovolemia during surgery, hypoxemia, the urgency of surgery, more than one intervention/surgery, necessity for blood transfusion, and the type of prosthesis implanted, wound class, and duration of operation due to the time that the tissue is exposed to the environment, leading to an increased chance of contamination, immunosuppression, tobacco use, obesity, hyperglycemia, malnutrition, joint disease, and increasing age	[8,10,12,13,16,17]
Hospital-acquired pneumonia (HAP) and ventilator-associated pneumonia (VAP)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , and <i>Staphylococcus aureus</i>	Prior IV antibiotic use within the last 90 days, need for ventilatory support, septic shock at the time of VAP, acute respiratory distress syndrome preceding VAP, more than five days of hospitalization before VAP onset, and need for acute renal replacement therapy	[18–23]
<i>Clostridioides difficile</i> Infection (CDI)	<i>Clostridioides difficile</i>	Antibiotic use and environmental contamination, both of which are modifiable risk factors. Other frequently seen risk factors include increasing age, hospitalization, multiple comorbidities, the use of gastric acid-suppressing medications, and immunosuppression	[8,24,25]

An alarming effect of HAI is the emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria, also known as "superbugs." In healthcare contexts, the misuse and overuse of antibiotics contribute to the emergence of resistance, rendering common treatments ineffective and complicating infection management. Gram-negative bacteria, including those belonging to the *Enterobacterales* order, and non-glucose-fermenting bacteria, such as *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, stand out as two of the most dangerous pathogens that cause HAIs. Due to high bacterial plasticity, bacteria have adapted to an environment rich in overused/misused antibiotics, resulting in Gram-negative bacteria infections in hospitalized patients that are incurable with conventional antibiotics and pandemic-like [26,27].

The limitations and challenges associated with HAIs encompass several key aspects, including antibiotic resistance, biofilm formation, diagnostic difficulties, treatment complexities, and the importance of preventive measures. One notable instance is the occurrence of biofilm formation on medical devices, which poses challenges to effectively eradicating bacteria. Consequently, this issue contributes to increased expenses related to longer hospitalization, surgical procedures, and the protracted use of antimicrobial treatments. It is of utmost importance for healthcare practitioners and academics to acknowledge and tackle the limits and obstacles that are inherent in the context of HAIs. The effective mitigation of these illnesses necessitates a comprehensive approach that encompasses innovative therapeutic methodologies, stringent infection control measures, and a concerted emphasis on limiting the dissemination of pathogens inside healthcare environments. The comprehension and alleviation of these challenges will ultimately result in enhanced patient outcomes and a decrease in the prevalence of HAIs.

The purpose of this review is to shed light on the alarming prevalence of HAIs, with a particular emphasis on the worrisome emergence of Gram-negative rods as a formidable foe within healthcare facilities. By analyzing the epidemiology, underlying mechanisms, and clinical implications, this review aims to contribute to the collective understanding of this important issue and to offer insights into the potential of a new therapeutic option, ceragenins, in the context of their use in the form of core-shell nanosystems.

2. HAIs Caused by Multidrug-Resistant Gram-Negative Rods: Where We Are and Where We Could Go with New Treatment Strategies

According to the commissioned report by the UK Government about antimicrobial resistance, it has been posited that by the year 2050, antimicrobial resistance (AMR) has the potential to result in the loss of around 10 million lives annually [28,29]. Despite criticism of these forecasts, the World Health Organization (WHO) and several other societies and researchers agree that antimicrobial resistance (AMR) is a serious issue that requires a global action plan [30].

The resistance to antibiotics can be categorized as either innate, adaptive, or acquired by the organism [3]. Certain bacteria possess inherent resistance to specific antibiotics as a result of their unique cell wall composition, the functionality of efflux pumps, or the presence of porins [31]. Adaptive and acquired mechanisms may include (i) reduced drug penetration into the pathogen's cell, (ii) drug removal from the bacterial cell, (iii) modification of drug targets through mutation selection, or (iv) rendering drugs inactive through enzymatic means [31]. The innate resistance means that all strains belonging to the same species exhibit insensitivity to a specific antibiotic. In contrast, acquired resistance occurs when certain strains within a given species develop resistance to an antibiotic that they were previously susceptible to. Mechanisms encompass two main processes: the occurrence of mutations in preexisting genes, such as those found in intracellular targets [32] or core metabolic genes [33], and the acquisition of novel antibiotic resistance genes through horizontal gene transfer (HGT) [31]. The latter facilitates the transmission of antimicrobial resistance genes within and between species, leading to the emergence of a pandemic of antimicrobial resistance [34,35]. Whatever the reason, antibiotic resistance already poses a severe threat to human health by making it more difficult to effectively treat infections [4]. Multidrug-resistant pathogens are causally linked to significant morbidity and death rates

in HAIs owing to their acquired resistance to a wide range of medicines, including critical antibiotics like carbapenems and colistin [36]. Within this group of pathogens, approximately 16% to 20% exhibit multidrug-resistant (MDR) phenotypes. These phenotypes include methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE), cephalosporin-resistant *K. pneumoniae*, *E. coli*, and *Enterobacter* spp. as well as Gram-negative rods (*K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa*, and *A. baumannii*) resistant to most β -lactam antibiotics; even carbapenems [37–39].

The global rise in drug-resistant bacterial infections has led to a growing demand for novel antibacterial therapies [40]. This issue has garnered significant global attention, resulting in various financing, regulatory, and legislative efforts aimed at revitalizing research and development in the field of antibacterial treatments. The 2022 data reveals a positive trend with respect to the augmented quantity of early-stage clinical candidates as compared to 2019. However, it is disheartening to note that the number of initial therapeutic approvals between 2020 and 2022 remained notably deficient. The monitoring of the transition of Phase-I and -II candidates into Phase-III and subsequent stages in the coming years will be of great importance [41]. Additionally, there was an increased prevalence of newly developed antibacterial pharmacophores in the initial stages of clinical trials. Out of the 26 candidates in phase I, a minimum of 18 were specifically designed to address infections caused by Gram-negative bacteria [42]. Plazomicin, eravacycline, temocillin, cefiderocol, ceftazidime/avibactam, ceftolozane/tazobactam, imipenem/relebactam, and meropenem/vaborbactam are among the antibiotics with significant efficacy against Gram-negative bacteria newly approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medical Agency (EMA) [43]. The practice of combination therapy has become increasingly prevalent as a means to augment the effectiveness of current antibiotics and surmount resistance mechanisms. Recent research has investigated the efficacy of combining colistin with novel drugs or two antibiotics with distinct modes of action, revealing enhanced clinical outcomes in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections [44,45]. Employing bacteriophage therapy has resurfaced as a promising approach for addressing multidrug-resistant (MDR) Gram-negative infections. Current research focuses on isolating and characterizing bacteriophages that target specific bacteria strains, providing a personalized therapeutic approach [46]. Immunotherapies have been created, such as monoclonal antibodies that specifically target outer membrane proteins and virulence factors of multidrug-resistant Gram-negative bacteria. The antibodies have the ability to augment the immune response of the host and counteract the harmful effects of bacterial toxins. Additionally, ongoing research is focused on the creation of vaccinations that specifically target multidrug-resistant Gram-negative bacteria, with the goal of preventing infections and decreasing reliance on antibiotics. Furthermore, there has been a notable rise in the quantity of “nontraditional antimicrobials” [47,48] that are currently undergoing active evaluation in clinical studies [48]. Non-conventional antibacterial agents encompass a range of entities, including small molecules, monoclonal antibodies (mAbs), proteins, and live biotherapeutics such as bacteria and bacteriophages [42]. These agents primarily exert their effects on bacterial growth or virulence indirectly, employing diverse mechanisms such as toxin binding, reduction of cell adherence, inhibition of antivirulence targets, and modification of drug resistance [48]. Despite the positive developments in phase -I and -II antibacterial drug candidates, the proposed strategies to tackle late-stage pipeline challenges, and the current portfolio of licensed antibacterial agents, when combined with conventional medicines in late-stage development, antibacterial drug discovery and development must maintain a sense of urgency.

Antimicrobial peptides (AMPs) present a potentially compelling and attractive means for antibiotics. The AMP Colistin (Polymyxin E), derived from *Paenibacillus polymyxa* var. *colistinus*, is currently employed as an initial treatment option for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDR-AB) [49]. However, its usage is constrained due to the adverse effects of nephrotoxicity and the escalating prevalence of resistance [50]. Previous studies have documented the efficacy of several peptides (such as LL-37, a human antimicrobial

peptide, and WAM-1, a marsupial AMP) against some pathogens in animal models of infection [51]. The findings revealed that both peptides, LL-37 and WARM-1, exhibited the ability to suppress biofilm formation in all clinical isolates at certain concentrations. Additionally, WAM-1 was seen to disperse mature biofilm in the majority of isolates [51]. While the antibacterial properties of LL-37 are weakened when exposed to human serum, this phenomenon does not occur in the case of WAM-1. There is a requirement for further new drugs that can effectively target unmet therapeutic requirements. These molecules must evade established pathways of medication resistance and align with contemporary reimbursement procedures.

3. Physicochemical Properties of Ceragenins and Ceragenin-Based Nanosystems That Defined Their Antibacterial Properties and Specified Bacterial Targeting

Ceragenins, small-molecule mimics of endogenous antimicrobial peptides (AMPs), naturally produced by the immune system in all mammals, have attracted considerable interest due to their potent antimicrobial properties [52,53]. The first discovered natural molecule shearing characteristic of synthetic ceragenins is squalamine, which is naturally present in the stomach of *Squalus acanthias* sharks. In the preliminary phases of the investigation involving ceragenins, scientists created a variety of novel agents that increase the susceptibility of Gram-negative bacteria. This was accomplished by considering the bactericidal properties of polymyxin B and its metabolites. They synthesized numerous cholic acid derivatives, including derivatives with amine and guanidine functionality. In addition to possessing antibacterial properties against Gram-negative and Gram-positive bacteria, the researchers discovered that these compounds inhibited the biofilm formation of bacteria. The aforementioned class of cholic acid derivatives became known as cationic steroid antimicrobials (CSAs) or ceragenins over time (Figure 1).

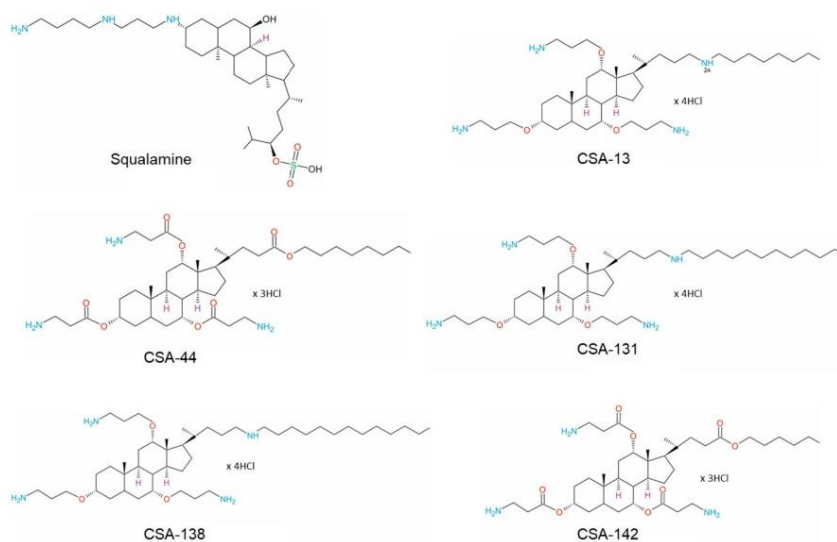


Figure 1. Structural formulae of squalamine and ceragenins CSA-13, CSA-44, CSA-131, CSA-138, and CSA-142.

Simultaneously, it has been observed that CSAs exhibit a low level of toxicity, providing evidence to support the potential clinical application of these compounds [54]. Numerous generations of CSAs have been synthesized and subjected to comprehensive evaluation. The compounds indicated as CSA-1 to CSA-50 have been categorized as constituents of the first generation of CSAs. While the remaining compounds synthesized so far are part of the second generation of CSAs [55].

The cationic nature of ceragenins is considered to be one of their defining characteristics, which enables them to engage in electrostatic interactions with microbial membrane components that possess a negative charge [56]. The positive charge of these entities arises from the inclusion of amino groups in their structural composition. This interaction promotes the adsorption of ceragenins onto the membranes and subsequently leads to their membrane insertion, which leads to the rupture of the membranes (Figure 2).

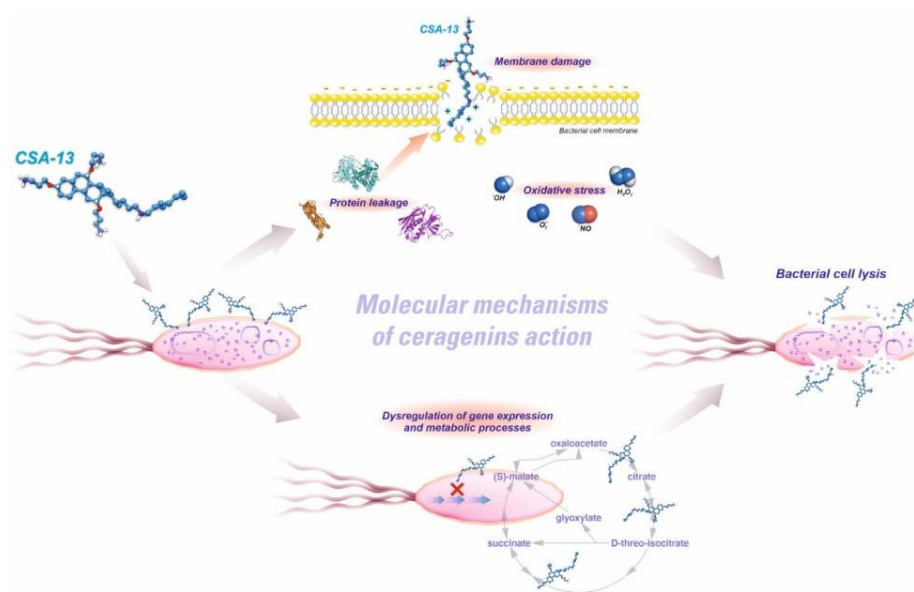


Figure 2. Molecular mechanisms of ceragenin action.

The membrane-disrupting activity of ceragenins is dependent on the presence of hydrophobic parts, which integrate into the lipid bilayer of microbial membranes. In contrast to traditional antibiotics, which selectively act on specific cellular processes or proteins, ceragenins possess a membrane-disrupting effect that poses a significant obstacle for bacteria to acquire resistance [57]. This is particularly relevant when addressing multidrug-resistant bacteria that have undergone the development of numerous resistance mechanisms. A recent study presented the hypothesis that ceragenins have a distinctive mode of action, and scientists proposed a model in which ceragenins cross the outer layers of the bacterial envelope and target, more specifically, the inner membrane [58]. Moreover, the publication presented by Dumaš et al. [59] shows that ceragenins, due to their structural similarity to natural antimicrobial peptides, also have a similar mechanism of action, specifically to induce damage and impairment of the plasma membrane, leading to fungal cell malfunction. Furthermore, the utilization of scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) has revealed that CSAs exhibit a propensity for interacting with plasma membranes, as evidenced by the presence of distorted cell surfaces and significant alterations in the morphology of *Candida* cells. Furthermore, another study has demonstrated that the primary mode of fungicidal activity exhibited by ceragenin is attributed to the generation of reactive oxygen species (ROS) [60]. This process results in the deterioration of the fungal membrane and the subsequent release of internal components, finally leading to the demise of the fungal organism. In addition, the amphiphilicity of ceragenins is achieved through precise engineering of the hydrophilic and hydrophobic areas, thereby establishing a delicate balance. The maintenance of this equilibrium is of utmost importance for their capacity to engage with the hydrophilic surface of microbial membranes as well as infiltrate the hydrophobic core, ultimately re-

sulting in the rupture of the membrane. Position C-24 holds significant importance as it is closely associated with the groups that have a large impact on the bactericidal activity of CSAs [61]. During this study investigating cationic steroid antibiotics, it was observed that compounds with longer hydrophobic chains at C-24 exhibit potent bactericidal activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, while those with shorter chains are less effective against Gram-negative strains while retaining strong activity against Gram-positive organisms. To improve cell selectivity, a polyamine was attached at C-24, reducing hemolytic activity while maintaining antibacterial efficacy. Amino acids were also introduced to facilitate specific binding interactions, potentially increasing affinity and selectivity. The justification for employing amino acids is the ability of the amine groups to offer cationic recognition, while the side chains may contribute further associative contacts with a particular binding target. Consequently, this enhances the affinity and, potentially, the selectivity of the interaction. The aforementioned correlations represent fundamental observations; however, ongoing research is being conducted to enhance the precision of this set of molecules.

Ceragenins, being non-peptide-based compounds, do not serve as substrates for proteases, resulting in their exceptional stability under physiological conditions. These compounds are not susceptible to proteolysis and are inexpensive to manufacture, making them an attractive alternative to peptide-based synthetic CAMPs [62]. One of the primary benefits of ceragenins is their resistance to the development of microbial resistance and their ability to target the bacterial cell membrane [63,64]. Traditional antibiotics frequently encounter the problem of bacteria evolving resistance mechanisms, reducing their effectiveness over time.

The research conducted by Li, Chunhong, et al. demonstrated that the effectiveness of ceragenins in combating Gram-negative bacteria is influenced, at least in part, by the length of the lipid chain attached to the molecule [65]. The lipid chain was postulated to serve as a means of anchoring the bacteria to its outer membrane. It has been proven that CSA-131, containing a lipid chain consisting of 12 carbon atoms, exhibited superior activity compared to CSA-13 and CSA-44, which both possess lipid chains consisting of eight carbon atoms, in contrast to CSA-142, which possesses a six-carbon chain and exhibited the lowest level of activity [66–69].

The incorporation of ceragenins into nanosystems improves their antibacterial properties and targeting abilities. Nanostructures can encapsulate and deliver ceragenins to infection sites, thereby enhancing their local concentration and efficacy while decreasing off-target effects. Physicochemical characteristics of ceragenin-loaded nanosystems, such as size and surface charge, play a crucial role in bacterial targeting. Due to their enhanced permeability and retention effect, nanoparticles within the optimal size range can promote passive accumulation within bacterial biofilms. Surface charge manipulation enables controlled interactions with bacteria and can increase specificity by targeting the surface properties of bacteria. Utilizing the synergistic benefits of both ceragenins and nanostructures, ceragenin-based nanosystems have emerged as an attractive approach to combating bacterial infections (Figure 3).

The presence of magnetic nanoparticles leads to enhanced incorporation and/or absorption of membrane-active substances like ceragenins and conventional antibiotics such as colistin or vancomycin into bacterial cell wall compounds. This interaction results in membrane disruption, leading to the release of intracellular contents as well as the induction of oxidative stress by the magnetic nanoparticles. Consequently, the organelles within bacterial cells experience detrimental effects. Furthermore, the combination of metallic nanoparticles and ceragenins exhibits synergistic properties in combating bacteria in both planktonic and biofilm states, including multidrug-resistant strains. This promising development has potential for addressing the urgent worldwide challenge of growing microbial resistance.

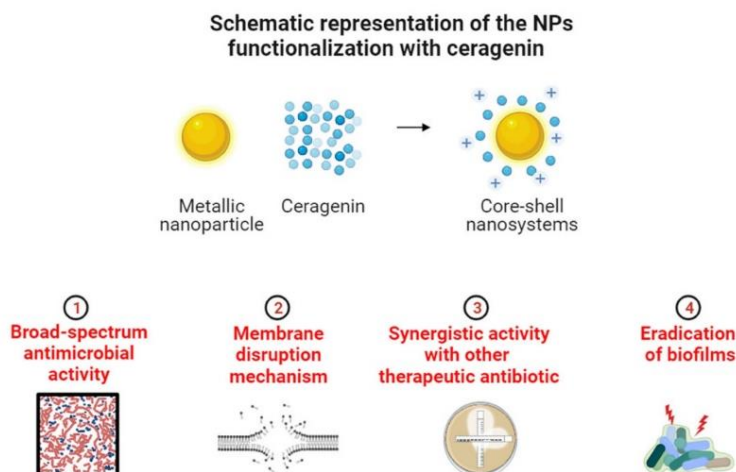


Figure 3. Therapeutic strategies for the treatment of the gram-negative rods by ceragenins and ceragenin-based core-shell nanosystems.

The investigation and advancement of ceragenins' and ceragenin-based core-shell nanosystems' pharmacokinetics and toxicity are currently subjects of intensive scholarly inquiry and continuous progress. The distinctive attributes of these entities provide both benefits and constraints, prompting continuous endeavors to optimize their properties to enhance their therapeutic potential. The study conducted by Wnorowska et al. [70] demonstrated that CSA-13 exhibits bladder accumulation within the initial 4-h period, with subsequent detection in the liver after 8 h. Following a 24-h period, CSAs were completely eliminated. This finding aligns with prior research indicating the renal accumulation of ceragenin, hence reinforcing the credibility of ceragenin's application in treating urinary tract infections [71]. The veracity of these findings was substantiated through an examination of animal excrement. The investigation of the impact of urinary pH on the pharmacokinetic and antibacterial properties of ceragenins is of great importance, considering the significance of urine ceragenin concentrations in the treatment of urinary tract infections and the involvement of kidneys in CSA-13 clearance. Moreover, in another in vivo study aiming to elucidate the anti-cancer potential of CSA-containing nanosystems, the compound AuP@CSA-131 exhibited distinct characteristics such as delayed clearance and extended blood circulation in comparison to free ceragenin, with subsequent improvement of biological activities [72].

4. Activity of Ceragenins and Ceragenin-Based Nanosystems against Multi-Drug Resistance Gram-Negative Rods

One of the major challenges encountered in combating multidrug resistance pertains to the high occurrence of pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), and *Enterobacter* spp. [33]. These pathogens are primarily responsible for nosocomial infections, underscoring the pressing need for novel and effective therapeutic strategies [73] and are the focus of this review.

4.1. Ceragenins as Potent Antimicrobials with a Broad-Spectrum of Activity

Multiple investigations, including our own, have provided a growing body of evidence of the efficacy of ceragenins and ceragenin-based nanosystems in combating multidrug-resistant strains. The assessment of the antibacterial properties of these drugs is commonly conducted by determining the minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs).

To date, a number of studies report promising results on the utilization of ceragenins to combat HAIs. The findings of one of the investigations indicate that a selection of ceragenins (CSA-13, CSA-44, CSA-131, CSA-138, and CSA-142) exhibit efficacy against 50 multidrug-resistant strains of *K. pneumoniae* displaying a high level of resistance to colistin [66]. Another study showed that CSA-13 exhibited antimicrobial properties within a range of 2–6 mg/L, while CSA-142 demonstrated similar effects [74]. Furthermore, the minimum inhibitory concentration values for meropenem-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* were seen to range from 0.5 to 32 mg/L for CSA-13 and CSA-44, with the lowest concentration of CSAs that is effective in inhibiting the growth of 90% (MIC₉₀) of *K. pneumoniae* being 32 mg/L [66]. Similarly, CSA-131 exhibited MIC values ranging from 0.5 to 16 mg/L, with a MIC₉₀ of 32 mg/L. These findings were corroborated by another publication [67].

Importantly, ceragenin has also been proven to have strong effects against other multidrug-resistant strains, such as *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. Carbapenems hold significant importance as commonly employed antipseudomonal medications, notwithstanding the escalating global prevalence of carbapenem resistance in *P. aeruginosa* strains. One of the most crucial categories to consider is carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA) [75]. In instances of this nature, colistin is the sole available therapy choice. Nevertheless, the emergence of colistin resistance is being observed worldwide [76]. The presence of carbapenemases in CRPA strains has significant therapeutic implications due to their ability to confer resistance not only to carbapenems but also to other β -lactam antibiotics, including certain new β -lactam- β -lactamase inhibitors [77]. A potential correlation between the broader range of resistance and unfavorable outcomes in patients with CRPA infections may exist. The published data clearly show that the ranges of minimum inhibitory concentration values for ceragenins against 150 strains of *P. aeruginosa*, both with and without resistance mechanisms to β -lactams, are consistent across groups and comparable to the reference strain of *P. aeruginosa* ATCC 27853 [78]. The findings presented in the published study align with the results reported by Vila-Farrés et al. [79], who conducted experiments to evaluate the efficacy of several ceragenins, such as CSA-44, CSA-131, and CSA-138, against clinical isolates of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, including those that were resistant to colistin. In both studies, CSA-131 had the highest level of activity. The minimum inhibitory concentration values for the complete set of strains were determined to be 1 mg/L and 2 mg/L for the MIC₅₀ and MIC₉₀, respectively [79]. Similarly, a separate investigation examining the in vitro impact of ceragenins on 20 clinical strains of CRPA demonstrated that CSA-131 exhibited the highest level of activity among the ceragenins tested. Importantly, the antibacterial activity of ceragenins remains consistently effective regardless of the mechanisms of resistance observed in conventional antibiotics [69]. Moreover, the strong antibacterial effect of CSA-13 against *P. aeruginosa* as well as uropathogenic *E. coli* strains was also demonstrated in an in vivo model [70,71] (Table 2).

Interesting, in one of the more recent studies, Paprocka et al. [78] conducted a study to examine the activity of ceragenins CSA-13, CSA-131, and CSA-44 in comparison to three newly developed conventional beta-lactam antibiotics: (1) ceftolozane/tazobactam, (2) ceftazidime/avibactam (which have been available for several years since their approval in the US and Europe), and meropenem/vaborbactam (which was introduced into the medical market several years thereafter) against clinical strains of *P. aeruginosa* exhibiting various resistance patterns. The findings demonstrate the favorable efficacy of ceragenins against *P. aeruginosa*, including those that are susceptible to conventional antibiotics, as well as multidrug-resistant and extensively drug-resistant strains. Notably, the compounds exhibited activity against strains that manufacture metallo-beta-lactamases while retaining susceptibility solely to colistin. In comparison to traditional antibiotics, the minimum inhibitory concentration values for each ceragenin against *P. aeruginosa* strains, both with and without resistance mechanisms to β -lactams, exhibit similar ranges between the two groups. Furthermore, the antifungal activity of the ceragenins (CSA-13, CSA-131, and CSA-192) was compared to the impact of omiganan (the completion of phase 3 clinical trials

evaluating the efficacy of omiganan 1% gel in preventing catheter-related bloodstream infections and providing topical skin antiseptics in healthy adult participants has been reported in the database of the U.S. National Institutes of Health) [59]. Ceragenins exhibit significantly greater candidacidal action in comparison to omiganan.

Table 2. Selected results summarize the values of the antibacterial activities of ceragenins and antibiotics against Gram-negative bacteria.

Tested Antimicrobial Agents	Minimal Inhibitory Concentration (mg/L)							
	<i>A. baumannii</i> Colistin-Resistant n = 1	<i>A. baumannii</i> Carbapenem-Resistant n = 25	<i>P. aeruginosa</i> Various Mechanisms of Resistance n = 150	<i>P. aeruginosa</i> Colistin-Resistant n = 1	<i>K. pneumoniae</i> Colistin-Resistant n = 5	<i>K. pneumoniae</i> MDR n = 50	<i>K. pneumoniae</i> NDM-1 n = 1	<i>K. pneumoniae</i> NDM-1 n = 1
CSA-13	4	1–16	0.5–8	<0.5	2–6	0.5–32	2	2
CSA-44	4	8–16	0.5–8	1	1–2	0.5–32	2	2
CSA-131	2	1–8	0.5–4	<0.5	1–3	0.5–16	2	2
CSA-138	4	4–32	-	1	2–8	1–32	-	-
Colistin	-	0.125–4	0.125–8	-	16–200	0.03–128	1	0.5
Meropenem	-	8–128	-	-	-	0.5–128	128	32
Reference	[79]	[80]	[78]	[79]	[74]	[66]	[67]	

Among the several categories of nanoparticles, gold nanoparticles (Au NPs) have been recognized as highly beneficial materials in the field of nanomedicine [81]. It is important to emphasize that gold nanoparticles have garnered considerable interest due to their distinctive characteristics, such as their quite small size, easy surface modification, and low toxicity [82]. It is worth noting that a considerable number of gold nanoparticles have been employed as antibacterial agents in conjunction with small-molecule antibiotics, antimicrobial peptides, or cationic ligands attached to their surface [83]. The bactericidal properties of nanosystems consisting of ceragenin attached to the surface of nanoparticles in three different shapes: rods (AuR NPs@CSA-131), peanuts (AuP NPs@CSA-131), and stars (AuS NPs@CSA-131), have been evaluated against bacterial strains with various mechanisms of resistance to antibiotics (e.g., *K. pneumoniae* ESBL+, *K. oxytoca* ESBL+, *P. aeruginosa* LESB58 highly resistant to antibiotics with production of chromosomally encoded inducible AmpC- β -lactamase, and *P. aeruginosa* with the active efflux pumps) [84]. Significantly, the enhanced efficacy of the nanosystem in comparison to ceragenin arises primarily from the localized augmentation of ceragenin concentration and its enhanced internalization by cells, rather than from the inherent antibacterial properties of nanogold. While our previous research has shown that gold nanoparticles with varying shapes may possess antimicrobial [85] and anti-cancer properties [86], it is important to note that achieving these effects typically requires higher doses of nanoparticles compared to those found in the nanosystems currently being developed.

In another report, we demonstrated that improvement of the antimicrobial activity of CSA-13 is also possible by immobilizing CSA onto the surface of iron oxide-based magnetic nanoparticles. As demonstrated, nanocompounds, referred to as MNP-CSA-13, significantly augmented the antibacterial efficacy against multidrug-resistant *P. aerugi-*

nosa [87]. Moreover, such nanoformulation enhances the compounds' hemocompatibility as a result [88,89].

4.2. Enhancing Antibiotic Potency: Unveiling the Synergistic Activity of Ceragenins with Conventional Antibiotics

To address the issue of resistance strains, a potential strategy involves the utilization of a combination of different antibiotics as a countermeasure. This method can increase the pathogen target spectrum and reduce antibiotic use in therapeutic settings, reducing drug resistance. Moreover, the implementation of combination therapy has the potential to mitigate toxicity concerns by enabling the administration of reduced dosages of the respective deleterious medications in question. The effective application of synergism as a strategic approach involves the combination of many therapeutic agents with the aim of achieving a therapy that is more efficacious while also mitigating the rapid development of resistance.

Some of the first work evaluating the synergistic effect of ceragenin with conventional antibiotics inspired the evaluation of this effect against multidrug-resistant strains [90]. In 2008, the activity of CSA-13 against clinical isolates of *P. aeruginosa*, including MDR-*P. aeruginosa*, was evaluated. It has been proven that CSA-13 shows synergy with cefepime and ciprofloxacin against *P. aeruginosa* [90]. The above results were confirmed in another study that indicates a synergistic effect for CSA-13 in combination with colistin against clinical strains of *P. aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients (synergism was observed for 54% of tested strains) [91].

A. baumannii strains that were resistant to carbapenems were tested in vitro using CSA-13 in combination with colistin, tobramycin, and ciprofloxacin [92]. The outcomes of this investigation showed that synergistic interactions were identified in all combinations. With the use of the CSA-13 and colistin combination, the bactericidal effect in 55% of the tested strains showed the most synergistic interactions, whereas with the CSA-13 and tobramycin combination, 35% of the tested strains showed the least synergistic interactions. Then, recently published data showed the in vitro activities of ceragenins (CSA-8, CSA-13, CSA-44, CSA-131, and CSA-138) in combination with colistin against 25 carbapenem-resistant *A. baumannii* strains [80]. In agreement with the previous reports, a synergistic effect of CSA-13 with colistin was confirmed. Moreover, combinations of CSA-13 with CSA-131, CSA-13 with CSA-138, and CSA-131 with CSA-138 were found to have a synergistic effect. Importantly, no evidence of an antagonistic effect was found.

Another study also examined the synergistic effects of two ceragenins with colistin or meropenem on six *K. pneumoniae* strains showing different resistance patterns. The results indicate that the MIC values of ceragenins were similar or better than the antibiotics tested, except for colistin, and the synergistic effect of CSA-131 in combination with colistin was found for the strains at both $1 \times \text{MIC}$ and $4 \times \text{MIC}$ [66].

These results are extremely promising in the fight against multidrug-resistant strains of Gram-negative bacteria in particular, due to the rapid development of resistance to various antibiotics.

4.3. Demonstrating the Proven Anti-Biofilm Efficacy of Ceragenin for Clinical Application

Numerous bacterial species possess the capacity to form biofilms, which consist of structured communities of bacteria that adhere to both biotic and abiotic surfaces, facilitated by the secretion of extracellular matrix [93]. Biofilms play a crucial role in facilitating bacterial resistance to antibiotics by providing a protective environment for bacteria within a matrix [94,95]. Within biofilms, bacterial cells exhibit significantly higher tolerance to antimicrobial agents, with tolerance levels reaching up to 10,000 times greater than those observed in planktonic cells [96].

Prior research has indicated that there is a significant increase in the prevalence of *K. pneumoniae* strains that exhibit resistance to a wide range of antibiotics, particularly when these bacteria possess the ability to build biofilms [97]. Treatment of infections caused by

biofilm-forming *K. pneumoniae* strains is more difficult than for other strains [98]. Several research studies have demonstrated a correlation between the ability of bacteria to form biofilms, which are regulated by genes and proteins, and their resistance to colistin [99,100]. Studies have also depicted the interrelationships- between biofilm formation, gene/protein regulation, and the resistance phenotype [96]. Given that over 60% of infections are linked to the capacity of microorganisms to form biofilms, the substantial efficacy of ceragenins in inhibiting biofilm formation has been substantiated by numerous prior investigations [101]. An example of this is the study conducted by Chmielewska et al., which provided evidence of the efficacy of CSA-13, CSA-44, and CSA-131 in combating biofilm formation by NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase-1)-generating strains of *Klebsiella pneumoniae* BAA-2472 and BAA-2473 [102]. The ranges of MIC and MIB values for ceragenins CSA-13, CSA-44, and CSA-131 against *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* BAA-2472 and *K. pneumoniae* BAA-2473 were, respectively, 1 to 2 mg/L and 1 to 4 mg/L, and were several times lower compared to the majority of antibiotics used in this study (ertapenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, and fosfomycin). The lowest, identical values were obtained by ceragenins CSA-13 and CSA-131 [102]. In addition, data are available that show the activity of ceragenins CSA-13 and CSA-90 against both single- and multi-species biofilms formed by *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *Candida albicans* [101]. Several studies have shown that ceragenins, especially CSA-13, have antibiofilm activity against *P. aeruginosa* [103–105]. Interestingly, *P. aeruginosa* biofilm usually produces a large amount of a Pfl-like virus compared with phage production in planktonic *P. aeruginosa* cultures [106]. In connection with this fact, we presented the results that demonstrated that the Pfl bacteriophage dramatically reduces the bactericidal activity of the cathelicidin LL-37 peptide, but it has no effect on the ability of synthetic cationic lipids like CSA-13 and CSA-131 to eradicate bacteria. The potential of cationic lipids to prevent and treat *P. aeruginosa* infections, particularly those brought on by LES strains in CF airways, is suggested by their capacity to prevent *P. aeruginosa* LESB58 biofilm formation and eliminate *P. aeruginosa* LESB58 bacteria from CF sputum in vitro [107].

It is important to mention that the immobilization of CSA-13 on magnetic nanoparticles resulted in a significant enhancement of its bactericidal and anti-biofilm properties in PBS-based conditions. Additionally, the antimicrobial activity of CSA-13 was further intensified when exposed to bodily fluids, including urine, saliva, plasma, pus, ascites, cerebrospinal fluid, bronchoalveolar lavage, and cystic fibrosis sputum [87,108]. The data presented in this study emphasizes the therapeutic efficacy of MNPs, as evidenced by the enhanced bactericidal effects and biofilm prevention capabilities observed when combining CSA-13 and CSA-131 with MNPs against *P. aeruginosa* Xen 5 and other Gram-negative bacteria [108,109].

4.4. Investigating Morphological Alterations in Bacterial Cells following Exposure to Ceragenins

The direct observation of the changes in morphology of microorganisms in response to antibiotic exposure is one of the most often used techniques to assess bactericidal effects [110]. Frequently, atomic force microscopes (AFM) that permit observation of live microorganisms are used in this regard. Measurements of the physicochemical properties of bacterial cells, followed by changes in the architecture of the bacterial cell membrane caused by antibiotic exposure, can reveal important details about the putative mechanisms of action of the antimicrobial agents being studied. This technique was successfully employed to explore the morphological changes in *K. pneumoniae* BAA-2473 cells after exposure to ceragenins (CSA-13, CSA-44, and CSA-131) (Figure 4) [67].

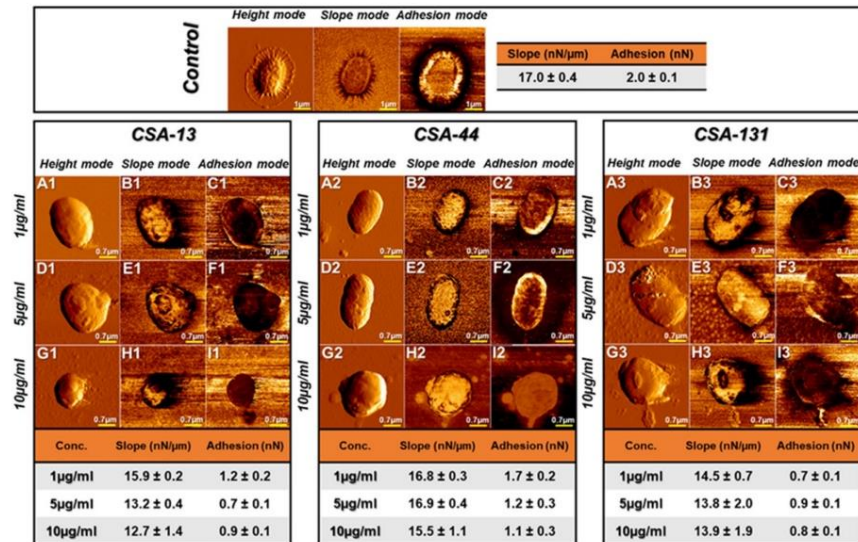


Figure 4. Morphological changes of *K. pneumoniae* in AFM before and after application of ceragenins CSA-13, CSA-44, and CSA-131 [67].

The main objective was to gain a better understanding of the mechanisms by which ceragenins induce membrane damage. The findings of the investigation suggest that the method by which ceragenins exert their effects may entail their interaction with negatively charged compounds present in the bacterial membrane, such as lipopolysaccharide (LPS) and phosphatidylglycerol (PG). This form of interaction gives rise to the reorganization of membrane compound packing, ultimately resulting in the disruption of the membrane. Observed changes in AFM include changes in cell membrane morphology such as microcracks and surface wrinkles.

A change in shape and a decrease in bacterial adhesion and stiffness were also observed. Changes in bacterial morphology can also be observed in the SEM (Figure 5). After applying ceragenins, the bacterial images show folding, wrinkling, and discontinuity of the membranes, which indicates membrane activity (insertion) of ceragenins [109].

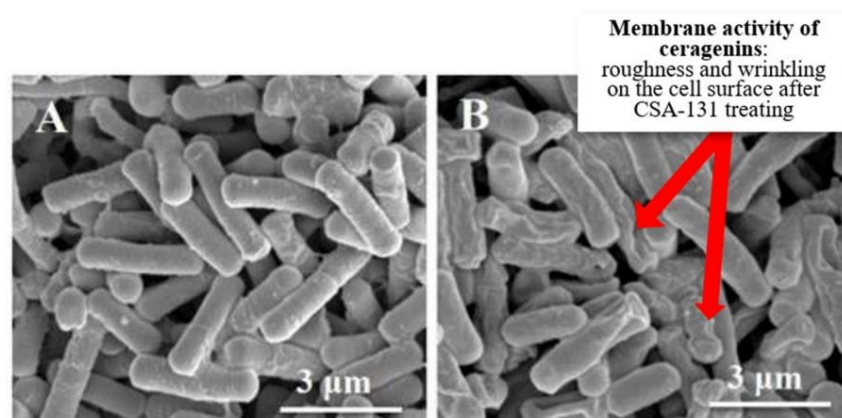


Figure 5. Changes in morphology in SEM after application of ceragenin CSA-131 against *K. pneumoniae* ((A)—before application of CSA-131, (B)—after application of CSA-131) [109].

Other published data presented changes in cell shape and mechanical characteristics of *P. aeruginosa* after treatment with MNP-CSA-13 in order to confirm the antibacterial activity of ceragenin-functionalized magnetic nanoparticles by atomic force microscopy (AFM) [110]. The findings show that nanosystems of MNP-CSA-13 attach to bacteria before rupturing the cell membrane, allowing the internal contents to escape. Interestingly, the addition of unfunctionalized MNPs causes bacterial aggregation [110].

5. Conclusions

In the ongoing effort to combat nosocomial infections, specifically those caused by multidrug-resistant strains of *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii*, the introduction of ceragenins and ceragenin-based core-shell nanosystems as a viable alternative represents a significant advancement in infection management and future therapy. The diverse characteristics of ceragenins, such as their wide-ranging antibacterial properties, distinctive method of action in disrupting membranes, and proven effectiveness *in vivo*, all highlight their potential as a significant addition to our therapeutic arsenal. In our endeavor to combat multidrug-resistant bacteria, ceragenins offer a compelling opportunity, thanks to their remarkable effectiveness and resilience against the emergence of resistance. Through ongoing research, ceragenins have the potential to significantly transform the field of infection management.

Author Contributions: M.K. and R.B. conceived the idea of the work. M.K., U.W., B.D., G.K., T.D., K.S., K.G., E.P. and S.O. collected literature. M.K. and U.W. analyzed the literature and wrote this review. B.D., T.D., E.P. and R.B. edited and commented the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in whole or in part by National Science Center, UMO-2018/31/B/NZ6/02476 (R.B.) and the Medical University of Białystok: SUB/1/DN/22/007/1122 (K.S.).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cassini, A.; Högberg, L.D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G.S.; Colomb-Cotinat, M.; Kretzschmar, M.E.; Devleeschauwer, B.; Cecchini, M. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 56–66. [CrossRef]
2. World Health Organization. *Health Care Associated Infections FactSheet*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015; Volume 4.
3. European Centre for Disease Prevention and Control; Suetens, C.; Hopkins, S.; Kolman, J.; Högberg, L.D. *Point Prevalence Survey of Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals: 2011–2012*; ECDC: Stockholm, Sweden, 2013.
4. Koch, A.M.; Nilsen, R.M.; Eriksen, H.M.; Cox, R.J.; Harthug, S. Mortality related to hospital-associated infections in a tertiary hospital; repeated cross-sectional studies between 2004–2011. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2015**, *4*, 57. [CrossRef] [PubMed]
5. Kanerva, M.; Ollgren, J.; Virtanen, M.J.; Lyytikäinen, O. Risk factors for death in a cohort of patients with and without healthcare-associated infections in Finnish acute care hospitals. *J. Hosp. Infect.* **2008**, *70*, 353–360. [CrossRef] [PubMed]
6. Zimlichman, E.; Henderson, D.; Tamir, O.; Franz, C.; Song, P.; Yamin, C.K.; Keohane, C.; Denham, C.R.; Bates, D.W. Health care-associated infections: A meta-analysis of costs and financial impact on the US health care system. *JAMA Intern. Med.* **2013**, *173*, 2039–2046. [CrossRef]
7. Sikora, A.; Zahra, F. *Nosocomial Infections*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020.
8. Magill, S.S.; O’Leary, E.; Janelle, S.J.; Thompson, D.L.; Dumyati, G.; Nadle, J.; Wilson, L.E.; Kainer, M.A.; Lynfield, R.; Greissman, S.; et al. Changes in Prevalence of Health Care-Associated Infections in U.S. Hospitals. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 1732–1744. [CrossRef]
9. Baier, C.; Linke, L.; Eder, M.; Schwab, F.; Chaberny, I.F.; Vonberg, R.P.; Ebadi, E. Incidence, risk factors and healthcare costs of central line-associated nosocomial bloodstream infections in hematologic and oncologic patients. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0227772. [CrossRef] [PubMed]

10. Weiner, L.M.; Webb, A.K.; Limbago, B.; Dudeck, M.A.; Patel, J.; Kallen, A.J.; Edwards, J.R.; Sievert, D.M. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2016**, *37*, 1288–1301. [[CrossRef](#)]
11. Bell, T.; O’Grady, N.P. Prevention of Central Line-Associated Bloodstream Infections. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2017**, *31*, 551–559. [[CrossRef](#)]
12. Ayoub Moubareck, C.; Hammoudi Halat, D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics* **2020**, *9*, 119. [[CrossRef](#)]
13. Suetens, C.; Latour, K.; Kärki, T.; Ricchizzi, E.; Kinross, P.; Moro, M.L.; Jans, B.; Hopkins, S.; Hansen, S.; Lyytikäinen, O.; et al. Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: Results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Euro Surveill.* **2018**, *23*, 1800516. [[CrossRef](#)]
14. Leticia-Kriegel, A.S.; Salmasian, H.; Vawdrey, D.K.; Youngerman, B.E.; Green, R.A.; Furuya, E.Y.; Calfee, D.P.; Perotte, R. Identifying the risk factors for catheter-associated urinary tract infections: A large cross-sectional study of six hospitals. *BMJ Open* **2019**, *9*, e022137. [[CrossRef](#)]
15. Isikgoz Tasbakan, M.; Durusoy, R.; Pullukcu, H.; Sipahi, O.R.; Ulusoy, S. Hospital-acquired urinary tract infection point prevalence in Turkey: Differences in risk factors among patient groups. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2013**, *12*, 31. [[CrossRef](#)]
16. Mioton, L.M.; Jordan, S.W.; Hanwright, P.J.; Bilimoria, K.Y.; Kim, J.Y. The Relationship between Preoperative Wound Classification and Postoperative Infection: A Multi-Institutional Analysis of 15,289 Patients. *Arch. Plast. Surg.* **2013**, *40*, 522–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Gibbons, C.; Bruce, J.; Carpenter, J.; Wilson, A.P.; Wilson, J.; Pearson, A.; Lamping, D.L.; Krukowski, Z.H.; Reeves, B.C. Identification of risk factors by systematic review and development of risk-adjusted models for surgical site infection. *Health Technol. Assess.* **2011**, *15*, 1–156. [[CrossRef](#)]
18. Klompas, M.; Branson, R.; Eichenwald, E.C.; Greene, L.R.; Howell, M.D.; Lee, G.; Magill, S.S.; Maragakis, L.L.; Priebe, G.P.; Speck, K.; et al. Strategies to prevent ventilator-associated pneumonia in acute care hospitals: 2014 update. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2014**, *35* (Suppl. 2), S133–S154. [[CrossRef](#)]
19. Komiyama, K.; Ishii, H.; Kadota, J. Healthcare-associated Pneumonia and Aspiration Pneumonia. *Aging Dis.* **2015**, *6*, 27–37. [[CrossRef](#)]
20. Kózka, M.; Segal, A.; Wojnar-Gruszka, K.; Tarnawska, A.; Gniadek, A. Risk Factors of Pneumonia Associated with Mechanical Ventilation. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 656. [[CrossRef](#)]
21. Kumar, S.T.; Yassin, A.; Bhowmick, T.; Dixit, D. Recommendations From the 2016 Guidelines for the Management of Adults with Hospital-Acquired or Ventilator-Associated Pneumonia. *Pharm. Ther. Peer-Rev. J. Formul. Manag.* **2017**, *42*, 767–772.
22. Modi, A.R.; Kovacs, C.S. Hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: Diagnosis, management, and prevention. *Clevel. Clin. J. Med.* **2020**, *87*, 633–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Jaruratanasirikul, S.; Nitchot, W.; Wongpoowarak, W.; Samaeng, M.; Nawakitranagan, M. Population pharmacokinetics and Monte Carlo simulations of sulbactam to optimize dosage regimens in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *136*, 104940. [[CrossRef](#)]
24. Roberts, K.; Smith, C.F.; Snelling, A.M.; Kerr, K.G.; Banfield, K.R.; Sleigh, P.A.; Beggs, C.B. Aerial dissemination of *Clostridium difficile* spores. *BMC Infect. Dis.* **2008**, *8*, 7. [[CrossRef](#)]
25. Loo, V.G.; Bourgault, A.M.; Poirier, L.; Lamothe, F.; Michaud, S.; Turgeon, N.; Toye, B.; Beaudoin, A.; Frost, E.H.; Gilca, R.; et al. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 1693–1703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Mehrad, B.; Clark, N.M.; Zhanel, G.G.; Lynch, J.P., 3rd. Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. *Chest* **2015**, *147*, 1413–1421. [[CrossRef](#)]
27. Zhao, S.; Adamiak, J.W.; Bonifay, V.; Mehla, J.; Zgurskaya, H.I.; Tan, D.S. Defining new chemical space for drug penetration into Gram-negative bacteria. *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16*, 1293–1302. [[CrossRef](#)]
28. O’Neill, J. *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*; Government of the United Kingdom: London, UK, 2016.
29. O’Neill, J. *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations*; Review on Antimicrobial Resistance; Wellcome Collection: London, UK, 2014.
30. World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. In *Antimicrobial Resistance Division, National Action Plans and Monitoring and Evaluation*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015; ISBN 9789241509763.
31. Eichenberger, E.M.; Thaden, J.T. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant Gram-negative bacteria. *Antibiotics* **2019**, *8*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Musser, J.M.; Beres, S.B.; Zhu, L.; Olsen, R.J.; Vuopio, J.; Hyyryläinen, H.-L.; Gröndahl-Yli-Hannuksela, K.; Kristinsson, K.G.; Darenberg, J.; Henriques-Normark, B. Reduced in vitro susceptibility of *Streptococcus pyogenes* to β -lactam antibiotics associated with mutations in the pbp2x gene is geographically widespread. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e01993-19. [[CrossRef](#)]
33. Lopatkin, A.J.; Bening, S.C.; Manson, A.L.; Stokes, J.M.; Kohanski, M.A.; Badran, A.H.; Earl, A.M.; Cheney, N.J.; Yang, J.H.; Collins, J.J. Clinically relevant mutations in core metabolic genes confer antibiotic resistance. *Science* **2021**, *371*, eaba0862. [[CrossRef](#)]

34. Von Wintersdorff, C.J.; Penders, J.; Van Niekerk, J.M.; Mills, N.D.; Majumder, S.; Van Alphen, L.B.; Savelkoul, P.H.; Wolffs, P.F. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 173. [[CrossRef](#)]
35. Sun, D.; Jeannot, K.; Xiao, Y.; Knapp, C.W. Horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1933. [[CrossRef](#)]
36. Ma, Y.X.; Wang, C.Y.; Li, Y.Y.; Li, J.; Wan, Q.Q.; Chen, J.H.; Tay, F.R.; Niu, L.N. Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. *Adv. Sci.* **2020**, *7*, 1901872. [[CrossRef](#)]
37. Sievert, D.M.; Ricks, P.; Edwards, J.R.; Schneider, A.; Patel, J.; Srinivasan, A.; Kallen, A.; Limbago, B.; Fridkin, S. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **2013**, *34*, 1–14. [[CrossRef](#)]
38. Hidron, A.I.; Edwards, J.R.; Patel, J.; Horan, T.C.; Sievert, D.M.; Pollock, D.A.; Fridkin, S.K. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **2008**, *29*, 996–1011. [[CrossRef](#)]
39. Mancuso, G.; Midiri, A.; Gerace, E.; Biondo, C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens* **2021**, *10*, 1310. [[CrossRef](#)]
40. Wesseling, C.M.J.; Martin, N.I. Synergy by Perturbing the Gram-Negative Outer Membrane: Opening the Door for Gram-Positive Specific Antibiotics. *ACS Infect. Dis.* **2022**, *8*, 1731–1757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Prasad, N.K.; Seiple, I.B.; Cirz, R.T.; Rosenberg, O.S. Leaks in the Pipeline: A Failure Analysis of Gram-Negative Antibiotic Development from 2010 to 2020. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2022**, *66*, e0005422. [[CrossRef](#)]
42. Butler, M.S.; Henderson, I.R.; Capon, R.J.; Blaskovich, M.A.T. Antibiotics in the clinical pipeline as of December 2022. *J. Antibiot.* **2023**, *76*, 431–473. [[CrossRef](#)]
43. Yusuf, E.; Bax, H.I.; Verkaik, N.J.; van Westreenen, M. An Update on Eight “New” Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ontong, J.C.; Ozioma, N.F.; Voravuthikunchai, S.P.; Chusri, S. Synergistic antibacterial effects of colistin in combination with aminoglycoside, carbapenems, cephalosporins, fluoroquinolones, tetracyclines, fosfomycin, and piperacillin on multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0244673. [[CrossRef](#)]
45. Jones, E.; Hu, Y.; Coates, A. The Efficacy of Using Combination Therapy against Multi-Drug and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Clinical Settings. *Antibiotics* **2022**, *11*, 323. [[CrossRef](#)]
46. Ling, H.; Lou, X.; Luo, Q.; He, Z.; Sun, M.; Sun, J. Recent advances in bacteriophage-based therapeutics: Insight into the post-antibiotic era. *Acta Pharm. Sin. B* **2022**, *12*, 4348–4364. [[CrossRef](#)]
47. Shlaes, D.M. Innovation, nontraditional antibacterial drugs, and clinical utility. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7*, 2027–2028. [[CrossRef](#)]
48. Butler, M.S.; Gigante, V.; Sati, H.; Paulin, S.; Al-Sulaiman, L.; Rex, J.H.; Fernandes, P.; Arias, C.A.; Paul, M.; Thwaites, G.E. Analysis of the clinical pipeline of treatments for drug-resistant bacterial infections: Despite progress, more action is needed. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2022**, *66*, e01991-21. [[CrossRef](#)]
49. Weinberg, S.E.; Villedieu, A.; Bagdasarian, N.; Karah, N.; Teare, L.; Elamin, W.F. Control and management of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: A review of the evidence and proposal of novel approaches. *Infect. Prev. Pract.* **2020**, *2*, 100077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Ageitos, J.; Sánchez-Pérez, A.; Calo-Mata, P.; Villa, T. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *133*, 117–138. [[CrossRef](#)]
51. Spencer, J.J.; Pitts, R.E.; Pearson, R.A.; King, L.B. The effects of antimicrobial peptides WAM-1 and LL-37 on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Pathog. Dis.* **2018**, *76*, fty007. [[CrossRef](#)]
52. Kazakova, O.; Giniyatullina, G.; Babkov, D.; Wimmer, Z. From Marine Metabolites to the Drugs of the Future: Squalamine, Trodusquemine, Their Steroid and Triterpene Analogues. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Dao, A.; Mills, R.J.; Kamble, S.; Savage, P.B.; Little, D.G.; Schindeler, A. The application of ceragenins to orthopedic surgery and medicine. *J. Orthop. Res.* **2020**, *38*, 1883–1894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Bozkurt-Guzel, C.; Hacıoglu, M.; Savage, P.B. Investigation of the in vitro antifungal and antibiofilm activities of ceragenins CSA-8, CSA-13, CSA-44, CSA-131, and CSA-138 against *Candida* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *91*, 324–330. [[CrossRef](#)]
55. Hacıoglu, M.; Haciosmanoglu, E.; Birteksoz-Tan, A.S.; Bozkurt-Guzel, C.; Savage, P.B. Effects of ceragenins and conventional antimicrobials on *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* mono and multispecies biofilms. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *95*, 114863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Durnaś, B.; Fiedoruk, K.; Cieśluk, M.; Deptuła, P.; Król, G.; Piktel, E.; Savage, P.B.; Bucki, R. Lysozyme increases bactericidal activity of ceragenin CSA-13 against *Bacillus subtilis*. *Med. Stud./Stud. Med.* **2019**, *35*, 1–9. [[CrossRef](#)]
57. Hashemi, M.M.; Holden, B.S.; Savage, P.B. Ceragenins as non-peptide mimics of endogenous antimicrobial peptides. *Fight. Antimicrob. Resist.* **2018**, *1*, 139–169.
58. Mitchell, G.; Silvis, M.R.; Talkington, K.C.; Budzik, J.M.; Dodd, C.E.; Paluba, J.M.; Oki, E.A.; Trotta, K.L.; Licht, D.J.; Jimenez-Morales, D. Ceragenins and antimicrobial peptides kill bacteria through distinct mechanisms. *Mbio* **2022**, *13*, e02726-21. [[CrossRef](#)]

59. Durnaś, B.; Wnorowska, U.; Pogoda, K.; Deptuła, P.; Wątek, M.; Piktel, E.; Głuszek, S.; Gu, X.; Savage, P.B.; Niemirowicz, K.; et al. Candidacidal Activity of Selected Ceragenins and Human Cathelicidin LL-37 in Experimental Settings Mimicking Infection Sites. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157242. [CrossRef]
60. Skłodowski, K.; Chmielewska, S.J.; Depciuch, J.; Deptuła, P.; Piktel, E.; Daniluk, T.; Zakrzewska, M.; Czarnowski, M.; Cieśluk, M.; Durnaś, B.; et al. Ceragenin-Coated Non-Spherical Gold Nanoparticles as Novel Candidacidal Agents. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1940. [CrossRef]
61. Li, Y. *Design and Synthesis of Ceragenins-Cationic Steroid Antimicrobial Compounds, Structural Improvement and Synthesis of Cyclopentenone Prostaglandins and Modification and Synthesis of Derivatives of Ribityllumazines: Potential Antigens for Activation of MAIT Cells*; Brigham Young University: Provo, UT, USA, 2019.
62. Hashemi, M.; Holden, B.; Durnas, B.; Bucki, R.; Savage, P. Ceragenins as mimics of endogenous antimicrobial peptides. *J. Antimicrob. Agents* **2017**, *3*, 1000141. [CrossRef]
63. Leszczynska, K.; Namiot, D.; Byfield, F.J.; Cruz, K.; Zendzian-Piotrowska, M.; Fein, D.E.; Savage, P.B.; Diamond, S.; McCulloch, C.A.; Janmey, P.A.; et al. Antibacterial activity of the human host defence peptide LL-37 and selected synthetic cationic lipids against bacteria associated with oral and upper respiratory tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 610–618. [CrossRef] [PubMed]
64. Bucki, R.; Sostarecz, A.G.; Byfield, F.J.; Savage, P.B.; Janmey, P.A. Resistance of the antibacterial agent ceragenin CSA-13 to inactivation by DNA or F-actin and its activity in cystic fibrosis sputum. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 535–545. [CrossRef]
65. Li, C.; Budge, L.P.; Driscoll, C.D.; Willardson, B.M.; Allman, G.W.; Savage, P.B. Incremental conversion of outer-membrane permeabilizers into potent antibiotics for Gram-negative bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 931–940. [CrossRef]
66. Ozbek-Celik, B.; Damar-Celik, D.; Mataraci-Kara, E.; Bozkurt-Guzel, C.; Savage, P.B. Comparative In Vitro Activities of First and Second-Generation Ceragenins Alone and in Combination with Antibiotics Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Antibiotics* **2019**, *8*, 130. [CrossRef]
67. Chmielewska, S.J.; Skłodowski, K.; Piktel, E.; Suprewicz, L.; Fiedoruk, K.; Daniluk, T.; Wolak, P.; Savage, P.B.; Bucki, R. NDM-1 Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae are Highly Susceptible to Ceragenins CSA-13, CSA-44, and CSA-131. *Infect. Drug Resist.* **2020**, *13*, 3277–3294. [CrossRef]
68. Paprocka, P.; Mańkowska, A.; Skłodowski, K.; Król, G.; Wollny, T.; Lesiak, A.; Głuszek, K.; Savage, P.B.; Durnaś, B.; Bucki, R. Bactericidal activity of ceragenin in combination with ceftazidime, levofloxacin, co-trimoxazole, and colistin against the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathogens* **2022**, *11*, 621. [CrossRef] [PubMed]
69. Bozkurt Güzel, Ç.; Avci, N.M.; Savage, P. In Vitro Activities of the Cationic Steroid Antibiotics CSA-13, CSA-131, CSA-138, CSA-142, and CSA-192 Against Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Turk. J. Pharm. Sci.* **2020**, *17*, 63–67. [CrossRef]
70. Wnorowska, U.; Piktel, E.; Deptuła, P.; Wollny, T.; Król, G.; Głuszek, K.; Durnaś, B.; Pogoda, K.; Savage, P.B.; Bucki, R. Ceragenin CSA-13 displays high antibacterial efficiency in a mouse model of urinary tract infection. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 19164. [CrossRef]
71. Bucki, R.; Niemirowicz, K.; Wnorowska, U.; Byfield, F.J.; Piktel, E.; Wątek, M.; Janmey, P.A.; Savage, P.B. Bactericidal Activity of Ceragenin CSA-13 in Cell Culture and in an Animal Model of Peritoneal Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 6274–6282. [CrossRef]
72. Piktel, E.; Oscilowska, I.; Suprewicz, L.; Depciuch, J.; Marcińczyk, N.; Chabielska, E.; Wolak, P.; Głuszek, K.; Klimek, J.; Zieliński, P.M.; et al. Peanut-Shaped Gold Nanoparticles with Shells of Ceragenin CSA-131 Display the Ability to Inhibit Ovarian Cancer Growth In Vitro and in a Tumor Xenograft Model. *Cancers* **2021**, *13*, 5424. [CrossRef]
73. Fraimow, H.S.; Tsigrelis, C. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: Mechanisms, epidemiology, and management of specific resistant pathogens. *Crit. Care Clin.* **2011**, *27*, 163–205. [CrossRef]
74. Hashemi, M.M.; Rovig, J.; Weber, S.; Hilton, B.; Forouzan, M.M.; Savage, P.B. Susceptibility of colistin-resistant, Gram-negative bacteria to antimicrobial peptides and ceragenins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00292-17. [CrossRef] [PubMed]
75. Reyes, J.; Komarow, L.; Chen, L.; Ge, L.; Hanson, B.M.; Cober, E.; Herc, E.; Alenazi, T.; Kaye, K.S.; Garcia-Diaz, J. Global epidemiology and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and associated carbapenemases (POP): A prospective cohort study. *Lancet Microbe* **2023**, *4*, e159–e170. [CrossRef]
76. Yacouba, A.; Olowo-Okere, A. Global trends and current status in colistin resistance research: A bibliometric analysis (1973–2019). *F1000Research* **2020**, *9*, 856. [CrossRef]
77. Giani, T.; Arena, F.; Pollini, S.; Di Pilato, V.; D'Andrea, M.M.; Henrici De Angelis, L.; Bassetti, M.; Rossolini, G.M. Italian nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* from invasive infections: Activity of ceftolozane/tazobactam and comparators, and molecular epidemiology of carbapenemase producers. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 664–671. [CrossRef] [PubMed]
78. Paprocka, P.; Durnaś, B.; Mańkowska, A.; Skłodowski, K.; Król, G.; Zakrzewska, M.; Czarnowski, M.; Kot, P.; Fortunka, K.; Gózdź, S.; et al. New β -Lactam Antibiotics and Ceragenins—A Study to Assess Their Potential in Treatment of Infections Caused by Multidrug-Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Drug Resist.* **2021**, *14*, 5681–5698. [CrossRef] [PubMed]
79. Vila-Farrés, X.; Callarisa, A.E.; Gu, X.; Savage, P.B.; Giral, E.; Vila, J. CSA-131, a ceragenin active against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2015**, *46*, 568–571. [CrossRef] [PubMed]
80. Bozkurt-Guzel, C.; Inci, G.; Oyardi, O.; Savage, P.B. Synergistic Activity of Ceragenins Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains in Both Checkerboard and Dynamic Time-Kill Assays. *Curr. Microbiol.* **2020**, *77*, 1419–1428. [CrossRef]

81. Penders, J.; Stolzoff, M.; Hickey, D.J.; Andersson, M.; Webster, T.J. Shape-dependent antibacterial effects of non-cytotoxic gold nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 2457–2468. [[CrossRef](#)]
82. Xie, Y.; Liu, Y.; Yang, J.; Liu, Y.; Hu, F.; Zhu, K.; Jiang, X. Gold Nanoclusters for targeting methicillin-resistant staphylococcus aureus in vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 3958–3962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Zheng, Y.; Liu, W.; Qin, Z.; Chen, Y.; Jiang, H.; Wang, X. Mercaptopyrimidine-conjugated gold nanoclusters as nanoantibiotics for combating multidrug-resistant superbugs. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 3094–3103. [[CrossRef](#)]
84. Chmielewska, S.J.; Skłodowski, K.; Depciuch, J.; Deptuła, P.; Piktel, E.; Fiedoruk, K.; Kot, P.; Paprocka, P.; Fortunka, K.; Wollny, T.; et al. Bactericidal Properties of Rod-, Peanut-, and Star-Shaped Gold Nanoparticles Coated with Ceragenin CSA-131 against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 425. [[CrossRef](#)]
85. Piktel, E.; Suprewicz, L.; Depciuch, J.; Cieśluk, M.; Chmielewska, S.; Durnaś, B.; Król, G.; Wollny, T.; Deptuła, P.; Kochanowicz, J. Rod-shaped gold nanoparticles exert potent candidacidal activity and decrease the adhesion of fungal cells. *Nanomedicine* **2020**, *15*, 2733–2752. [[CrossRef](#)]
86. Piktel, E.; Ościłowska, I.; Suprewicz, L.; Depciuch, J.; Marcińczyk, N.; Chabiłska, E.; Wolak, P.; Wollny, T.; Janion, M.; Parlinska-Wojtan, M. ROS-mediated apoptosis and autophagy in ovarian cancer cells treated with peanut-shaped gold nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2021**, *16*, 1993–2011. [[CrossRef](#)]
87. Niemirowicz, K.; Surel, U.; Wilczewska, A.Z.; Mystkowska, J.; Piktel, E.; Gu, X.; Namiot, Z.; Kułakowska, A.; Savage, P.B.; Bucki, R. Bactericidal activity and biocompatibility of ceragenin-coated magnetic nanoparticles. *J. Nanobiotechnol.* **2015**, *13*, 32. [[CrossRef](#)]
88. Piktel, E.; Prokop, I.; Wnorowska, U.; Król, G.; Cieśluk, M.; Niemirowicz, K.; Savage, P.B.; Bucki, R. Ceragenin CSA-13 as free molecules and attached to magnetic nanoparticle surfaces induce caspase-dependent apoptosis in human breast cancer cells via disruption of cell oxidative balance. *Oncotarget* **2018**, *9*, 21904. [[CrossRef](#)]
89. Niemirowicz, K.; Prokop, I.; Wilczewska, A.Z.; Wnorowska, U.; Piktel, E.; Wątek, M.; Savage, P.B.; Bucki, R. Magnetic nanoparticles enhance the anticancer activity of cathelicidin LL-37 peptide against colon cancer cells. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 3843–3853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Chin, J.N.; Jones, R.N.; Sader, H.S.; Savage, P.B.; Rybak, M.J. Potential synergy activity of the novel ceragenin, CSA-13, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, including multidrug-resistant *P. aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61*, 365–370. [[CrossRef](#)]
91. Bozkurt-Guzel, C.; Savage, P.B.; Gerceker, A.A. In vitro Activities of the Novel Ceragenin CSA-13, Alone or in Combination with Colistin, Tobramycin, and Ciprofloxacin, against *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *Chemotherapy* **2012**, *57*, 505–510. [[CrossRef](#)]
92. Bozkurt-Guzel, C.; Savage, P.B.; Akcali, A.; Ozbek-Celik, B. Potential Synergy Activity of the Novel Ceragenin, CSA-13, against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Bacteremia Patients. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 710273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Bamford, N.C.; MacPhee, C.E.; Stanley-Wall, N.R. Microbial Primer: An introduction to biofilms—what they are, why they form and their impact on built and natural environments. *Microbiology* **2023**, *169*, 001338. [[CrossRef](#)]
94. Shree, P.; Singh, C.K.; Sodhi, K.K.; Surya, J.N.; Singh, D.K. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. *Med. Microecol.* **2023**, *16*, 100084. [[CrossRef](#)]
95. Sharma, S.; Mohler, J.; Mahajan, S.D.; Schwartz, S.A.; Bruggemann, L.; Aalinker, R. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1614. [[CrossRef](#)]
96. Sharma, D.; Misba, L.; Khan, A.U. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **2019**, *8*, 76. [[CrossRef](#)]
97. Vuotto, C.; Longo, F.; Balice, M.P.; Donelli, G.; Valardo, P.E. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens* **2014**, *3*, 743–758. [[CrossRef](#)]
98. Shadkam, S.; Goli, H.R.; Mirzaei, B.; Gholami, M.; Ahanjan, M. Correlation between antimicrobial resistance and biofilm formation capability among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Iran. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2021**, *20*, 13. [[CrossRef](#)]
99. Dutt, Y.; Dhiman, R.; Singh, T.; Vibhuti, A.; Gupta, A.; Pandey, R.P.; Raj, V.S.; Chang, C.M.; Priyadarshini, A. The Association between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance with Possible Ingenious Bio-Remedial Approaches. *Antibiotics* **2022**, *11*, 930. [[CrossRef](#)]
100. Sharma, J.; Sharma, D.; Singh, A.; Sunita, K. Colistin Resistance and Management of Drug Resistant Infections. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2022**, *2022*, 4315030. [[CrossRef](#)]
101. Hacıoğlu, M.; Oyardı, O.; Bozkurt-Guzel, C.; Savage, P.B. Antibiofilm activities of ceragenins and antimicrobial peptides against fungal-bacterial mono and multispecies biofilms. *J. Antibiot.* **2020**, *73*, 455–462. [[CrossRef](#)]
102. Nagant, C.; Pitts, B.; Stewart, P.S.; Feng, Y.; Savage, P.B.; Dehaye, J.P. Study of the effect of antimicrobial peptide mimic, CSA-13, on an established biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiologyopen* **2013**, *2*, 318–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Gu, X.; Jennings, J.D.; Snarr, J.; Chaudhary, V.; Pollard, J.E.; Savage, P.B. Optimization of ceragenins for prevention of bacterial colonization of hydrogel contact lenses. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 6217–6223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Nagant, C.; Feng, Y.; Lucas, B.; Braeckmans, K.; Savage, P.; Dehaye, J.-P. Effect of a low concentration of a cationic steroid antibiotic (CSA-13) on the formation of a biofilm by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *111*, 763–772. [[CrossRef](#)]

105. Whiteley, M.; Bangera, M.G.; Bumgarner, R.E.; Parsek, M.R.; Teitzel, G.M.; Lory, S.; Greenberg, E. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **2001**, *413*, 860–864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Wnorowska, U.; Niemirowicz, K.; Myint, M.; Diamond, S.L.; Wróblewska, M.; Savage, P.B.; Janmey, P.A.; Bucki, R. Bactericidal activities of cathelicidin LL-37 and select cationic lipids against the hypervirulent *Pseudomonas aeruginosa* strain LESB58. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 3808–3815. [[CrossRef](#)]
107. Wnorowska, U.; Fiedoruk, K.; Piktel, E.; Prasad, S.V.; Sulik, M.; Janion, M.; Daniluk, T.; Savage, P.B.; Bucki, R. Nanoantibiotics containing membrane-active human cathelicidin LL-37 or synthetic ceragenins attached to the surface of magnetic nanoparticles as novel and innovative therapeutic tools: Current status and potential future applications. *J. Nanobiotechnol.* **2020**, *18*, 3. [[CrossRef](#)]
108. Niemirowicz, K.; Piktel, E.; Wilczewska, A.Z.; Markiewicz, K.H.; Durnaś, B.; Wątek, M.; Puszczkarz, I.; Wróblewska, M.; Niklińska, W.; Savage, P.B. Core-shell magnetic nanoparticles display synergistic antibacterial effects against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* when combined with cathelicidin LL-37 or selected ceragenins. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 5443–5455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Zdarta, A.; Kaczorek, E. Nanomechanical changes in probiotic bacteria under antibiotics exposure: Implications on *Lactobacillus* biofilm formation. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Mol. Cell Res.* **2023**, *1870*, 119533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Hashemi, M.M.; Mmuoegbulam, A.O.; Holden, B.S.; Coburn, J.; Wilson, J.; Taylor, M.F.; Reiley, J.; Baradaran, D.; Stenquist, T.; Deng, S.; et al. Susceptibility of Multidrug-Resistant Bacteria, Isolated from Water and Plants in Nigeria, to Ceragenins. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*, 2758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

IX. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Szczepy wielolekooporne *A. baumannii* stanowią poważne zagrożenie dla życia i zdrowia, szczególnie w środowisku szpitalnym, gdzie wywołują trudne do leczenia infekcje. Ich oporność na większość dostępnych antybiotyków prowadzi do wysokiej śmiertelności, wydłużenia hospitalizacji i zwiększenia kosztów leczenia. Celem przeprowadzonych badań była ocena aktywności ceragenin jako substancji o potencjale zastosowania klinicznego w leczeniu zakażeń wywołanych przez wielolekooporne szczepy *A. baumannii*. Przypuszcza się, że cerageniny jako mimetyki AMP – naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych – mogą być skuteczną terapią przy niskim ryzyku wytworzeniu oporności na te związki. Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem ceragenin CSA-13, CSA-44 i CSA-131. W celu oceny ich skuteczności, działanie badanych substancji odniesiono do stosowanych w terapii leków przeciwbakteryjnych: ciprofloksacyny, meropenemu oraz kolistyny. Wpływ ceragenin zbadano na 66 szczepach *A. baumannii* – jednym szczepie laboratoryjnym oraz 65 szczepach klinicznych. Przeprowadzono oznaczenie najmniejszego stężenia hamującego (MIC), aby określić najniższe stężenie związków, które hamuje wzrost bakterii oraz zmierzono najmniejsze stężenie bakteriobójcze (MBC), które wskazuje najniższe stężenie związków zdolne do zabicia bakterii. Badania rozszerzono o wykonanie testu zliczania kolonii (ang. killing assay) po dodaniu ceragenin do zawiesiny komórek bakterii. Zbadano również zdolność ceragenin do zapobiegania tworzenia biofilmu oraz jego eradykacji. Morfologię komórek *A. baumannii* poddanych działaniu ceragenin i ich wpływ na właściwości reologiczne zbadano z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych. Oceniono również działanie cytotoksyczne ceragenin w stosunku do komórek nabłonkowych raka płuc linii A549 i antyadhezyjne działanie CSA-13. Przeprowadzone badania wykazały silną aktywność przeciwbakteryjną ceragenin wobec klinicznych szczepów *A. baumannii*, w tym szczepów opornych na karbapenemy. Wykonane badania wskazują, iż w wyniku działania ceragenin dochodzi do uszkodzenia błony komórkowej drobnoustrojów, o czym świadczą zmiany morfologii komórek *A. baumannii* poddanych działaniu ceragenin. Zaobserwowano również zdolność ceragenin do hamowania postawiania biofilmu, jak również jego eradykacji z powierzchni abiotycznej. Interesującą obserwacją jest zmniejszenie sił adhezji *A. baumannii* do komórek gospodarza przy zastosowaniu CSA-13, prowadzących do spadku zakażenia komórek. Przedstawione wyniki wskazują, iż cerageniny mają potencjał do zastosowania w terapii zakażeń wywołanych przez lekooporne szczepy *A. baumannii*.

X. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Multidrug-resistant strains of *A. baumannii* cause a serious threat to life and health, especially in hospital environment, where they cause infections that are difficult to treat. Their resistance to most available antibiotics leads to high mortality rates, prolonged hospitalization and increased treatment costs. The purpose of this study was to evaluate the activity of ceragenin as a substance with potential for clinical application in the treatment of infections caused by multidrug-resistant strains of *A. baumannii*. It is supposed that ceragenins, as mimetics of AMPs – natural antimicrobial peptides of the immune system – can be an effective therapy with a low risk of developing resistance to these compounds. The study was carried out using ceragenins CSA-13, CSA-44 and CSA-131. To evaluate their effectiveness, the effects of the test substances were related to the antibiotics used in therapy: ciprofloxacin, meropenem and colistin. The effect of ceragenins was tested on 66 strains of *A. baumannii* – 1 laboratory strain and 65 clinical strains. A minimum inhibitory concentration (MIC) assay was performed to determine the lowest concentration of compounds that inhibits bacterial growth, a minimum bactericidal concentration (MBC) was also measured, which indicates the lowest concentration of compounds capable of killing bacteria. The study was extended to perform a colony counting assay (killing assay) after adding ceragenin to a suspension of bacterial cells. The ability of ceragenins to prevent biofilm formation and its eradication was also investigated. The morphology of *A. baumannii* cells treated with ceragenins and their effect on rheological properties were examined using atomic force microscopy. The cytotoxic effect of ceragenins against lung cancer cells of the A549 line and the anti-adhesive effect of CSA-13 were also evaluated. The performed studies showed strong antimicrobial activity of ceragenins against clinical strains of *A. baumannii*, including carbapenem-resistant strains. The conducted research revealed that the action of ceragenins causes damage to the cell membrane of microorganisms as indicated by changes in the morphology of *A. baumannii* cells interacted with ceragenins. The ability of ceragenins to inhibit biofilm formation was also observed, as well as its eradication from the abiotic surface. An interesting observation of the reduction in the adhesion forces of *A. baumannii* to host cells with CSA-13, leading to a decrease in cell infection was found. The results of this research indicate that ceragenins have the potential to be used in the treatment of infections caused by drug-resistant strains of *A. baumannii*.

XI. PIŚMIENICTWO

1. Ahuatzin-Flores OE, Torres E, Chavez-Bravo E: Acinetobacter baumannii, a Multidrug-Resistant Opportunistic Pathogen in New Habitats: A Systematic Review. *Microorganisms* 2024, 12(4).
2. Mari-Almirall M, Cosgaya C, Higgins PG, Van Assche A, Telli M, Huys G, Lievens B, Seifert H, Dijkshoorn L, Roca I *et al*: MALDI-TOF/MS identification of species from the Acinetobacter baumannii (Ab) group revisited: inclusion of the novel A. seifertii and A. dijkshoorniae species. *Clin Microbiol Infect* 2017, 23(3):210 e211-210 e219.
3. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, Naas T, Tande D: Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J Clin Microbiol* 2015, 53(7):2163-2171.
4. Shi J, Cheng J, Liu S, Zhu Y, Zhu M: Acinetobacter baumannii: an evolving and cunning opponent. *Front Microbiol* 2024, 15:1332108.
5. Greene C, Wu J, Rickard AH, Xi C: Evaluation of the ability of Acinetobacter baumannii to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. *Lett Appl Microbiol* 2016, 63(4):233-239.
6. Spellberg B, Bonomo RA: "Airborne assault": a new dimension in Acinetobacter baumannii transmission*. *Crit Care Med* 2013, 41(8):2042-2044.
7. Yakupogullari Y, Otlu B, Ersoy Y, Kuzucu C, Bayindir Y, Kayabas U, Togonal T, Kizilkaya C: Is airborne transmission of Acinetobacter baumannii possible: A prospective molecular epidemiologic study in a tertiary care hospital. *Am J Infect Control* 2016, 44(12):1595-1599.
8. Mousa M, Schwartz D, Carmeli Y, Nutman A: Droplet aerosol dissemination of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii surrounding ventilated patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2019, 40(3):365-367.
9. Castanheira M, Mendes RE, Gales AC: Global Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Acinetobacter baumannii-calcoaceticus Complex. *Clin Infect Dis* 2023, 76(Suppl 2):S166-S178.
10. Rumbo C, Tomas M, Fernandez Moreira E, Soares NC, Carvajal M, Santillana E, Beceiro A, Romero A, Bou G: The Acinetobacter baumannii Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect Immun* 2014, 82(11):4666-4680.

11. Smani Y, Fabrega A, Roca I, Sanchez-Encinales V, Vila J, Pachon J: Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014, 58(3):1806-1808.
12. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC, Lee SH: Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol* 2017, 7:55.
13. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B: Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clin Microbiol Rev* 2017, 30(1):409-447.
14. Espinal P, Martí S, Vila J: Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of Hospital Infection* 2012, 80(1):56-60.
15. Wendt C, Dietze B, Dietz E, Ruden H: Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997, 35(6):1394-1397.
16. Chatterjee S, Mondal A, Mitra S, Basu S: *Acinetobacter baumannii* transfers the bla_{NDM-1} gene via outer membrane vesicles. *J Antimicrob Chemother* 2017, 72(8):2201-2207.
17. Rumbo C, Fernandez-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, Mosquera A, Chaves F, Bou G: Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55(7):3084-3090.
18. Geisinger E, Vargas-Cuevas G, Mortman NJ, Syal S, Dai Y, Wainwright EL, Lazinski D, Wood S, Zhu Z, Anthony J *et al*: The Landscape of Phenotypic and Transcriptional Responses to Ciprofloxacin in *Acinetobacter baumannii*: Acquired Resistance Alleles Modulate Drug-Induced SOS Response and Prophage Replication. *mBio* 2019, 10(3).
19. Gales AC, Seifert H, Gur D, Castanheira M, Jones RN, Sader HS: Antimicrobial Susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex and *Stenotrophomonas maltophilia* Clinical Isolates: Results From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). *Open Forum Infect Dis* 2019, 6(Suppl 1):S34-S46.
20. Bartal C, Rolston KVI, Neshler L: Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Colonization, Infection and Current Treatment Options. *Infect Dis Ther* 2022, 11(2):683-694.
21. Chen CH, Lu TK: Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. *Antibiotics (Basel)* 2020, 9(1).

22. Kim M, Park J, Park W: Genomic and phenotypic analyses of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* NCCP 16007 isolated from a patient with a urinary tract infection. *Virulence* 2021, 12(1):150-164.
23. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J: Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol* 2013, 8(6):711-724.
24. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ: Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2020, 33(3).
25. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y *et al*: Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018, 18(3):318-327.
26. Sikora A, Zahra F: Nosocomial Infections. In: *StatPearls*. edn. Treasure Island (FL); 2024.
27. Khoshnood S, Sadeghifard N, Mahdian N, Heidary M, Mahdian S, Mohammadi M, Maleki A, Haddadi MH: Antimicrobial resistance and biofilm formation capacity among *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients with burns and ventilator-associated pneumonia. *J Clin Lab Anal* 2023, 37(1):e24814.
28. Pour NK, Dusane DH, Dhakephalkar PK, Zamin FR, Zinjarde SS, Chopade BA: Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2011, 62(3):328-338.
29. Mohd Sazlly Lim S, Zainal Abidin A, Liew SM, Roberts JA, Sime FB: The global prevalence of multidrug-resistance among *Acinetobacter baumannii* causing hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia and its associated mortality: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection* 2019, 79(6):593-600.
30. Gedefie A, Alemayehu E, Mohammed O, Bambo GM, Kebede SS, Kebede B: Prevalence of biofilm producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2023, 18(11):e0287211.
31. Davies D: Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2(2):114-122.
32. Gedefie A, Demsis W, Ashagrie M, Kassa Y, Tesfaye M, Tilahun M, Bisetegn H, Sahle Z: *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review. *Infect Drug Resist* 2021, 14:3711-3719.

33. Kikuchi-Ueda T, Ubagai T, Kamoshida G, Nakano R, Nakano A, Ono Y: *Acinetobacter baumannii* LOS Regulate the Expression of Inflammatory Cytokine Genes and Proteins in Human Mast Cells. *Pathogens* 2021, 10(3).
34. Erridge C, Moncayo-Nieto OL, Morgan R, Young M, Poxton IR: *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *J Med Microbiol* 2007, 56(Pt 2):165-171.
35. Marissen J, Reichert L, Hartel C, Fortmann MI, Faust K, Msanga D, Harder J, Zemlin M, Gomez de Agüero M, Masjosthusmann K *et al*: Antimicrobial Peptides (AMPs) and the Microbiome in Preterm Infants: Consequences and Opportunities for Future Therapeutics. *Int J Mol Sci* 2024, 25(12).
36. Herman A, Herman AP: Antimicrobial peptides activity in the skin. *Skin Res Technol* 2019, 25(2):111-117.
37. West NP, Pyne DB, Renshaw G, Cripps AW: Antimicrobial peptides and proteins, exercise and innate mucosal immunity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006, 48(3):293-304.
38. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK: Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules* 2018, 8(1).
39. Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, Schneider G: Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov* 2011, 11(1):37-51.
40. Zhang R, Xu L, Dong C: Antimicrobial Peptides: An Overview of their Structure, Function and Mechanism of Action. *Protein Pept Lett* 2022, 29(8):641-650.
41. Cresti L, Cappello G, Pini A: Antimicrobial Peptides towards Clinical Application-A Long History to Be Concluded. *Int J Mol Sci* 2024, 25(9).
42. Pandidan S, Mechler A: Latest developments on the mechanism of action of membrane disrupting peptides. *Biophys Rep* 2021, 7(3):173-184.
43. Kato H, Ohta K, Akagi M, Fukada S, Sakuma M, Naruse T, Nishi H, Shigeishi H, Takechi M, Aikawa T: LL-37-dsRNA Complexes Modulate Immune Response via RIG-I in Oral Keratinocytes. *Inflammation* 2023, 46(3):808-823.
44. Chen X, Zou X, Qi G, Tang Y, Guo Y, Si J, Liang L: Roles and Mechanisms of Human Cathelicidin LL-37 in Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2018, 47(3):1060-1073.
45. Bowdish DM, Davidson DJ, Scott MG, Hancock RE: Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49(5):1727-1732.

46. Carretero M, Escamez MJ, Garcia M, Duarte B, Holguin A, Retamosa L, Jorcano JL, Rio MD, Larcher F: In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37. *J Invest Dermatol* 2008, 128(1):223-236.
47. Magana M, Pushpanathan M, Santos AL, Leanse L, Fernandez M, Ioannidis A, Giulianotti MA, Apidianakis Y, Bradfute S, Ferguson AL *et al*: The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *Lancet Infect Dis* 2020, 20(9):e216-e230.
48. Pollard JE, Snarr J, Chaudhary V, Jennings JD, Shaw H, Christiansen B, Wright J, Jia W, Bishop RE, Savage PB: In vitro evaluation of the potential for resistance development to ceragenin CSA-13. *J Antimicrob Chemother* 2012, 67(11):2665-2672.
49. Paprocka P, Durnas B, Mankowska A, Sklodowski K, Krol G, Zakrzewska M, Czarnowski M, Kot P, Fortunka K, Gozdz S *et al*: New beta-Lactam Antibiotics and Ceragenins - A Study to Assess Their Potential in Treatment of Infections Caused by Multidrug-Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Drug Resist* 2021, 14:5681-5698.
50. Leszczynska K, Namiot A, Cruz K, Byfield FJ, Won E, Mendez G, Sokolowski W, Savage PB, Bucki R, Janmey PA: Potential of ceragenin CSA-13 and its mixture with pluronic F-127 as treatment of topical bacterial infections. *J Appl Microbiol* 2011, 110(1):229-238.
51. Kazakova O, Giniyatullina G, Babkov D, Wimmer Z: From Marine Metabolites to the Drugs of the Future: Squalamine, Trodusquemine, Their Steroid and Triterpene Analogues. *Int J Mol Sci* 2022, 23(3).
52. Hacioglu M, Haciosmanoglu E, Birteksoz-Tan AS, Bozkurt-Guzel C, Savage PB: Effects of ceragenins and conventional antimicrobials on *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* mono and multispecies biofilms. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019, 95(3):114863.
53. Li C, Budge LP, Driscoll CD, Willardson BM, Allman GW, Savage PB: Incremental Conversion of Outer-Membrane Permeabilizers into Potent Antibiotics for Gram-Negative Bacteria. *Journal of the American Chemical Society* 1999, 121(5):931-940.
54. Ozbek-Celik B, Damar-Celik D, Mataraci-Kara E, Bozkurt-Guzel C, Savage PB: Comparative In Vitro Activities of First and Second-Generation Ceragenins Alone and in Combination with Antibiotics Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Antibiotics (Basel)* 2019, 8(3).

55. Chmielewska SJ, Skłodowski K, Piktel E, Suprewicz Ł, Fiedoruk K, Daniluk T, Wolak P, Savage PB, Bucki R: NDM-1 Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae are Highly Susceptible to Ceragenins CSA-13, CSA-44, and CSA-131. *Infection and Drug Resistance* 2020, 13(null):3277-3294.
56. Paprocka P, Mankowska A, Skłodowski K, Krol G, Wollny T, Lesiak A, Gluszek K, Savage PB, Durnas B, Bucki R: Bactericidal Activity of Ceragenin in Combination with Ceftazidime, Levofloxacin, Co-Trimoxazole, and Colistin against the Opportunistic Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathogens* 2022, 11(6).
57. Bozkurt Guzel C, Avci NM, Savage P: In Vitro Activities of the Cationic Steroid Antibiotics CSA-13, CSA-131, CSA-138, CSA-142, and CSA-192 Against Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Turk J Pharm Sci* 2020, 17(1):63-67.
58. Bozkurt Guzel C, Oyardi O, P BS: Comparative in vitro antimicrobial activities of CSA-142 and CSA-192, second-generation ceragenins, with CSA-13 against various microorganisms. *J Chemother* 2018, 30(6-8):332-337.
59. Bozkurt-Guzel C, Savage PB, Akcali A, Ozbek-Celik B: Potential synergy activity of the novel ceragenin, CSA-13, against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from bacteremia patients. *Biomed Res Int* 2014, 2014:710273.
60. Czarnowski M, Slowinska M, Sawieljew M, Wnorowska U, Daniluk T, Krol G, Karasinski M, Okla S, Savage PB, Piktel E *et al*: Efficacy of Ceragenins in Controlling the Growth of Oral Microorganisms: Implications for Oral Hygiene Management. *Pharmaceuticals (Basel)* 2024, 17(2).
61. Hacioglu M, Yilmaz FN, Oyardi O, Bozkurt Guzel C, Inan N, Savage PB, Dosler S: Antimicrobial Activity of Ceragenins against Vancomycin-Susceptible and -Resistant *Enterococcus* spp. *Pharmaceuticals (Basel)* 2023, 16(12).
62. Oyardi O, Savage PB, Guzel CB: Effects of Ceragenins and Antimicrobial Peptides on the A549 Cell Line and an In Vitro Co-Culture Model of A549 Cells and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens* 2022, 11(9).
63. Piktel E, Oscilowska I, Suprewicz L, Depciuch J, Marcinczyk N, Chabielska E, Wolak P, Gluszek K, Klimek J, Zielinski PM *et al*: Peanut-Shaped Gold Nanoparticles with Shells of Ceragenin CSA-131 Display the Ability to Inhibit Ovarian Cancer Growth In Vitro and in a Tumor Xenograft Model. *Cancers (Basel)* 2021, 13(21).
64. Polat ZA, Cetin A, Savage PB: Evaluation of the in vitro activity of ceragenins against *Trichomonas vaginalis*. *Acta Parasitol* 2016, 61(2):376-381.

65. Suprewicz L, Szczepanski A, Lenart M, Piktel E, Fiedoruk K, Barreto-Duran E, Kula-Pacurar A, Savage PB, Milewska A, Bucki R *et al*: Ceragenins exhibit antiviral activity against SARS-CoV-2 by increasing the expression and release of type I interferons upon activation of the host's immune response. *Antiviral Res* 2023, 217:105676.
66. Wnorowska U, Fiedoruk K, Piktel E, Prasad SV, Sulik M, Janion M, Daniluk T, Savage PB, Bucki R: Nanoantibiotics containing membrane-active human cathelicidin LL-37 or synthetic ceragenins attached to the surface of magnetic nanoparticles as novel and innovative therapeutic tools: current status and potential future applications. *J Nanobiotechnology* 2020, 18(1):3.
67. Olekson MA, You T, Savage PB, Leung KP: Antimicrobial ceragenins inhibit biofilms and affect mammalian cell viability and migration in vitro. *FEBS Open Bio* 2017, 7(7):953-967.
68. Schindeler A, Yu NY, Cheng TL, Sullivan K, Mikulec K, Peacock L, Matthews R, Little DG: Local delivery of the cationic steroid antibiotic CSA-90 enables osseous union in a rat open fracture model of Staphylococcus aureus infection. *J Bone Joint Surg Am* 2015, 97(4):302-309.
69. Savage PB, Li C, Taotafa U, Ding B, Guan Q: Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 2002, 217(1):1-7.
70. Niemirowicz K, Piktel E, Wilczewska AZ, Markiewicz KH, Durnas B, Watek M, Puszkarz I, Wroblewska M, Niklinska W, Savage PB *et al*: Core-shell magnetic nanoparticles display synergistic antibacterial effects against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus when combined with cathelicidin LL-37 or selected ceragenins. *Int J Nanomedicine* 2016, 11:5443-5455.
71. Yilmaz FN, Oksuz L, Demir ES, Dosler S, Savage PB, Guzel CB: Efficacy of Ceragenins Alone and in Combinations with Antibiotics Against Multidrug-Resistant Gram Negative Pathogens from Bloodstream Infections. *Curr Microbiol* 2023, 80(10):327.
72. Bozkurt-Guzel C, Inci G, Oyardi O, Savage PB: Synergistic Activity of Ceragenins Against Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii Strains in Both Checkerboard and Dynamic Time-Kill Assays. *Curr Microbiol* 2020, 77(8):1419-1428.
73. Sklodowski K, Chmielewska SJ, Depciuch J, Deptula P, Piktel E, Daniluk T, Zakrzewska M, Czarnowski M, Ciesluk M, Durnas B *et al*: Ceragenin-Coated Non-Spherical Gold Nanoparticles as Novel Candidacidal Agents. *Pharmaceutics* 2021, 13(11).

74. Wnorowska U, Lysik D, Piktel E, Zakrzewska M, Okla S, Lesiak A, Spalek J, Mystkowska J, Savage PB, Janmey P *et al*: Ceragenin-mediated disruption of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One* 2024, 19(2):e0298112.
75. Zaugg A, Sherren E, Yi R, Larsen T, Dyck B, Stump S, Pauga F, Linder A, Takara M, Gardner E *et al*: Incorporating Ceragenins into Coatings Protects Peripherally Inserted Central Catheter Lines against Pathogen Colonization for Multiple Weeks. *Int J Mol Sci* 2023, 24(19).
76. Leszczynska K, Namiot D, Byfield FJ, Cruz K, Zendzian-Piotrowska M, Fein DE, Savage PB, Diamond S, McCulloch CA, Janmey PA *et al*: Antibacterial activity of the human host defence peptide LL-37 and selected synthetic cationic lipids against bacteria associated with oral and upper respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2013, 68(3):610-618.
77. Bucki R, Sostarecz AG, Byfield FJ, Savage PB, Janmey PA: Resistance of the antibacterial agent ceragenin CSA-13 to inactivation by DNA or F-actin and its activity in cystic fibrosis sputum. *J Antimicrob Chemother* 2007, 60(3):535-545.
78. Bahar AA, Ren D: Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)* 2013, 6(12):1543-1575.
79. Jiang H, Li L, Li Z, Chu X: Metal-based nanoparticles in antibacterial application in biomedical field: Current development and potential mechanisms. *Biomed Microdevices* 2024, 26(1):12.
80. Niemirowicz K, Prokop I, Wilczewska AZ, Wnorowska U, Piktel E, Watek M, Savage PB, Bucki R: Magnetic nanoparticles enhance the anticancer activity of cathelicidin LL-37 peptide against colon cancer cells. *Int J Nanomedicine* 2015, 10:3843-3853.
81. Niemirowicz K, Durnas B, Tokajuk G, Piktel E, Michalak G, Gu X, Kulakowska A, Savage PB, Bucki R: Formulation and candidacidal activity of magnetic nanoparticles coated with cathelicidin LL-37 and ceragenin CSA-13. *Sci Rep* 2017, 7(1):4610.
82. Niemirowicz K, Durnas B, Tokajuk G, Gluszek K, Wilczewska AZ, Misztalewska I, Mystkowska J, Michalak G, Sodo A, Watek M *et al*: Magnetic nanoparticles as a drug delivery system that enhance fungicidal activity of polyene antibiotics. *Nanomedicine* 2016, 12(8):2395-2404.
83. Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H: Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep* 2012, 64(5):1020-1037.

84. Niemirowicz K, Surel U, Wilczewska AZ, Mystkowska J, Piktel E, Gu X, Namiot Z, Kulakowska A, Savage PB, Bucki R: Bactericidal activity and biocompatibility of ceragenin-coated magnetic nanoparticles. *J Nanobiotechnology* 2015, 13:32.
85. Chmielewska SJ, Sklodowski K, Depciuch J, Deptula P, Piktel E, Fiedoruk K, Kot P, Paprocka P, Fortunka K, Wollny T *et al*: Bactericidal Properties of Rod-, Peanut-, and Star-Shaped Gold Nanoparticles Coated with Ceragenin CSA-131 against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Pharmaceutics* 2021, 13(3).
86. Chatterjee T, Chatterjee BK, Chakrabarti P: Modelling of growth kinetics of *Vibrio cholerae* in presence of gold nanoparticles: effect of size and morphology. *Sci Rep* 2017, 7(1):9671.
87. Mohamed MM, Fouad SA, Elshoky HA, Mohammed GM, Salaheldin TA: Antibacterial effect of gold nanoparticles against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Int J Vet Sci Med* 2017, 5(1):23-29.
88. Zaidi S, Misba L, Khan AU: Nano-therapeutics: A revolution in infection control in post antibiotic era. *Nanomedicine* 2017, 13(7):2281-2301.
89. Penders J, Stolzoff M, Hickey DJ, Andersson M, Webster TJ: Shape-dependent antibacterial effects of non-cytotoxic gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2017, 12:2457-2468.
90. Symonds NE, Meng EXM, Boyd JG, Boyd T, Day A, Hobbs H, Maslove DM, Norman PA, Semrau JS, Sibley S *et al*: Ceragenin-coated endotracheal tubes for the reduction of ventilator-associated pneumonia: a prospective, longitudinal, cross-over, interrupted time, implementation study protocol (CEASE VAP study). *BMJ Open* 2024, 14(2):e076720.
91. Chen H, Liu Q, Chen Z, Li C: Efficacy of sulbactam for the treatment of *Acinetobacter baumannii* complex infection: A systematic review and meta-analysis. *J Infect Chemother* 2017, 23(5):278-285.
92. Saikia S, Chetia P: Antibiotics: From Mechanism of Action to Resistance and Beyond. *Indian Journal of Microbiology* 2024.
93. Mancuso G, De Gaetano S, Midiri A, Zummo S, Biondo C: The Challenge of Overcoming Antibiotic Resistance in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria: "Attack on Titan". *Microorganisms* 2023, 11(8).
94. Broncano-Lavado A, Santamaria-Corral G, Esteban J, Garcia-Quintanilla M: Advances in Bacteriophage Therapy against Relevant MultiDrug-Resistant Pathogens. *Antibiotics (Basel)* 2021, 10(6).

95. Choi J, Jang A, Yoon YK, Kim Y: Development of Novel Peptides for the Antimicrobial Combination Therapy against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Pharmaceutics* 2021, 13(11).
96. Vila-Farres X, Callarisa AE, Gu X, Savage PB, Giralt E, Vila J: CSA-131, a ceragenin active against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2015, 46(5):568-571.
97. Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim J: Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 2008, 14(1):49-54.
98. Bozkurt-Guzel C, Hacıoglu M, Savage PB: Investigation of the in vitro antifungal and antibiofilm activities of ceragenins CSA-8, CSA-13, CSA-44, CSA-131, and CSA-138 against *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018, 91(4):324-330.
99. Bozkurt Guzel C, Hacıoglu M, Inci G, Savage PB: Antibacterial and Antibiofilm Activities of Ceragenins against *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Turk J Pharm Sci* 2019, 16(4):444-449.
100. Spalek J, Daniluk T, Godlewski A, Deptula P, Wnorowska U, Ziembicka D, Ciesluk M, Fiedoruk K, Ciborowski M, Kretowski A *et al*: Assessment of Ceragenins in Prevention of Damage to Voice Prostheses Caused by *Candida* Biofilm Formation. *Pathogens* 2021, 10(11).
101. Wang M, Lian Y, Wang Y, Zhu L: The role and mechanism of quorum sensing on environmental antimicrobial resistance. *Environ Pollut* 2023, 322:121238.
102. Roy S, Chowdhury G, Mukhopadhyay AK, Dutta S, Basu S: Convergence of Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii* Infection. *Front Med (Lausanne)* 2022, 9:793615.
103. Zhong S, He S: Quorum Sensing Inhibition or Quenching in *Acinetobacter baumannii*: The Novel Therapeutic Strategies for New Drug Development. *Front Microbiol* 2021, 12:558003.
104. Seleem NM, Abd El Latif HK, Shaldam MA, El-Ganiny A: Drugs with new lease of life as quorum sensing inhibitors: for combating MDR *Acinetobacter baumannii* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020, 39(9):1687-1702.
105. Cui B, Guo Q, Li X, Song S, Wang M, Wang G, Yan A, Zhou J, Deng Y: A response regulator controls *Acinetobacter baumannii* virulence by acting as an indole receptor. *PNAS Nexus* 2023, 2(8):pgad274.

106. Ahmad I, Nadeem A, Mushtaq F, Zlatkov N, Shahzad M, Zavialov AV, Wai SN, Uhlin BE: Csu pili dependent biofilm formation and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2023, 9(1):101.
107. Ahmad I, Nygren E, Khalid F, Myint SL, Uhlin BE: A Cyclic-di-GMP signalling network regulates biofilm formation and surface associated motility of *Acinetobacter baumannii* 17978. *Sci Rep* 2020, 10(1):1991.
108. Upmanyu K, Haq QMR, Singh R: Factors mediating *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: Opportunities for developing therapeutics. *Curr Res Microb Sci* 2022, 3:100131.
109. Pollard J, Wright J, Feng Y, Geng D, Genberg C, Savage BP: Activities of Ceragenin CSA-13 Against Established Biofilms in an In Vitro Model of Catheter Decolonization. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* 2009, 8(4):290-294.
110. Hacioglu M, Oyardi O, Bozkurt-Guzel C, Savage PB: Antibiofilm activities of ceragenins and antimicrobial peptides against fungal-bacterial mono and multispecies biofilms. *J Antibiot (Tokyo)* 2020, 73(7):455-462.
111. Birteksoz-Tan AS, Zeybek Z, Hacioglu M, Savage PB, Bozkurt-Guzel C: In vitro activities of antimicrobial peptides and ceragenins against *Legionella pneumophila*. *J Antibiot (Tokyo)* 2019, 72(5):291-297.
112. Gu X, Jennings JD, Snarr J, Chaudhary V, Pollard JE, Savage PB: Optimization of ceragenins for prevention of bacterial colonization of hydrogel contact lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, 54(9):6217-6223.
113. Williams DL, Sinclair KD, Jeyapalina S, Bloebaum RD: Characterization of a novel active release coating to prevent biofilm implant-related infections. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013, 101(6):1078-1089.
114. Sinclair KD, Pham TX, Williams DL, Farnsworth RW, Loc-Carrillo CM, Bloebaum RD: Model development for determining the efficacy of a combination coating for the prevention of perioperative device related infections: a pilot study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013, 101(7):1143-1153.
115. Hashemi MM, Rovig J, Bateman J, Holden BS, Modelzelewski T, Gueorguieva I, von Dyck M, Bracken R, Genberg C, Deng S *et al*: Preclinical testing of a broad-spectrum antimicrobial endotracheal tube coated with an innate immune synthetic mimic. *J Antimicrob Chemother* 2018, 73(1):143-150.

116. Latorre MC, Perez-Granda MJ, Savage PB, Alonso B, Martin-Rabadan P, Samaniego R, Bouza E, Munoz P, Guembe M: Endotracheal tubes coated with a broad-spectrum antibacterial ceragenin reduce bacterial biofilm in an in vitro bench top model. *J Antimicrob Chemother* 2021, 76(5):1168-1173.
117. Paiva TO, Viljoen A, Dufrene YF: Seeing the unseen: High-resolution AFM imaging captures antibiotic action in bacterial membranes. *Nat Commun* 2022, 13(1):6196.
118. Nasompag S, Siritongsuk P, Thammawithan S, Srichaiyapol O, Prangkio P, Camesano TA, Sinthuvanich C, Patramanon R: AFM Study of Nanoscale Membrane Perturbation Induced by Antimicrobial Lipopeptide C(14) KYR. *Membranes (Basel)* 2021, 11(7).
119. Grzeszczuk Z, Rosillo A, Owens O, Bhattacharjee S: Atomic Force Microscopy (AFM) As a Surface Mapping Tool in Microorganisms Resistant Toward Antimicrobials: A Mini-Review. *Front Pharmacol* 2020, 11:517165.
120. Pogoda K, Piktel E, Deptula P, Savage PB, Lekka M, Bucki R: Stiffening of bacteria cells as a first manifestation of bactericidal attack. *Micron* 2017, 101:95-102.
121. Oyardi O, Savage PB, Erturan Z, Bozkurt-Guzel C: In vitro assessment of CSA-131 and CSA-131 poloxamer form for the treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* infections in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2021, 76(2):443-450.

XII. SPIS RYCIN

Rycina 1.	Główne mechanizmy oporności <i>A. baumannii</i> . Zaadaptowano na podstawie publikacji [8].....	12
Rycina 2.	Wielokierunkowe działanie ceragenin.....	17
Rycina 3.	Schemat przedstawiający działanie ceragenin.....	18

XIII. DOROBEK NAUKOWY

13.1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

Publikacja nr 1

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Piktel Ewelina, Bucki Robert: *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. International Journal of Molecular Sciences 2024, 25, 7036. DOI: 10.3390/ijms25137036. IF = 4.9, MNiSW = 140.00

Publikacja nr 2

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Durnaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Piktel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert: *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. Pathogens 2023, 12, 1346. DOI: 10.3390/pathogens12111346. IF = 3.3, MNiSW = 100.00

13.2. Wykaz innych publikacji naukowych

Fortunka Kamila, Strzelecka Agnieszka, Król Grzegorz, Paprocka Paulina, Mańkowska Angelika, Lesiak Agata, Karpeta Urszula, Okła Sławomir, Spalek Jakub, Kaliniak Szczepan, Piktel Ewelina, **Karasiński Maciej**, Durnaś Bonita, Bucki Robert.: *Knowledge and Training Needs in Nosocomial Infection among Hospital Staff in the City of Kielce, Poland: A Cross-Sectional Study*. Journal of Nursing Management 2024, 2024(1):9243232. DOI: 10.1155/2024/9243232. IF = 3.7, MNiSW = 100.00

Czarnowski Michał, Słowińska Monika, Sawieljew Mariusz, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Król Grzegorz, **Karasiński Maciej**, Okła Sławomir, Savage Paul B., Piktel Ewelina, Bucki Robert: *Efficacy of ceragenins in controlling the growth of oral microorganisms: implications for oral hygiene management*. Pharmaceuticals 2024, 17(2), 204. DOI: 10.3390/ph17020204. IF = 4.3, MNiSW = 100.00

Król Grzegorz, Fortunka Kamila, Majchrzak Michał, Piktel Ewelina, Paprocka Paulina, Mańkowska Angelika, Lesiak Agata, **Karasiński Maciej**, Strzelecka Agnieszka, Durnaś Bonita, Bucki Robert: *Metallic nanoparticles and core-shell nanosystems in the treatment, diagnosis, and prevention of parasitic diseases*. *Pathogens* 2023, 12(6), 838. DOI: 10.3390/pathogens12060838.

IF = 3.3, MNiSW = 100.00

Gmitrzuk Julita, **Karasiński Maciej**, Malinka Zuzanna, Wiśniewska Katarzyna, Jachymek Anna, Opatowska Martyna, Jakubiec Joanna, Kucharski Tomasz: *Effects of Sleep and Insomnia on Cardiovascular Disease - Literature Review*. *Quality in Sport* 2024, 17:53050. DOI: 10.12775/QS.2024.17.53050.

IF = 0.0, MNiSW = 20.00

Jakubiec Joanna, Gmitrzuk Julita, Malinka Zuzanna, Wiśniewska Katarzyna, Jachymek Anna, Opatowska Martyna, Kucharski Tomasz, **Karasiński Maciej**: *Obesity in Adults: Causes, Health Consequences, and Treatment Methods*. *Quality in Sport* 2024, 17:53051. DOI: 10.12775/QS.2024.17.53051.

IF = 0.0, MNiSW = 20.00

XIV. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW

14.1. Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu (praca oryginalna)

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Piktel Ewelina, Bucki Robert: *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. International Journal of Molecular Sciences 2024, 25, 7036. <https://doi.org/10.3390/ijms25137036>.

Białystok, 05.08.2024

Dr n. med. Urszula Wnorowska
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Mickiewicza 2C,
15-222 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Dumaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Pikel Ewelina, Bucki Robert. *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 7036. doi: 10.3390/ijms25137036, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 5%, polegał na współuczestnictwie w opracowaniu koncepcji pracy, metodologii, walidacji danych, analizie formalnej wyników, przeprowadzeniu badań, gromadzeniu danych, przygotowaniu oryginalnego projektu, wizualizacji wyników oraz pozyskaniu funduszy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

 **PODPIS ZAUFANY**
URSZULA
WNOROWSKA
05.08.2024 11:25:31 (GMT+2)
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

.....
/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024

Dr n. med. Tamara Daniluk
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Mickiewicza 2C,
15-222 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Piktel Ewelina, Bucki Robert. *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 7036. doi: 10.3390/ijms25137036, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 5%, polegał na współuczestnictwie w opracowaniu metodologii, przeprowadzeniu badań, udostępnieniu materiałów badawczych oraz recenzji i edycji tekstu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

5.2024, Daniluk T
.....
/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024

dr inż. Piotr Deptuła
Samodzielna Pracownia Nanomedycyny
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Mickiewicza 2C,
15-222 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Luckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Pikel Ewelina, Bucki Robert. *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 7036. doi: 10.3390/ijms25137036, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 3%, polegał na współuczestnictwie w opracowaniu metodologii, przygotowaniu oryginalnego projektu oraz wizualizacji wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.


.....

Białystok, 02.08.2024

Mgr Milena Łuckiewicz
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Mickiewicza 2C,
15-222 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Piktel Ewelina, Bucki Robert. *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 7036. doi: 10.3390/ijms25137036, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 3%, polegał na współuczestnictwie w opracowaniu metodologii oraz przeprowadzeniu badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

5.08.2024. Milena Łuckiewicz
.....
/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024

Dr n. o zdr. Paulina Paprocka
Zakład Mikrobiologii i Immunologii,
Collegium Medicum, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach,
IX Wieków Kielc 19A,
25-317 Kielce

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Piktel Ewelina, Bucki Robert. *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 7036. doi: 10.3390/ijms25137036, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 3%, polegał na współuczestnictwie w walidacji danych oraz udostępnieniu materiałów badawczych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

2.08.24. v. Paulina Paprocka
/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024


Dr hab. n. med. Bonita Durnaś
Zakład Mikrobiologii i Immunologii,
Collegium Medicum, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach,
IX Wieków Kielc 19A,
25-317 Kielce

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Luckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Piktel Ewelina, Bucki Robert. *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 7036. doi: 10.3390/ijms25137036, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 5%, polegał na współuczestnictwie w walidacji danych oraz udostępnieniu materiałów badawczych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

19.08.2024 
.....
/data, podpis/

Białystok, 05.08.2024

Mgr Karol Skłodowski
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Mickiewicza 2C,
15-222 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Piktel Ewelina, Bucki Robert. *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 7036. doi: 10.3390/ijms25137036, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 3%, polegał na współuczestnictwie w opracowaniu metodologii.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

05.08.24r. Karol Skłodowski

/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024

Dr n. med. Beata Sawczuk
Zakład Protetyki Stomatologicznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A,
15-276 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Pikel Ewelina, Bucki Robert. *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 7036. doi: 10.3390/ijms25137036, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 3%, polegał na współuczestnictwie w opracowaniu metodologii.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

4.08.24 Beata Sawczuk
.....
/data, podpis/

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
AND BIOCHEMISTRY
BRIGHAM YOUNG UNIVERSITY
C-100 BNSN
PROVO, UT 84602
(801) 422-3667 / FAX: (801) 422-0153



August 2, 2024

Professor Paul B. Savage
Department of Chemistry
and Biochemistry
Brigham Young University
Provo, UT 84602

STATEMENT

I declare and confirm my participation in the publication:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Piktel Ewelina, Bucki Robert. *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 7036, doi: 10.3390/ijms25137036, which will be included in the doctoral dissertation of Maciej Karasiński, MD. My participation was 3% and consisted of providing research materials.

I agree that Maciej Karasiński, MD, may use the publication described above in the proceedings for granting the degree of doctor of medical sciences.

 8/2/24

.....
/date, signature/

Białystok, 02.08.2024

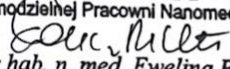
Dr hab. n. med. Ewelina Pikel
Samodzielna Pracownia Nanomedycyny,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Mickiewicza 2B,
15-222 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Pikel Ewelina, Bucki Robert. *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 7036. doi: 10.3390/ijms25137036, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 3%, polegał na współuczestnictwie w opracowaniu metodologii, walidacji danych, przeprowadzeniu badań oraz wizualizacji wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

ADIUNKT
Samodzielnej Pracowni Nanomedycyny

dr hab. n. med. Ewelina Pikel

.....
/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024

Prof. dr hab. Robert Bucki
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Mickiewicza 2C,
15-222 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Daniluk Tamara, Deptuła Piotr, Łuckiewicz Milena, Paprocka Paulina, Durnaś Bonita, Skłodowski Karol, Sawczuk Beata, Savage Paul B., Pikel Ewelina, Bucki Robert. *Investigating the Effectiveness of Ceragenins against Acinetobacter baumannii to Develop New Antimicrobial and Anti-Adhesive Strategies*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 7036. doi: 10.3390/ijms25137036, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 4%, polegał na współuczestnictwie w opracowaniu koncepcji pracy, analizie formalnej wyników, przeprowadzeniu badań, udostępnieniu materiałów badawczych, recenzji i edycji tekstu, nadzorowaniu oraz administrowaniu projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.



02.08.2024
/data, podpis/

<i>Imię i nazwisko współautora</i>	<i>Charakter udziału</i>	<i>Procentowy wkład</i>
doktorant – lek. Maciej Karasiński	Opracowanie koncepcji pracy, metodologii, walidacja danych, analiza formalna wyników, przeprowadzenie badań, gromadzenie danych, przygotowanie oryginalnego projektu, wizualizacja wyników, administrowanie projektem.	60%
dr n. med. Urszula Wnorowska	Udział w opracowaniu koncepcji pracy, metodologii, walidacja danych, analiza formalna wyników, przeprowadzenie badań, gromadzenie danych, przygotowanie oryginalnego projektu, wizualizacja wyników, pozyskiwanie funduszy.	5%
dr n. med. Tamara Daniluk	Udział w opracowaniu metodologii, przeprowadzenie badań, udostępnienie materiałów badawczych, recenzja i edycja tekstu.	5%
dr inż. Piotr Deptuła	Udział w opracowaniu metodologii, przygotowanie oryginalnego projektu, wizualizacja wyników.	3%
mgr Milena Łuckiewicz	Udział w opracowaniu metodologii, przeprowadzeniu badań.	3%
dr n. o zdr. Paulina Paprocka	Walidacja danych, udostępnienie materiałów badawczych.	3%
dr hab. n. med. Bonita Durnaś	Walidacja danych, udostępnienie materiałów badawczych.	5%
mgr Karol Skłodowski	Udział w opracowaniu metodologii.	3%
dr n. med. Beata Sawczuk	Udział w opracowaniu metodologii.	3%
prof. Paul B. Savage	Udostępnienie materiałów badawczych.	3%

dr hab. n. med. Ewelina Pikel	Udział w opracowaniu metodologii, walidacja danych, przeprowadzenie badań, wizualizacja wyników.	3%
prof. dr hab. Robert Bucki	Udział w opracowaniu koncepcji pracy, analiza formalna wyników, przeprowadzenie badań, udostępnienie materiałów badawczych, recenzja i edycja tekstu, nadzorowanie, administrowanie projektem.	4%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego.

Podpis doktoranta

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Podpis promotora

14.2. Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu (praca przeglądowa)

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Durnaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Piktel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert: *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. Pathogens 2023, 12, 1346. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111346>.

Białystok, 05.08.2024

Dr n. med. Urszula Wnorowska
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Mickiewicza 2C,
15-222 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Dumaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Piktel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert. *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. *Pathogens* 2023, 12, 1346, doi: 10.3390/pathogens12111346, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 5%, polegał na współuczestnictwie w zbiorze literatury, analizie literatury oraz redakcji tekstu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.



.....
/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024

Dr hab. n. med. Bonita Durnaś
Zakład Mikrobiologii i Immunologii,
Collegium Medicum, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach,
IX Wieków Kielc 19A,
25-317 Kielce

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Durnaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Piktel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert. *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. Pathogens 2023, 12, 1346, doi: 10.3390/pathogens12111346, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 5%, polegał na współuczestnictwie w redagowaniu tekstu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

18.08.2024 B. Durnaś
.....
/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024

Dr n. biol. Grzegorz Król
Zakład Mikrobiologii i Immunologii,
Collegium Medicum, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach,
IX Wieków Kielc 19A,
25-317 Kielce

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Durnaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Piktel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert. *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. *Pathogens* 2023, 12, 1346, doi: 10.3390/pathogens12111346, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 5%, polegał na współuczestnictwie w redagowaniu tekstu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

05.08.2024 Grzegorz Król
.....
/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024

Dr n. med. Tamara Daniluk
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Mickiewicza 2C,
15-222 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Durnaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Piktel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert. *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. *Pathogens* 2023, 12, 1346, doi: 10.3390/pathogens12111346, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 5%, polegał na współuczestnictwie w redagowaniu tekstu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

5.08.24, Daniluk
.....
/data, podpis/

Białystok, 05.08.2024

Mgr Karol Skłodowski
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Mickiewicza 2C,
15-222 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Durnaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Pikel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert. *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. *Pathogens* 2023, 12, 1346, doi: 10.3390/pathogens12111346, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 5%, polegał na współuczestnictwie w redagowaniu tekstu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

05.08.2024 r. Karol Skłodowski
/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024

Dr n. farm. Katarzyna Głuszek
Zakład Mikrobiologii i Immunologii,
Collegium Medicum, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach,
IX Wieków Kielc 19A,
25-317 Kielce

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Dumaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Piktel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert. *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. Pathogens 2023, 12, 1346, doi: 10.3390/pathogens12111346, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 5%, polegał na współuczestnictwie w redagowaniu tekstu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

3.08.2024 Katarzyna Głuszek
.....
/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024

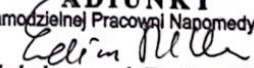
Dr hab. n. med. Ewelina Piktel
Samodzielna Pracownia Nanomedycyny,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Mickiewicza 2B,
15-222 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Durnaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Piktel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert. *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. Pathogens 2023, 12, 1346, doi: 10.3390/pathogens12111346, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 5%, polegał na współuczestnictwie w zbiorze literatury oraz redagowaniu tekstu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

ADIUNKT
Samodzielnej Pracowni Nanomedycyny

dr hab. n. med. Ewelina Piktel

.....
/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024

Dr n. med. Sławomir Okła
Klinika Otolaryngologii, Chirurgii Głowy i Szyi,
Świętokrzyskie Centrum Onkologii,
Artwińskiego 3,
25-734 Kielce

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Durnaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Piktel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert. *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. *Pathogens* 2023, 12, 1346, doi: 10.3390/pathogens12111346, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 5%, polegał na współuczestnictwie w redagowaniu tekstu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

02.08.2024 Sławomir Okła
/data, podpis/

Białystok, 02.08.2024

Prof. dr hab. Robert Bucki
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Mickiewicza 2C,
15-222 Białystok

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w publikacji:

Karasiński Maciej, Wnorowska Urszula, Durnaś Bonita, Król Grzegorz, Daniluk Tamara, Skłodowski Karol, Głuszek Katarzyna, Piktel Ewelina, Okła Sławomir, Bucki Robert. *Ceragenins and Ceragenin-Based Core-Shell Nanosystems as New Antibacterial Agents against Gram-Negative Rods Causing Nosocomial Infections*. *Pathogens* 2023, 12, 1346, doi: 10.3390/pathogens12111346, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego, wynoszący 5%, polegał na współuczestnictwie w opracowaniu koncepcji pracy oraz redagowaniu tekstu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Macieja Karasińskiego powyższej publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.



02.08.2024.
/data, podpis/

<i>Imię i nazwisko współautora</i>	<i>Charakter udziału</i>	<i>Procentowy wkład</i>
doktorant – lek. Maciej Karasiński	Udział w opracowaniu koncepcji pracy, zbiór literatury, analiza literatury, stworzenie tekstu manuskryptu.	55%
dr n. med. Urszula Wnorowska	Zbiór literatury, analiza literatury, redakcja tekstu manuskryptu.	5%
dr hab. n. med. Bonita Durnaś	Udział w redagowaniu tekstu manuskryptu.	5%
dr n. biol. Grzegorz Król	Udział w redagowaniu tekstu manuskryptu.	5%
dr n. med. Tamara Daniluk	Udział w redagowaniu tekstu manuskryptu.	5%
mgr Karol Skłodowski	Udział w redagowaniu tekstu manuskryptu.	5%
dr n. farm. Katarzyna Głuszek	Udział w redagowaniu tekstu manuskryptu.	5%
dr hab. n. med. Ewelina Piktel	Zbiór literatury, redagowanie tekstu manuskryptu.	5%
dr n. med. Sławomir Okła	Udział w redagowaniu tekstu manuskryptu.	5%
prof. dr hab. Robert Bucki	Udział w opracowaniu koncepcji pracy, redagowanie tekstu manuskryptu.	5%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Macieja Karasińskiego.

Podpis doktoranta

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Podpis promotora

XV. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU

ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, dn. 19.10.2023 r.

APK.002.406.2023

Sz. P.
prof. dr hab. Robert Bucki
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
i Inżynierii Nanobiomedycznej

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku po zapoznaniu się z pismem z dnia 09.10.2023 r., dotyczącym badań prowadzonych z wykorzystaniem archiwalnych szczepów bakteryjnych oraz grzybiczych, których celem jest realizacja projektów naukowych, oceniających aktywność przeciwdrobnoustojową substancji aktywnych błonowo, głównie z grupy ceragenin informuje, iż w związku z faktem, że w przedmiotowym badaniu nie ma kontaktu z uczestnikiem badania ani materiałem biologicznym, dlatego nie spełnia on definicji eksperymentu medycznego. W związku z powyższym nie wymaga zgody Komisji Bioetycznej.

Z poważaniem
prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka
Przewodnicząca Komisji Bioetycznej
przy Uniwersytecie Medycznym
w Białymstoku