Autoreferat

Krótkie kationowe lipopeptydy – ocena właściwości biologicznych pod kątem potencjalnego zastosowania w walce z biofilmem bakteryjnym

dr n. farm. Małgorzata Anna Paduszyńska

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej
Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny
Gdańsk, 2020

1. **Imię i nazwisko:**

Małgorzata Anna Paduszyńska (Dawgul)

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

10 czerwiec 2014 – doktor nauk farmaceutycznych
Wydział Farmaceutyczny z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Rozprawa doktorska pt. „Badanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych pod kątem ich potencjalnego zastosowania w gronkowcowych infekcjach skórnych";
Promotor prof. dr hab. Wojciech Kamysz

31 marzec 2009 – magister farmacji
Wydział Farmaceutyczny z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;
Promotor prof. dr hab. Wojciech Kamysz

3. **Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

2017 – obecnie: adiunkt
Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z OML, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej (11.2018 – 11.2019 urlop macierzyński, rodzicielski; 09.2020 – obecnie – urlop macierzyński)

2012 – 2017: asystent
Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z OML, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej (03.2015 – 07.2016 urlop bezpłatny)

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Krótkie kationowe lipopeptydy – ocena właściwości biologicznych pod kątem potencjalnego zastosowania w walce z biofilmem bakteryjnym

a) wykaz publikacji naukowych wchodzących w skład osiągnięcia

4.1. #**DAWGUL MAŁGORZATA***, Greber Katarzyna Ewa, Sawicki Wiesław, Kamysz Wojciech. *Human host defense peptides: role in maintaining human homeostasis and pathological processes*. Curr. Med. Chem. 2017: vol. 24, nr 7, s. 654-672. Impact Factor: 3,469; Punktacja MNiSW: 40

4.2. Greber Katarzyna Ewa, **DAWGUL MAŁGORZATA**, Kamysz Wojciech, Sawicki Wiesław. *Cationic net charge and counter ion type as antimicrobial activity determinant factors of short lipopeptides.* Front. Microbiol. 2017: vol. 8, art. 123, s. [1-10]. Impact Factor: 4,019; Punktacja MNiSW: 35

4.3. Greber Katarzyna Ewa, **DAWGUL MAŁGORZATA**, Kamysz Wojciech, Sawicki Wiesław, Łukasiak Jerzy. *Biological and surface-active properties of double-chain cationic amino acid-based surfactants.* Amino Acids 2014: vol. 46, nr 8, s. 1893-1898. Impact Factor: 3.293; *Punktacja MNiSW: 30*

4.4. **PADUSZYŃSKA MAŁGORZATA ANNA***§, Maciejewska Magdalena§, Neubauer Damian, Gołacki Krzysztof, Szymukowicz Magdalena, Bauer Marta, Kamysz Wojciech. *Influence of short cationic lipopeptides with fatty acids of different chain lengths on bacterial biofilms formed on polystyrene and hydrogel surfaces.* Pharmaceutics 2019: vol. 11, nr 10, art. ID 506, s. 1-15. Impact Factor: 4,421; Punktacja MNiSW: 100

4.5. Maciejewska Magdalena§, Bauer Marta§, Neubauer Damian, Kamysz Wojciech, **DAWGUL MAŁGORZATA***. *Influence of amphibian antimicrobial peptides and short lipopeptides on bacterial biofilms formed on contact lenses.* Materials. 2016: vol. 9, nr 11, art. 873, s. [1-12]. Impact Factor: 2,654; Punktacja MNiSW: 35

4.6. **PADUSZYŃSKA MAŁGORZATA ANNA***, Maciejewska Magdalena, Greber Katarzyna Ewa, Sawicki Wiesław, Kamysz Wojciech. *Antibacterial activities of lipopeptide* $(C_{10})_2$*-KKKK-*NH_2 *applied alone and in combination with lens liquids to fight biofilms formed on polystyrene surfaces and contact lenses.* Int. J. Mol. Sci. 2019 : vol. 20, nr 2, art. ID 393, s. 1-19. Impact Factor: 4,556 Punktacja MNiSW: 140

4.7. **PADUSZYŃSKA MAŁGORZATA ANNA***, Greber Katarzyna Ewa, Paduszyński Wojciech, Sawicki Wieslaw, Kamysz Wojciech. Activity of temporin A and short lipopeptides combined with gentamicin against biofilm formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa.* Antibiotics 2020: vol. 9, nr 9, art. ID 566, s. 1-14. Impact Factor: 3,893; Punktacja MNiSW: 70

***** Autor korespondencyjny
§ Równorzędny pierwszy autor
# Praca poglądowa

Sumaryczny IF osiągnięcia: 26,305; Sumaryczna punktacja MNiSW osiągnięcia: 450
Szczegółowy udział w poszczególnych pracach podano w "Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny".

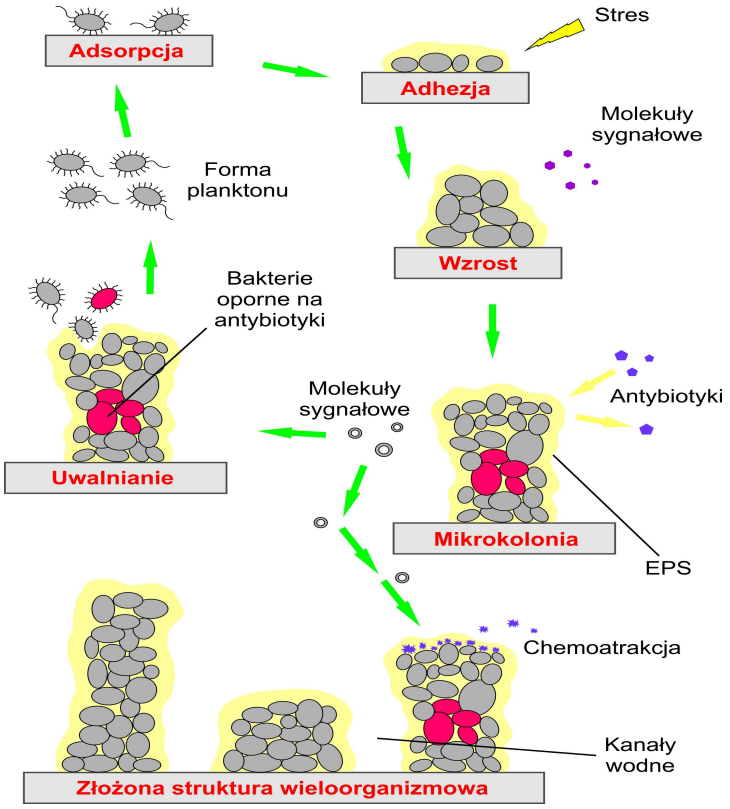
b) omówienie celu naukowego badań przeprowadzonych w ramach prac wchodzących w skład osiągnięcia, otrzymanych wyników oraz ich potencjalnego zastosowania

Wprowadzenie:

Krótkie lipopeptydy – związki zaprojektowane w oparciu o przesłanki dotyczące endogennych peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Pomimo wysokiego poziomu rozwoju nauk medycznych i farmaceutycznych, choroby infekcyjne pozostają jedną z głównych przyczyn zgonów pacjentów na świecie. Wynika to ze zdolności przystosowawczych mikroorganizmów do przetrwania w niekorzystnych warunkach, na które składają się nabywanie cech oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe oraz zjawisko formowania biofilmu.

Biofilm to wysoce wyspecjalizowane trójwymiarowe struktury formowane przez drobnoustroje na powierzchni tkanek oraz biomateriałów. Mikroorganizmy egzystujące w tej postaci wykazują nawet 1000-krotnie niższą wrażliwość na terapię antybiotykową w porównaniu z organizmami tych samych szczepów w formie wolnopływającej [1, 2]. Jest ona wynikiem zmian przystosowawczych komórek biofilmu tj. spowolnienia tempa metabolizmu, zmian ekspresji genów oraz utrudnionego dostępu do bakterii otoczonych egzopolisacharydem (EPS), położonych w głębszych warstwach struktury [3-5]. Strukturę biofilmu oraz etapy rozwoju zaprezentowano na ryc. 1.



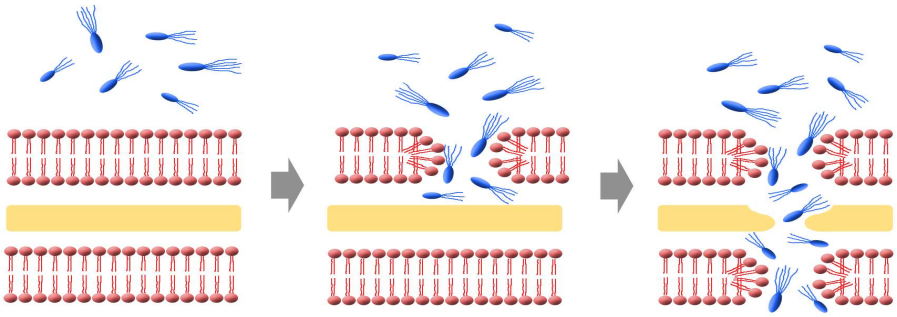
Rycina 1. Schemat rozwoju i struktura biofilmu

Infekcje związane z biofilmem zazwyczaj rozwijają się jako powikłanie stosowania powszechnych wyrobów medycznych tj. implantów, cewników, protez oraz soczewek kontaktowych, w wyniku ich kolonizacji przez bakterie następujących gatunków: *Staphylococcus aureus* (SA), *Staphylococcus epidermidis* (SE), *Enterococcus faecalis* (EF), *Streptococcus viridans* (SV), *Escherichia coli* (EC), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Proteus mirabilis* (PM) i *Pseudomonas aeruginosa* (PA) [6-11]. W ostatnich latach obserwuje się wzrost częstości występowania infekcji odbiomateriałowych. Są one ściśle związane ze zwiększoną śmiertelnością oraz wzrostem kosztów leczenia. Szacuje się, że stanowią one około 80% infekcji o charakterze przewlekłym [12, 13]. Poza tym zakażenia związane z biofilmem wykazują tendencje do powracania po wycofaniu zastosowanej antybiotykoterapii. Zjawisko to jest związane z występowaniem populacji komórek zwanych *persiter cells*, które przetrwają ekspozycję na zastosowane środki przeciwdrobnoustrojowe i zapoczątkują ponowne tworzenie biofilmu po jego wycofaniu ze środowiska [14, 15].

Pomimo wysokiego poziomu zaawansowania wykorzystywanych biomateriałów, jak i szerokiej gamy dostępnych środków przeciwdrobnoustrojowych, opracowanie skutecznych metod profilaktyki zwalczania infekcji związanych z biofilmem nadal stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny. Jedną z szeroko badanych strategii jest wykorzystanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych (antimicrobial peptides, AMPs, host defence peptides, HDPs) jako alternatywy lub uzupełnienia konwencjonalnej antybiotykoterapii.

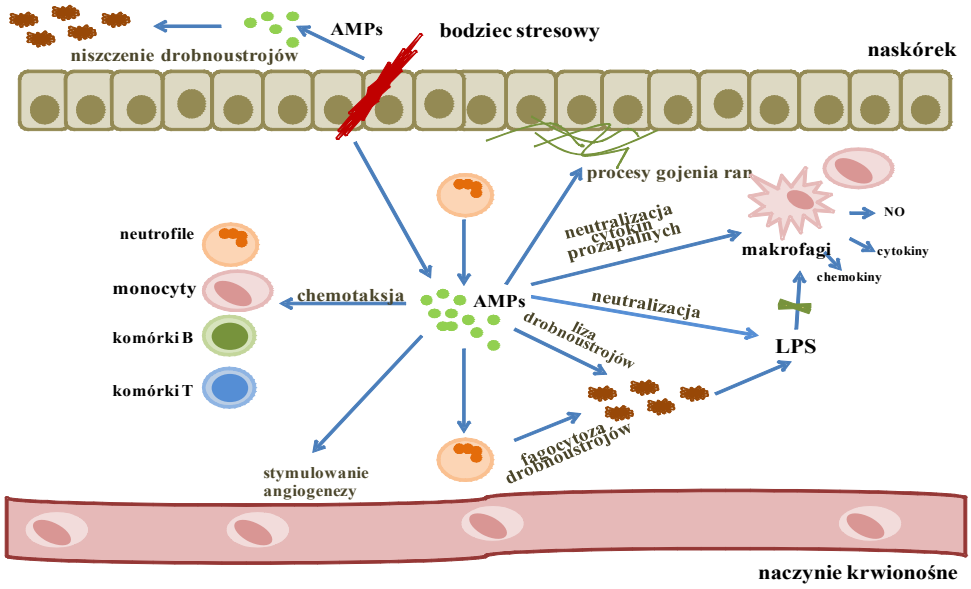
AMPs są produkowane przez organizmy eukariotyczne celem ochrony przed patogenami. Organizm ludzki wydziela ponad 100 związków sklasyfikowanych jako AMPs. Zdecydowana większość peptydów opisanych w Antimicrobial Peptide Database wykazuje działanie bakteriobójcze wobec szerokiego spektrum bakterii oparte na dezintergracji błony komórkowej drobnoustrojów [16, 17]. Uproszony schemat mechanizmu działania przedstawiono na ryc. 2. Niespecyficzny mechanizm działania peptydów jest związany z ich potencjalną toksycznością. Jednak ich szerokie rozpowszechnienie w organizmie ludzkim oraz wyniki badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych sugerują brak działania toksycznego [18-21]. Uważa się, że różnice w budowie błony komórkowej tj. obecność cholesterolu oraz asymetryczne rozmieszczenie fosfolipidów w błonie komórek eukariotycznych warunkuje pewną selektywność działania AMPs. Ponadto stwierdzono, że warunki fizjologiczne np. obecność składników osocza mogą ograniczać aktywność cytotoksyczną peptydów *in vivo* [22, 23]. W porównaniu do antybiotyków o specyficznym mechanizmie działania, ryzyko rozwoju oporności w wobec AMPs jest znacznie niższe. Poza tym brak konkretnego celu w komórce bakteryjnej determinuje aktywność peptydów

w stosunku do komórek o spowolnionym metabolizmie i wolnym tempie wzrostu, a tym samym także wobec drobnoustrojów w formie biofilmu [16].



Rycina 2. Mechanizm działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych na błonę bakteryjną

Dla licznych AMPs potwierdzono także aktywność przeciwgrzybiczą, przeciwwirusową, przeciwpasożytniczą, a nawet przeciwnowotworową. Poza bezpośrednim działaniem przeciwdrobnoustrojowym, AMPs prezentują także właściwości immunomodulujące. Wzmagają odpowiedź układu immunologicznego na inwazję patogenów poprzez interakcje z neutrofilami, monocytami, komórkami T oraz stymulację produkcji cytokin. Niektóre związki jak np. LL-37 wykazują zdolność do neutralizacji endotoksyn i przeciwdziałania rozwojowi szoku septycznego w następstwie infekcji bakteriami Gram-ujemnymi. Ponadto wykazano, iż ludzkie AMPs odgrywają kluczową rolę w procesie gojenia ran. Uproszczony schemat roli peptydów w odpowiedzi immunologicznej zaprezentowano na ryc. 3, natomiast szczegółowy opis właściwości biologicznych AMPs oraz ich roli w utrzymaniu homeostazy organizmu ludzkiego został przedstawiony w pracy poglądowej wchodzącej w skład osiągnięcia (**publikacja nr 4.1**).



Rycina 3. Funkcje AMP w odpowiedzi immunologicznej organizmu ludzkiego na inwazję drobnoustrojów

Biologiczne właściwości AMPs czynią z nich interesującą matrycę do poszukiwania związków przeciwdrobnoustrojowych. Jednak pomimo szeregu zalet istnieje także wiele ograniczeń dla ich realnego zastosowania w terapii infekcji np. potencjalna toksyczność, alergenność, niska biodostępność oraz wysokie koszty produkcji. W związku z powyższym liczne zespoły naukowe zajmują się projektowaniem i otrzymywaniem związków aktywnych w oparciu o AMPs, m.in. analogów o krótszych łańcuchach, kongenerów oraz peptydomimetyków wykazujących właściwości bakteriobójcze.

W wyniku badań dążących do optymalizacji biologicznych oraz fizykochemicznych właściwości AMPs opracowano krótkie syntetyczne lipopeptydy. Związki prezentują podobną aktywność przeciwdrobnoustrojową do peptydów endogennych, natomiast ich otrzymywanie wymaga mniejszego zużycia materiałów oraz krótszego czasu, a tym samym jest znacznie mniej kosztowne w porównaniu z pozyskiwaniem AMPs o dłuższych łańcuchach.

Większość naturalnie występujących AMPs posiada sumaryczny ładunek dodatni oraz właściwości amfipatyczne, co determinuje aktywność mikrobiologiczną cząsteczek. W przypadku syntetycznych lipopeptydów pożądane cechy strukturalne osiąga się poprzez acylację krótkiego łańcucha peptydowego za pomocą reszty kwasu tłuszczowego. Ładunek dodatni zapewniają aminokwasy zasadowe, natomiast sprzężenie z hydrofobową resztą kwasu tłuszczowego pozwala uzyskać właściwości amfipatyczne. Taka struktura zapewnia właściwości powierzchniowo-czynne i umożliwia oddziaływania z negatywnie naładowaną błoną drobnoustroju, prowadzące do lizy komórki. Ponadto wykazano, że acylacja za pomocą reszty kwasu tłuszczowego pozwala poszerzyć spektrum działania mikrobiologicznego oraz ograniczyć degradację proteolityczną związków. Dotychczas zidentyfikowano liczne krótkie syntetyczne lipopeptydy wykazujące wysoką aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwgrzybiczą. Potwierdzono ich aktywność zarówno wobec szczepów referencyjnych, jak i klinicznych różnych gatunków drobnoustrojów, w tym opornych na antybiotyki konwencjonalne oraz wobec biofilmu.

Celem moich badań było otrzymanie grupy krótkich lipopeptydów charakteryzujących się wysoką aktywnością przeciwdrobnoustrojową i przeprowadzenie oceny ich potencjału jako alternatywy lub uzupełnienia środków konwencjonalnych stosowanych w ramach profilaktyki i zwalczaniu infekcji związanych z biofilmem.

Badania własne

Aktywność przeciwbakteryjna oraz przeciwgrzybicza krótkich lipopeptydów wobec komórek drobnoustrojów w formie wolnopływającej. Aktywność hemolityczna.

Badania przeprowadzone w ramach **publikacji nr 4.2 oraz 4.3.** obejmowały syntezę 40 lipopeptydów zawierających jedną lub dwie reszty następujących kwasów tłuszczowych: oktanowego, dekanowego, dodekanowego, tetradekanowego oraz heksadekanowego, sprzężonych z krótkimi łańcuchami zawierającymi od 1 do 4 reszt aminokwasowych. Wszystkie łańcuchy peptydowe posiadały ładunek dodatni warunkowany obecnością reszt lizyny. Sekwencje aminokwasowe otrzymanych związków zaprezentowano w tab. 1.

Tabela. 1. Sekwencje aminokwasowe, sumaryczny ładunek oraz masa cząsteczkowa [Da] krótkich lipopeptydów zawierających reszty kwasy tłuszczowych o różnej długości łańcucha (gdzie: K – reszta lizyny; G – reszta glicyny; C_8 – reszta kwasu oktanowego, C_{10} – reszta kwasu dekanowego, C_{12} – reszta kwasu dodekanowego, C_{14} – reszta kwasu tetradekanowego, C_{16} – reszta kwasu heksadekanowego).

Związek	Ładunek	Masa cząsteczkowa
C_{16}-K-NH_2	+1	383,6
C_{16}-KK-NH_2	+2	511,8
C_{16}-KKK-NH_2	+3	639,9
C_{16}-KKKK-NH_2	+4	768,1
$(C_{16})_2$-KKKK-NH_2	+3	1006,5
C_{16}-KG-NH_2	+1	440,7
C_{16}-KGK-NH_2	+2	568,8
C_{16}-KGKG-NH_2	+2	625,9
C_{14}-K-NH_2	+1	355,6
C_{14}-KK-NH_2	+2	483,7
C_{14}-KKK-NH_2	+3	611,9
C_{14}-KKKK-NH_2	+4	740,1
$(C_{14})_2$-KKKK-NH_2	+3	950,4
C_{14}-KG-NH_2	+1	412,6
C_{14}-KGK-NH_2	+2	540,8
C_{14}-KGKG-NH_2	+2	597,8
C_{12}-K-NH_2	+1	327,5
C_{12}-KK-NH_2	+2	455,7
C_{12}-KKK-NH_2	+3	583,8

C_{12}-KKKK-NH_2	+4	712,0
$(C_{12})_2$-KKKK-NH_2	+3	894,3
C_{12}-KG-NH_2	+1	384,6
C_{12}-KGK-NH_2	+2	512,7
C_{12}-KGKG-NH_2	+2	569,8
C_{10}-K-NH_2	+1	299,5
C_{10}-KK-NH_2	+2	427,6
C_{10}-KKK-NH_2	+3	555,8
C_{10}-KKKK-NH_2	+4	683,9
$(C_{10})_2$-KKKK-NH_2	+3	838.2
C_{10}-KG-NH_2	+1	356,5
C_{10}-KGK-NH_2	+2	484,7
C_{10}-KGKG-NH_2	+2	541,7
C_8-K-NH_2	+1	271,4
C_8-KK-NH_2	+2	399,6
C_8-KKK-NH_2	+3	527,7
C_8-KKKK-NH_2	+4	655,9
$(C_8)_2$-KKKK-NH_2	+3	782,1
C_8-KG-NH_2	+1	328,5
C_8-KGK-NH_2	+2	456,6
C_8-KGKG-NH_2	+2	513,7

Dla otrzymanych związków przeprowadziłam ocenę aktywności mikrobiologicznej w stosunku do referencyjnych szczepów bakterii Gram-dodatnich: *Bacillus subtilis* (BS), EF, SA, SE; Gram-ujemnych: EC, KP, PA, *Proteus vulgaris* (PV) oraz grzybów: *Aspergillus brasilliensis, Candida albicans* i *C. tropicalis*. Drobnoustroje zawieszone w pożywce płynnej poddałam ekspozycji na badane związki w celu oznaczenia minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC), a następnie minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) oraz grzybobójczego (MFC).

Wśród lipopeptydów zawierających jedną resztę kwasu tłuszczowego najwyższą aktywność prezentowały związki zawierające kwas heksadekanowy. Związki o sumarycznym ładunku wyższym niż +1 wykazały aktywność bakteriobójczą zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych z wyjątkiem szczepu PV, który był niewrażliwy na działanie

związków peptydowych. Dla pozostałych szczepów otrzymane wartości MIC mieściły się w zakresie 2-16 mg/L, natomiast MBC były równe MIC lub dwukrotnie wyższe. Na podstawie otrzymanych wyników związki można określić jako wysoce aktywne wobec bakterii Gram-dodatnich oraz aktywne w stosunku do szczepów Gram-ujemnych (poza PV) zgodnie z klasyfikacją aktywności mikrobiologicznej peptydów podaną przez Shai i współpracowników [24]. Związki o sumarycznym ładunku równym +1 wykazały podobne działanie wobec większości bakterii Gram-dodatnich oraz grzybów, natomiast ich aktywność wobec szczepów Gram-ujemnych była znacznie niższa w porównaniu do lipopeptydów o wyższym ładunku dodatnim. Zgodnie z podaną klasyfikacją lipopeptydy zawierające kwas heksadekanowy zaprezentowały niską aktywność wobec badanych gatunków grzybów. Jednakże, podobnie jak w przypadku bakterii otrzymane wartości MFC były równe lub dwukrotnie wyższe w porównaniu z MIC, co wskazuje na działanie grzybobójcze.

Lipopeptydy zawierające kwas tetradekanowy prezentowały niższą aktywność w porównaniu ze związkami z kwasem heksadekanowym. Większość została sklasyfikowana jako wysoce aktywne w stosunku do SE i BS oraz aktywne wobec SA i EF. Wyniki aktywności przeciwgrzybiczej były zbliżone do wartości otrzymanych dla lipopeptydów zawierających reszty kwasu heksadekanowego. Natomiast ich działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-ujemnych było znacznie słabsze w porównaniu z tymi związkami. Lipopeptydy zawierające jedną resztę kwasów dekanowego oraz dodekanowego wykazały pewne właściwości przeciwdrobnoustrojowe w stosunku do SE oraz BS oraz słabą aktywność wobec SA i EF. Przy czym w przypadku tych związków lepsze efekty uzyskano dla lipopeptydów o ładunku sumarycznym +1 niż dla tych o wyższym ładunku. Związki zawierające resztę kwasu oktanowego okazały się nieaktywne wobec bakterii Gram-dodatnich. Lipopeptydy zawierające jedną resztę kwasów oktanowego, dekanowego oraz dodekanowego wykazały bardzo słabe właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii Gram-ujemnych oraz grzybów lub okazały się zupełnie nieaktywne w zakresie badanych stężeń.

W przypadku lipoeptydów zawierających dwie reszty kwasów tłuszczowych najlepsze wyniki otrzymałam dla związków zawierających kwas dekanowy oraz dodekanowy. Wykazały one wysoką aktywność bakteriobójczą wobec szczepów Gram-dodatnich oraz zostały sklasyfikowane jako aktywne w stosunku do większości bakterii Gram-ujemnych. Podobnie jak w przypadku lipopeptydów zawierających jedną resztę kwasu tłuszczowego, PV był niewrażliwy na działanie związków. Zahamowanie wzrostu oraz działanie grzybobójcze uzyskałam dopiero po ekspozycji szczepów na związki zawierające kwas dekanowy oraz dodekanowy zastosowane w bardzo wysokich stężeniach. Lipopeptydy zawierające po dwie

reszty pozostałych kwasów tłuszczowych wykazały słabą aktywność przeciwdrobnoustrojową lub były nieaktywne w zastosowanych stężeniach.

Otrzymane wyniki wskazują bezpośredni związek pomiędzy długością łańcucha alkilowego, a aktywnością mikrobiologiczną. Dla lipoeptydów zawierających jedną resztę kwasu tłuszczowego zaobserwowaliśmy wyższą aktywność dla związków z kwasami o dłuższym łańcuchu i wyższej hydrofobowości (C14 i C16). Wpływ wartości ładunku dodatniego na aktywność mikrobiologiczną nie był tak oczywisty. Otrzymane wyniki różniły się w zależności od badanego drobnoustroju oraz badanej grupy lipopeptydów. Wśród związków zawierających reszty kwasu heksadekanowego lipopeptydy o sumarycznym ładunku +2 oraz wyższym prezentowały najlepszą aktywność i szerokie spektrum działania. W grupie związków zawierających kwas tetradekanowy wartość ładunku nie miała wpływu na aktywność. Natomiast dla peptydów zawierających resztę kwasu dodekanowego obserwowano zależność odwrotną. W przypadku lipopeptydów zawierających dwie reszty kwasów tłuszczowych sprzężone z łańcuchem peptydowym składającym się z czterech reszt lizyny (ładunek sumaryczny cząsteczki +3) optymalne okazało się wykorzystanie kwasów o średniej długości łańcucha (C10 i C12). Zarówno wprowadzenie dwóch reszt kwasu oktanowego, jak i wykorzystanie dwóch reszt kwasów o dłuższych łańcuchach skutkowało zupełnym zanikiem aktywności mikrobiologicznej lipopeptydów. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, iż najistostniejszym warunkiem dla uzyskania pożądanych właściwości mikrobiologicznych jest sprzężenie optymalnej sekwencji aminokwasowej z resztą alkilową o odpowiedniej długości.

W celu wstępnego oszacowania toksyczności związków przeprowadziłam ocenę ich aktywności hemolitycznej wobec ludzkich erytrocytów. Właściwości hemolityczne wyraziłam jako stężenie wywołujące hemolizę 10% czerwonych krwinek po ich godzinnej ekspozycji na badane związki. Otrzymane wyniki zaprzeczają hipotezom dotyczącym selektywności działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych w stosunku do komórek prokariotycznych [22, 23]. W większości przypadków zmierzone wartości aktywności hemolitycznej były zbliżone do wyników badań mikrobiologicznych. Lipopeptydy o słabej aktywności przeciwdrobnoustrojowej nie wykazywały zdolności do lizy ludzkich erytrocytów. Natomiast związki o wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej działały hemolitycznie w stosunkowo niskich stężeniach.

Wśród lipopeptydów zawierających dwie reszty kwasu tłuszczowego, związki z resztami kwasu oktanowego okazały się najbezpieczniejsze wobec ludzkich erytrocytów. W przypadku najaktywniejszych związków – zawierających kwas dekanowy i dodekanowy, stężenie wywołujące hemolizę było zbliżone lub kilkukrotnie wyższe, w porównaniu

z otrzymanymi wartościami MIC. Zaskakująco, takie same właściwości hemolityczne wykazały lipopeptydy z kwasem tetradekanowym oraz heksadekanowym, które były nieaktywne mikrobiologiczne. Zbliżone wyniki otrzymałam dla lipopeptydów o sumarycznym ładunku wyższym niż +1 zawierających kwas heksadekanowy sprzężony z łańcuchem peptydowym zawierającym wyłącznie reszty lizyny. Związki te należały do najaktywniejszych mikrobiologicznie. Lipopeptydy o sumarycznym ładunku wyższym niż +1 zawierające kwas heksadekanowy i reszty glicyny w sekwencji aminokwasowej wykazały niższą aktywność hemolityczną przy takim samym działaniu mikrobiologicznym. Związki zawierające reszty kwasu tetradekanowego oraz heksadekanowego o sumarycznym ładunku równym +1 wykazały znacznie niższą aktywność hemolityczną w porównaniu do związków obdarzonych wyższym ładunkiem. Natomiast w przypadku lipopeptydów zawierających resztę kwasu dodekanowego, które wykazywały słabe właściwości hemolityczne, związki o ładunku +1 okazały się najsilniej hemolitycznymi. Dla lipopeptydów zawierających jedną resztę kwasów oktanowego oraz dekanowego stwierdzono brak właściwości hemolitycznych w badanym zakresie stężeń.

Wyniki uzyskanych prac dostarczyły istotnych informacji dla kontynuacji projektowania lipopeptydów o optymalnych właściwościach oraz pozwoliły na wytypowanie najbardziej obiecujących związków do dalszych badań aktywności biologicznych.

Aktywność krótkich lipopeptydów wobec biofilmu bakteryjnego oraz ich wpływ na proces formowania biofilmu

Do badań aktywności krótkich lipopeptydów w stosunku do biofilmu bakteryjnego przeprowadzonych w ramach **publikacji nr 4.4.** wytypowałam dziewięć związków (Tabela 2.), które wykazały się najbardziej obiecującymi właściwościami we wcześniejszych badaniach [publikacje nr 4.2. i 4.3.; ref. 14]. Lipopeptydy otrzymano za pomocą innowacyjnej metody syntezy z wykorzystaniem podwyższonej temperatury w celu zwiększenia wydajności procesu. Dla otrzymanych związków wykonano oznaczenia aktywności wobec hodowli płynnych (MIC) oraz biofilmu hodowanego na powierzchni polistyrenowej i soczewkach kontaktowych. Metodą seryjnych rozcieńczeń oznaczono minimalne stężenie eliminujące biofilm (MBEC) oraz minimalne stężenie hamujące rozwój biofilmu (MBFIC). Badania przeprowadzono na szczepach referencyjnych bakterii Gram-dodatnich (SA, SE, EF) i Gram-ujemnych (EC, PA i *P. mirabilis* - PM). Za MBEC i MBFIC uznawano najniższe stężenia, które powodowały ograniczenie metabolizmu hodowli bakteryjnej o przynajmniej 90% w porównaniu z kontrolą pozytywną.

Tabela 2. Sekwencje aminokwasowe, sumaryczny ładunek oraz masa cząsteczkowa [Da] krótkich lipopeptydów (gdzie: K – reszta lizyny; G – reszta glicyny; R – reszta argininy, C_{10} – reszta kwasu dekanowego, C_{12} – reszta kwasu dodekanowego, C_{14} – reszta kwasu tetradekanowego, C_{16} – reszta kwasu heksadekanowego; *dimery z mostkiem disiarczkowym).

Numer związku	Sekwencja	Masa cząsteczkowa [Da]	Ładunek cząsteczki
1	C_{12}-KKC-NH_2*	1115.64	+4
2	C_{12}-KR-NH_2	483.70	+2
3	C_{14}-KKC-NH_2*	1171.75	+4
4	C_{14}-KR-NH_2	511.75	+2
5	C_{16}-KGK-NH_2	568.84	+2
6	C_{16}-KKC-NH_2*	1227.86	+4
7	C_{16}-KKK-NH_2	639.97	+3
8	C_{16}-KR-NH_2	539.81	+2
9	$(C_{10})_2$-KKKK-NH_2	838.23	+3

Lipopeptydy wykazały zróżnicowane działanie przeciwbakteryjne w zależności od badanego szczepu. Większość związków była bardziej aktywna wobec szczepów Gram-dodatnich, natomiast najniższą aktywność zaobserwowaliśmy wobec szczepu PM. Wzrost szczepu był hamowany po zastosowaniu najwyższych stężeń związków lub nie był hamowany w całym badanym zakresie stężeń. Najniższe wartości MIC dla wszystkich badanych szczepów oznaczono dla lipopeptydów zawierających dwie reszty kwasu dodekanowego i dekanowego (lipopeptyd 1 i 9). Wzrost bakterii Gram-dodatnich był hamowany po ekspozycji na lipopeptyd 1 i 9 w stężeniach odpowiednio 2 – 8 mg/L i 4 – 16 mg/L. Lipopeptyd 9 był także najaktywniejszym związkiem wobec szczepów EC i PA (MIC = 16 mg/L).

Suplementacja pożywki mikrobiologicznej lipopeptydami powodowała ograniczenie rozwoju biofilmu bakteryjnego zarówno na powierzchni polistyrenowej, jak i soczewkach kontaktowych. Właściwości hamujące rozwój biofilmu różniły się zależnie od badanego szczepu oraz powierzchni, na której był hodowany. Zasadniczo korzystniejsze wyniki otrzymaliśmy dla bakterii Gram-dodatnich, a w szczególności gronkowców. W większości przypadków oznaczone wartości MBFIC na powierzchni polistyrenowej były niższe w porównaniu do MBFIC otrzymanych dla hodowli na soczewkach kontaktowych. Związkiem, który najsilniej zapobiegał formowaniu się biofilmu bakteryjnego był lipopeptyd $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2. Oznaczone MBFIC wobec SA hodowanego na powierzchni polistyrenowej było równe MIC (8 mg/L), natomiast do zahamowania tworzenia się biofilmu SA na soczewkach kontaktowych należało zastosować dwukrotnie wyższe stężenie związku. Ekspozycja hodowli SE na te same stężenia lipopeptydu pozwoliła zahamować proces

formowania się biofilmu na polistyrenie oraz soczewkach kontaktowych, co stanowiło odpowiednio, cztero- i ośmiokrotność MIC. Aby ograniczyć formowanie biofilmu EF oraz PA na obu powierzchniach niezbędne było zastosowanie związku w stężeniu 64 mg/L. Taką samą wartość MBFIC oznaczono wobec EC na soczewkach kontaktowych, natomiast stężenie aktywne wobec hodowli na powierzchni polistyrenowej było dwukrotnie wyższe. Satysfakcjonujące wyniki otrzymaliśmy także dla lipopeptydów nr 1, 4 , 7 oraz 8. MBFIC oznaczone wobec większości badanych szczepów były zbliżone. Wyjątkiem był PA, który obok PM wykazał się najniższą wrażliwością na działanie związków peptydowych. Aby ograniczyć formowanie się biofilmu PA na powierzchni polistyrenowej niezbędne było użycie peptydów w najwyższym z badanych stężeń (512 mg/L). Nieco niższe MBFIC otrzymano z wykorzystaniem soczewek kontaktowych. W przypadku PM na obu badanych powierzchniach niezbędna była ekspozycja na lipopeptydy także w stężeniu 512 mg/L lub nie obserwowano aktywności związków w całym badanym zakresie stężeń.

W badaniu aktywności lipopeptydów wobec dojrzałego biofilmu szczepy PA oraz PM wykazały jeszcze wyższą oporność na działanie związków. Jedynym, który wykazał zdolność eliminacji biofilmu PA z obydwu badanych powierzchni był lipopeptyd $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2. Biofilm EC był znacznie wrażliwszy na działanie lipopeptydów w porównaniu do pozostałych szczepów Gram-ujemnych. Najaktywniejszy – C_{16}-KKKK-NH_2 eliminował biofilm w stężeniach 32 i 64 mg/L, odpowiednio z powierzchni soczewek kontaktowych i powierzchni polistyrenowej. Dwukrotnie wyższe wartości MBEC na badanych powierzchniach otrzymano dla lipopeptydu $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2. Natomiast związek C_{16}-KR-NH_2 był tak samo aktywny wobec biofilmów formowanych na obydwu powierzchniach (MBEC = 64 mg/L). Zbliżone wyniki uzyskaliśmy w przypadku biofilmu EF. Większość związków eliminowała szczep z powierzchni soczewek kontaktowych po ich zastosowaniu w stężeniu 64 mg/L. MBEC otrzymane na powierzchni polistyrenowej były dwu- i czterokrotnie wyższe (związki nr 4 i 3), czterokrotnie niższe (związek nr 1) oraz równe MBEC otrzymanym na soczewkach (pozostałe związki). Najwyższą aktywność lipopeptydy wykazały wobec biofilmu gronkowcowego. Otrzymane wyniki są bardzo obiecujące z uwagi na fakt, że gronkowce należą do najczęstszych czynników etiologicznych infekcji związanych z biofilmem [25]. Biofilm SE był eliminowany z powierzchni polistyrenowej przez większość związków zastosowanych już w stężeniach 4 – 16 mg/L. Do eradykcji biofilmu SA potrzebne były stężenia czterokrotnie wyższe. Należy zaznaczyć, że stężenia aktywne były zazwyczaj kilkukrotnie wyższe w porównaniu do MIC, podczas gdy dla antybiotyków konwencjonalnych do eradykacji biofilmu niezbędne jest zastosowanie stężeń 50-100 razy wyższych w porównaniu do MIC [pozycje nr II.4.13. I II.4.20. w „Wykazie osiągnięć...”].

Zarówno biofilm SA, jak i SE hodowany na soczewkach kontaktowych wykazał niższą wrażliwość na działanie lipoeptydów niż struktury formowane przez te szczepy na polistyrenie. W niektórych przypadkach MBEC oznaczone na soczewkach kontaktowych był 16, a nawet 32 razy wyższe w porównaniu ze stężeniami aktywnymi uzyskanymi wobec biofilmu gronkowcowego na powierzchni polistyrenowej. Nie ulega wątpliwości, że właściwości fizykochemiczne biomateriału mają istotny wpływ na rozwój biofilmu. Według dostępnych danych materiały hydrofobowe są mniej podatne na formowanie struktur, a w przypadku wystąpienia kolonizacji łatwiej z nich usunąć drobnoustroje [26, 27]. Jednak zbyt wiele czynników ma wpływ na proces tworzenia oraz właściwości biofilmu aby określić prostą korelację pomiędzy jego wrażliwością na środki przeciwdrobnoustrojowe, a kolonizowaną powierzchnią.

Otrzymane wyniki potwierdzają wysoką aktywność lipopeptydów w stosunku do biofilmu tworzonego przez bakterie Gram-dodatnie oraz zdolność związków do zapobiegania tworzeniu się struktur zarówno na powierzchni hydrofobowej, jak i hydrofilowej. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest porównywalna z aktywnością endogennych AMPs przy znacznie niższych kosztach otrzymywania wynikających z krótszego łańcucha peptydowego i mniejszego zużycia substratów oraz innych materiałów niezbędnych do syntezy. Ponadto związki otrzymano za pomocą zoptymalizowanej metody syntezy, która pozwala na ograniczenie czasu otrzymywania peptydów, a tym samym na dalszą redukcję kosztów.

Lipopeptydy – badania pod kątem zastosowania w profilaktyce infekcji związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych

Soczewki kontaktowe należą do najczęściej wykorzystywanych biomateriałów. Są używane przez miliony ludzi na całym świecie, głównie jako skuteczna metoda korekcji wad wzroku. Stosowanie soczewek znacznie podnosi komfort życia, jednak niesie za sobą ryzyko rozwoju infekcji oka. Zakażenia okulistyczne stanowią rzadkie, ale poważne w skutkach powikłania noszenia soczewek kontaktowych. Najczęściej rozwijają się w wyniku niedostatecznej higieny lub przedłużonego noszenia soczewek. W związku z powyższym edukacja użytkowników w zakresie prawidłowego korzystania z soczewek kontaktowych jest kluczowa dla profilaktyki tego typu infekcji. Poza tym zarówno wykorzystywane biomateriały, jak i dostępne środki higieny są stale udoskonalane aby zminimalizować ryzyko rozwoju zakażeń.

Jedną z badanych strategii profilaktyki infekcji związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych jest modyfikacja biomateriału z wykorzystaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz ich analogów. Powlekanie soczewek kontaktowych meliminą

– peptydem hybrydowym złożonym z fragmentów cekropiny oraz melityny stanowiło skuteczną profilaktykę indukowanych noszeniem soczewek kontaktowych zespołu czerwonego oka wywołanym przez PA u świnek morskich oraz owrzodzenia rogówki u królików [28, 29]. Soczewki powlekane peptydem były także przedmiotem badań klinicznych, których rezultaty potwierdziły wysoką aktywność i szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego oraz bezpieczeństwo stosowania [30]. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe są także badane pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako składników płynów do soczewek. Analog cekropiny – peptyd Shiva-11 – zastosowany jako przeciwbakteryjny składnik płynu do soczewek, był skuteczny wobec szczepów PA, SE i SA, podczas gdy D5C – inny analog cekropiny, wykazał zdolność zwiększania aktywności komercyjnie dostępnych preparatów [31, 32]. Celem przeprowadzonych przeze mnie badań była ocena krótkich lipopeptydów otrzymanych przez nasz zespół jako potencjalnych dodatków przeciwbakteryjnych do płynów do soczewek.

W **pracy nr 4.5.** przeprowadzono badanie aktywności czterech komercyjnie dostępnych płynów do soczewek, płazich peptydów przeciwdrobnoustrojowych (citropiny 1.1 i temporyny A) oraz krótkich lipopeptydów (C_{16}-KK-NH_2 i C_{16}-RR-NH_2) w stosunku do biofilmu bakteryjnego formowanego na soczewkach kontaktowych przez bakterie gatunków: SA, SE, *Streptococcus pyogenes* (SP), *Str. pneumoniae* (SPn) , EC oraz PA, które należą do najczęstszych czynników etiologicznych infekcji związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych [33-36].

Badane związki wykazały wysoką aktywność wobec szczepów gronkowców i paciorkowców hodowanych na powierzchni soczewek kontaktowych. Dla najaktywniejszych peptydów, citropiny 1.1 oraz lipopeptydu C_{16}-KK-NH_2, oznaczone stężenia MBEC mieściły się w zakresie 16 – 64 mg/L, które stanowiły dwu lub czterokrotność oznaczonych MIC. Aby wyeliminować biofilm EC niezbędna jego ekspozycja na związki w stosunkowo wysokich stężeniach. Natomiast zdolność eradykacji PA z powierzchni soczewek wykazały jedynie peptydy płazie, a krótkie lipopeptydy były nieaktywne wobec PA w całym badanym zakresie stężeń.

Spośród czterech badanych płynów do soczewek żaden nie zdołał wyeliminować biofilmu PA z powierzchni soczewek kontaktowych po ich ekspozycji w temperaturze pokojowej. Ponadto płyny okazały się nieaktywne wobec biofilmu formowanego przez SP, natomiast tylko jeden z badanych płynów wykazał zdolność do eradykacji EC. Pozostałe szczepy były wrażliwe na działanie wszystkich płynów do soczewek. Otrzymane wyniki wskazują na potrzebę optymalizacji składów płynów pod kątem ochrony przeciwdrobnoustrojowej.

Pomimo obiecującej aktywności przeciwbiofilmowej lipopeptydu C_{16}-KK-NH_2, zrezygnowałam z kontynuacji badań z wykorzystaniem tego związku z uwagi na jego wysoką toksyczność wobec komórek ludzkich keratynocytów. Stężenie IC50 (ok. 2 mg/L) jest wielokrotnie niższe niż otrzymane wartości MBEC. Rozważając potencjalne zastosowanie związków jako przeciwdrobnoustrojowej suplementacji płynów do soczewek należy mieć na uwadze, iż ich niewielkie ilości mogą dostać się do oka. Ze względu na wrażliwość oka i specjalne wymogi, dla preparatów, które mogą mieć z nim styczność, dobór substancji o optymalnych właściwościach jest niezwykle istotny. W związku z powyższym składniki płynów do soczewek nie mogą wywierać działania drażniącego i dalsze badania lipopeptydu prezentującego tak wysoką toksyczność w badaniach *in vitro* uznaliśmy za bezzasadne. Na podstawie wyników opublikowanych w pracy nr II.4.24. zamieszczonej w „Wykazie osiągnięć..." do kontynuacji badań wybrałam lipopeptyd $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2. Związek ten prezentuje znacznie niższą toksyczność wobec komórek ludzkich przy aktywności przeciwdrobnoustrojowej zbliżonej do najaktywniejszych lipopeptydów zawierających jedną resztę kwasu tłuszczowego.

W ramach **pracy nr 4.6.** oznaczyłam aktywność przeciwbiofilmową lipopeptydu $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2 zastosowanego w połączeniu z płynami do soczewek, które wykazały najszersze spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego w badanich opublikowanych w pracy nr 4.5. Przeprowadziłam ocenę wpływu lipopeptydu, płynów do soczewek oraz ich kombinacji na metabolizm bakterii z gatunków SA, SE, EF, EC i PA hodowanych na powierzchni polistyrenowej oraz soczewkach kontaktowych.

Wykazałam, że suplementacja płynów do soczewek lipopeptydem zwiększa ich skuteczność przeciwbakteryjną wobec biofilmu hodowanego na powierzchni polistyrenowej. Zastosowanie związku w stężeniu 1 mg/L spowodowało istotne zwiększenie aktywności płynu A wobec PA, który był jedynym szczepem wykazującym zmniejszoną wrażliwość na jego działanie. Suplementacja płynu B, który stosowany samodzielnie wykazał znacznie niższą aktywność, pozwoliła na znaczną redukcję aktywności metabolicznej wszystkich badanych szczepów. Dodatek lipopeptydu do płynu B w stężeniu 4 – 8 mg/L pozwoliła na eliminację biofilmu tworzonego przez szczepy SE, SA, EC oraz EF, natomiast aby uzyskać pożądany efekt wobec szczepu PA niezbędne było użycie związku w stężeniu 128 mg/L.

Podobne wyniki uzyskałam dla biofilmu bakteryjnego formowanego na powierzchni soczewek kontaktowych. Ponadto zaobserwowałam, że aktywność metaboliczna bakterii obniżona po ekspozycji na płyny oraz roztwory lipopeptydu stosowane oddzielnie, po ich usunięciu z medium, wraca do poziomu aktywności metabolicznej kontroli pozytywnej, co sugeruje, że populacja biofilmu zostaje odnowiona. Natomiast w sytuacji kiedy wytworzony

na soczewkach biofilm poddano ekspozycji na płyny suplementowane lipopeptydem efekt antybakteryjny utrzymywał się także po ich usunięciu. Najwyższą poprawę aktywności przeciwbakteryjnej zaobserwowałam w przypadku biofilmów PA, EC i EF. Suplementacja płynów lipopeptydem w stężeniu 4 mg/L pozwoliła na silną i trwałą redukcję metabolizmu EC (do ok. 2 % w porównaniu z kontrolą pozytywną). Aby uzyskać pożądany efekt wobec struktur formowanych przez PA należało użyć związku w stężeniu 32 mg/L, natomiast dodatek lipopeptydu do płynów A i B w stężeniach odpowienio 16 i 32 mg/L skutkował niemal całkowitym spadkiem aktywności metabolicznej biofilmu EF (do ok. 1-2% w porównaniu z kontrolą pozytywną). Eliminację biofilmu SA z powierzchni soczewek kontaktowych uzyskałam po dodaniu lipopeptydu do płynu A i B w stężeniach odpowiednio, 8 i 4 mg/L. Biofilm SE był podatny na działanie zarówno lipopeptydu, jak i obu płynów stosowanych samodzielnie, jednakże tym przypadku także zaobserwowałam wzmocnienie działania przeciwbakteryjnego.

Należy zaznaczyć, iż efekt zwiększania skuteczności komercyjnych płynów do soczewek za pomocą suplementacji lipopeptydem zaobserwowano w stężeniach niższych niż stężenia zidentyfikowane jako toksyczne, zarówno wobec ludzkich keratynocytów, jak i erytrocytów. Ponadto w oparciu o wynik analizy przeprowadzonej metodą obliczeniową z wykorzystaniem aplikacji Toxtree, oczekujemy, że związek nie będzie wywierał działania drażniącego w stosunku do ludzkiego oka. Otrzymane wyniki zachęcają do kontynuacji badań, które będą obejmowały ocenę potencjału drażniącego na modelu oka *in vitro*, a następnie badania *in vivo* na modelach zwierzęcych.

Lipopeptydy jako potencjalna alternatywa oraz wspomaganie terapii antybiotykowej

Wzrost metabolizmu hodowli bakteryjnej po wycofaniu roztworów lipopeptydu oraz płynów do soczewek z sugeruje, że pewna populacja komórek drobnoustrojów przetrwała ekspozycję na zastosowane środki przeciwdrobnoustrojowe i umożliwiła odnowienie populacji biofilmu po ich usunięciu z medium. Komórki przetrwałe stanowią subpopulację komórek bakteryjnych o niskiej aktywności metabolicznej odpowiedzialnych za oporność biofilmu na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz nawrót infekcji po zakończeniu leczenia [15, 37, 38]. W ramach **pracy 4.6.** przeprowadziłam ocenę aktywności lipopeptydu $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2 oraz konwencjonalnych środków przeciwdrobnoustrojowych wykorzystywanych w różnych gałęziach medycyny w stosunku do biofilmu formowanego przez szczepy SA, SE, EF, EC i PA. Po ekspozycji na badane związki i usunięciu ich z medium ponownie inkubowałam hodowle bakteryjne aby zaobserwować czy nastąpi wzrost metabolizmu. W niniejszej pracy nie określono, czy ponowne formowanie się biofilmów było efektem

obecności komórek przetrwałych czy aktywowania innych mechanizmów oporności. Dlatego wyniki badań interpretowałam jako trwałe lub nietrwałe działanie przeciwbiofilmowe. Badane związki wykazały zróżnicowane działanie wobec poszczególnych szczepów, a w wielu przypadkach ich usunięcie z medium powodowało znaczny wzrost metabolizmu bakterii.

Ekspozycja biofilmu SE na lipopeptyd w stężeniu 16 mg/L pozwoliła na obniżenie aktywności metabolicznej bakterii do ok. 5% w porównaniu z kontrolą pozytywną. Efekt ten utrzymał się po wycofaniu związku z medium. Zbliżony efekt przeciwdrobnoustrojowy uzyskałam dla neomycyny w tym samym stężeniu, która wobec SE była najaktywniejszym konwencjonalnym środkiem przeciwdrobnoustrojowym użytym w badaniu. Zastosowanie cyprofloksacyny także w stężeniu 16 mg/L skutkowało obniżeniem aktywności metabolicznej do 10%. Jednak po wycofaniu związku z pożywki zaobserwowałam ponowny wzrost aktywności metabolicznej bakterii. Trwały efekt antybiofilmowy uzyskałam dopiero po zastosowaniu związku w najwyższym z badanych stężeń (256 mg/L). Chloramfenikol zaaplikowany w najwyższym stężeniu spowodował zmniejszenie aktywności metabolicznej bakterii do ok. 12%. Jednak po wycofaniu związku odnotowałam znaczny wzrostem aktywności metabolicznej bakterii SE.

Biofilm SA okazał się znacznie mniej wrażliwy na działanie konwencjonalnych środków przeciwbakteryjnych. Jego ekspozycja na cyprofloksacynę w stężeniu 256 mg/L pozwoliła zredukować aktywność metaboliczną SA do ok. 20%. Po zastosowaniu chloramfenikolu w tym stężeniu aktywność metaboliczna SA spadła tylko do 50% i istotnie wzrosła po wycofaniu związku z medium. Najbardziej skutecznym związkiem konwencjonalnym wobec SA była neomycyna. Ekspozycja biofilmu na antybiotyk w stężeniu 64 mg/L trwale eliminowała SA z powierzchni polistyrenowej. Lipopeptyd $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2 wykazał jeszcze wyższą aktywność. Zastosowany w stężeniu 32 mg/L zredukował aktywność metaboliczną komórek SA o ponad 90%. Zarówno w przypadku zastosowania aktywnych stężeń lipopeptydu, jak i neomycyny nie zaobserwowałam wzrostu aktywności metabolicznej bakterii po usunięciu związków z medium.

Taką samą aktywność lipopeptydu $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2 zaobserwowałam wobec biofilmu utworzonego przez szczep EF, który wykazał najwyższą oporność na działanie konwencjonalnych środków przeciwdrobnoustrojowych. Lipopeptyd w stężeniu 32 mg/L trwale eliminował biofilm EF, podczas gdy zastosowanie konwencjonalnych antybiotyków w stężeniu 256 mg/L spowodowało zmniejszenie aktywności metabolicznej tylko do ok 35% w porównaniu z kontrolą pozytywną. Wycofanie neomycyny oraz chloramfenikolu z medium

spowodowało całkowite odnowienie aktywności metabolicznej bakterii, natomiast dla cyprofloksacyny pozostała na poziomie 35% w odniesieniu do populacji początkowej.

Aby uzyskać satysfakcjonujący efekt antybiofilmowy w stosunku do szczepu EC należało zastosować lipopeptyd w stężeniu 64 mg/L. Ekspozycja na związek w podanym stężeniu powodowała wysoką redukcję metabolizmu bakterii i co najważniejsze nie zaobserwowałam jego wzrostu po usunięciu lipopeptydu z medium. Podobny efekt uzyskałam po zastosowaniu cyprofloksacyny w stężeniu 32 mg/L. Chloramfenikol także wykazał wysoką skuteczność wobec biofilmu EC. 90% redukcję metabolizmu bakterii zaobserwowałam po aplikacji związku w stężeniu 16 mg/L, jednak po jego usunięciu z medium poziom aktywności metabolicznej bakterii wrócił do poziomu populacji początkowej. Neomycyna wykazała najniższą aktywność wobec EC, w stężeniu 16 mg/L wywoływała spadek aktywności metabolicznej do ok 20% w porównaniu z kontrolą pozytywną. Usunięcie neomycyny z medium powodowało całkowite odnowienie aktywności metabolicznej hodowli bakteryjnej.

Biofilm wytworzony przez szczep PA na powierzchni polistyrenowej wykazał najniższą wrażliwość na działanie lipopeptydu $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2. Redukcję aktywności metabolicznej bakterii do poziomu 10% kontroli pozytywnej uzyskałam dopiero po zastosowaniu związku w stężeniu 256 mg/L. Jednak wycofanie ekspozycji na związek skutkowało odnowieniem aktywności metabolicznej bakterii. Nieco wyższą aktywność prezentowały chloramfenikol i neomycyna. Ekspozycja biofilmu PA na związki w stężeniach, odpowiednio, 128 i 64 mg/L skutkowała redukcją aktywności metabolicznej bakterii do ok 10%, jednak ponowna inkubacja szczepu po usunięciu antybiotyków z medium powodowała powrót metabolizmu do poziomu kontroli pozytywnej. Jedynym związkiem skutecznie eliminującym biofilm PA okazała się cyprofloksacyna. Redukcję aktywności metabolicznej bakterii o ponad 90% zaobserwowałam już po aplikacji związku w stężeniu 1 mg/L. Jednak po wycofaniu cyprofloksacyny z medium obserwowałam częściowe odnowienie aktywności metabolicznej populacji. Trwały efekt antybiofilmowy uzyskałam po aplikacji związku w stężeniu 32 mg/L.

Otrzymane wyniki wskazują na wysoki potencjał lipopeptydu jako alternatywy w walce z biofilmem formowanym przez bakterie Gram-dodatnie. Związek wykazuje znacznie silniejsze zdolności do skutecznej eliminacji biofilmu szczepów SA, SE oraz EF w porównaniu z konwencjonalnymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi. Najbardziej obiecujące wyniki otrzymałam w przypadku biofilmu EF, który był eliminowany dopiero po zastosowaniu związków konwencjonalnych w wysokich stężeniach, a po ich wycofaniu z medium populacja bakterii odnowiła się prawie całkowicie.

Stosunkowo niska aktywność lipopeptydu wobec biofilmu tworzonego przez bakterie Gram-ujemne oraz wyniki otrzymane dla suplementowanych nim płynów do soczewek skłoniły mnie do poszukiwania optymalnych kombinacji lipopeptydu z konwencjonalnymi antybiotykami. Terapia skojarzona może stanowić skuteczne rozwiązanie problemu wykształcania mechanizmów oporności drobnoustrojów na stosowane antybiotyki. Jednoczesne stosowanie dwóch lub więcej środków przeciwdrobnoustrojowych pozwala na przywrócenie lub zwiększenie ich skuteczność przeciwko opornemu patogenowi. Ponadto ma na celu poszerzenie spektrum działania i pozwala zmniejszyć stosowane dawki, a tym samym ograniczyć ryzyko wystąpienia objawów niepożądanych [39].

W ramach **pracy nr 4.7.** przeprowadziłam ocenę aktywności połączeń dwóch krótkich lipopeptydów $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2 i $(C_{12})_2$-KKKK-NH_2 oraz temporyny A (TA) z gentamycyną w stosunku do hodowli planktonowych oraz biofilmu formowanego przez szczepy SA i PA na powierzchni polistyrenowej. Metodą seryjnych rozcieńczeń oznaczyłam MIC wobec hodowli planktonowej oraz aktywność metaboliczną populacji biofilmu poddawanej ekspozycji na badane związki. Otrzymane wyniki prezentowałam jako stężenia MBEC90 oraz MBEC50 odpowiadające stężeniom powodującym redukcję metabolizmu bakteryjnego do przynajmniej, odpowiednio 10 i 50% w odniesieniu do kontroli pozytywnej. Następnie wykorzystując metodę checkerboard wyznaczyłam wskaźniki ułamkowego stężenia hamującego (ΣFIC) i ułamkowego stężenia eliminującego biofilm (ΣFBEC) w celu oceny interakcji pomiędzy gentamycyną, a peptydami.

Gentamycyna jest antybiotykiem aminoglikozydowym o szerokim spektrum działania. Hamuje syntezę białek bakteryjnych poprzez wiązanie z małymi podjednostkami rybosomów. Antybiotyk znajduje zastosowanie w wielu gałęziach medycyny. Działania niepożądane związane są z nefrotoksycznością, neurotoksycznością, ototoksycznością oraz powikłaniami żołądkowo-jelitowymi[40]. Oporność drobnoustrojów na gentamycynę rozwija się powoli, ale stale. Dotyczy to między innymi *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. [41]. Możliwa jest oporność krzyżowa z innymi aminoglikozydami, natomiast działanie synergistyczne potwierdzono dla penicylin i cefalosporyn [40]. Wykazano także synergizm gentamycyny z cyprofloksacyną i fosfomycyną wobec biofilmu bakterii Gram-ujemnych [42].

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach stwierdziłam brak synergizmu związków peptydowych i gentamycyny wobec hodowli planktonowych obu badanych szczepów. Otrzymane wartości MIC dla związków aplikowanych osobno były zazwyczaj równe stężeniom aktywnym oznaczonym dla peptydów i antybiotyku stosowanych w połączeniach, co świadczy o braku interakcji pomiędzy związkami. Gentamycyna

hamowala wzrost szczepów SA i PA zastosowana w stężeniach, odpowiednio 0,25 i 0,5 mg/L. MIC otrzymane dla związków peptydowych wobec SA wynosiły 8 – 16 mg/L. Aby zahamować wzrost PA należało poddać szczep ekspozycji na lipopeptydy w stężeniu 16 – 32 mg/L, natomiast MIC dla temporyny wynosił aż 512 mg/L. Kombinacja TA oraz lipopeptydu $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2 z gentamycyną pozwoliła na redukcję stosowanych stężeń o połowę, co w dalszym ciągu oznacza brak synergizmu [39].

Pomimo braku działania synergistycznego w stosunku do hodowli planktonowych, zaobserwowałam znacząco wyższą aktywność związków stosowanych w kombinacji wobec biofilmu bakteryjnego, zwłaszcza gronkowcowego.

Gentamycyna aplikowana osobno była bardzo aktywna wobec biofilmu utworzonego przez PA na powierzchni polistyrenowej. Zarówno MBEC90, jak i MBEC50 wynosiły tylko 2 mg/L. Natomiast SA formował struktury o niskiej wrażliwości na antybiotyk. Zastosowanie gentamycyny w najwyższym badanym stężeniu – 32 mg/L (128 razy wyższym niż MIC) nie wystarczyło aby zredukować metabolizm komórek SA o 90%. Natomiast aby zmniejszyć go o połowę, należało poddać biofilm ekspozycji na antybiotyk w stężeniu 1 mg/L.

W przeciwieństwie do gentamycyny, peptydy wykazały słabą aktywność wobec biofilmu PA. Najwyższą, ale wciąż niesatysfacjonującą, aktywność wykazał lipopeptyd $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2. Uzyskana wartość MBEC90 wyniosła 256 mg/L, czyli 16 razy więcej niż MIC. Ekspozycja na peptyd w stężeniu 128 mg/L pozwoliła zmniejszyć metabolizm PA do 30%. Lipopeptyd $(C_{12})_2$-KKKK-NH_2 zaprezentował bardzo niską aktywność, nawet w najwyższym stężeniu (512 mg/L) nie powodował redukcji metabolizmu o połowę. TA także wykazała całkowity brak aktywności wobec biofilmu PA. Struktury formowane przez SA były znacznie bardziej wrażliwe na związki peptydowe. Aby uzyskać 90% redukcję metabolizmu, należało poddać biofilm ekspozycji na TA i $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2 w stężeniach, odpowiednio 64 i 32 mg/L. Oba peptydy zastosowane w stężeniu 32 mg/L (4x MIC) obniżyły aktywność metaboliczną SA o połowę. Lipopeptyd $(C_{12})_2$-KKKK-NH_2 zastosowany osobno nie wykazał działania na biofilm SA.

Połączenie gentamycyny z badanymi peptydami spowodowało znaczny wzrost skuteczności związków przeciwko biofilmowi utworzonemu przez SA. W związku z tym, że gentamycyna nie wykazała zdolności do redukcji metabolizm SA w populacji biofilmu do co najmniej 10% w całym badanym zakresie stężeń, oznaczenie wartości MBEC90, a tym samym ΣFBEC w celu sklasyfikowania interakcji, nie było możliwe. Jednak uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały, że istnieje pozytywna interakcja między gentamycyną a peptydami. Kombinacja gentamycyny z lipopeptydem $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2 pozwoliła na eliminację biofilmu po ekspozycji na związki w stężeniach, odpowiednio 1 i 4 mg/L. Dzięki temu

aktywne stężenie lipopeptydu było czterokrotnie niższe w porównaniu z MBEC90 związku aplikowanego samodzielnie. Natomiast w przypadku gentamycyny zastosowanie w kombinacji z lipopeptydem pozwoliło zredukować stężenie antybiotyku ponad 32 razy. To samo stężenie gentamycyny okazało się efektywne kiedy antybiotyk był stosowany w połączeniu z lipopeptydem $(C_{12})_2$-KKKK-NH_2 w stężeniu 32 mg/L. Należy zaznaczyć, że sam lipopeptyd nie był aktywny wobec biofilmu SA w całym badanym zakresie stężeń (do 64 mg/L). Ekspozycja biofilmu SA na kombinacje gentamycyny z TA w pozwoliła obniżyć stężenie aktywne antybiotyku do 0,125 mg/L, co stanowiło wartość niższą niż oznaczone MIC. Stężenie aktywne peptydu wynosiło połowę MBEC90 otrzymanego dla TA zastosowanej osobno.

W przypadku biofilmu PA nie zaobserwowałam tak oczywistej interakcji pomiędzy peptydami a gentamycyną. Jednak zastosowanie połączeń związków pozwoliło na redukcję wartości zarówno MBEC90, jak i MBEC50. Ekspozycja na antybiotyk w kombinacji z lipopeptydami pozwoliła na zmniejszenie stężenia gentamycyny o połowę. Aktywne stężenia lipopeptydu $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2 w kombinacji było również dwukrotnie niższe niż MBEC90 i MBES50 określone dla związku użytego osobno. Wartość ΣFBEC była równa 1, co oznacza brak interakcji pomiędzy związkami. W przypadku lipopeptydu $(C_{12})_2$-KKKK-NH_2, jego połączenie z gentamycyną było skuteczne przeciwko biofilmowi PA, gdy związek zastosowano w stężeniu 512 i 256 mg/L (odpowiednio dla MBEC90 i MBEC50). Sam lipopeptyd $(C_{12})_2$-KKKK-NH_2 był nieaktywny wobec biofilmu PA w całym badanym zakresie stężeń, więc interakcja była silniejsza w porównaniu z lipopeptydem zawierającym kwas dekanowy. Zastosowanie gentamycyny z TA pozwoliło na czterokrotne obniżenie aktywnego stężenia antybiotyku. W celu zmniejszenia metabolizmu bakterii do 10 i 50%, peptyd zastosowano w stężeniach odpowiednio 512 i 256 mg/L. Warto zaznaczyć, że TA zastosowana w najwyższym badanym stężeniu (512 mg/L) nie była aktywna w stosunku do PA nawet w kulturze planktonowej.

Silne synergistyczne działanie badanych związków peptydowych i gentamycyny wobec biofilmu gronkowcowego pozwoliło na rozszerzenie spektrum działania antybiofilmowego antybiotyku. Ponadto umożliwiło to obniżenie wykorzystywanych stężeń lipopeptydów znacznie poniżej oznaczonych jako toksyczne wobec zarówno komórek HaCaT, jak i ludzkich erytrocytów [publikacja nr 4.3.; pozycja nr II.4.4. w „Wykazie osiągnięć...”]. Biorąc pod uwagę fakt, że SA i PA należą do najczęstszych przyczyn infekcji związanych z biofilmem, wyniki uzyskane w niniejszym badaniu są bardzo obiecujące i będę je kontynuowała z wykorzystaniem szczepów klinicznych. Jednak oprócz rozszerzenia testów

mikrobiologicznych, należy podjąć badania skutecznych kombinacji pod kątem ich toksyczności oraz losów w ustroju.

Podsumowanie

Przeprowadzone przeze mnie badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej pozwoliły na identyfikację grupy krótkich lipoeptydów zawierających jeden lub dwa łańcuchy kwasu tłuszczowego sklasyfikowane jako wysoce aktywne w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i aktywne wobec większości szczepów Gram-ujemnych. Poza tym związki wykazały słabą aktywność wobec grzybów. Oznaczenia aktywności hemolitycznej wykazały, że w większości przypadków, lipopeptydy o najsilniejszych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych mają także silne działanie hemolityczne.

Najbardziej obiecujące związki zostały przebadane pod kątem aktywności w stosunku do biofilmu bakteryjnego oraz właściwości hamujących jego rozwój. Otrzymane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia odnośnie aktywności AMPs wobec biofilmu w różnych fazach rozwoju. Badane związki wykazały wysoką aktywność wobec biofilmów bakterii Gram-dodatnich i słabe działanie w stosunku do bakterii Gram-ujemnych. Ocena wpływu lipopeptydów na proces formowania biofilmu pozwoliła wyłonić związki hamujące rozwój struktur zarówno na powierzchni polistyrenowej, jak i soczewkach kontaktowych. Działanie to może być wynikiem zapobiegania adhezji drobnoustrojów do kolonizowanej powierzchni poprzez oddziaływania elektrostatyczne z błoną drobnoustroju lub na zakłócanie dojrzewania biofilmu [43, 44]. Badane związki wykazały także zdolność do eliminacji dojrzałego biofilmu. Niespecyficzny mechanizm działania determinuje aktywność AMPs w stosunku do komórek wolnorosnących oraz nierosnących [43-45]. Na silne działanie wobec dojrzałych struktur składa się także zdolność peptydów do penetracji EPS, co umożliwia zabijanie głębiej położonych komórek.

Na podstawie wyników badań aktywności antybiofilmowej oraz wstępnej oceny toksyczności lipopeptydów wytypowałam najbardziej obiecujący związek do kontynuacji badań. Lipopeptyd $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2 wykazał zdolność do poprawy skuteczności komercyjnie dostępnych płynów do soczewek w stosunku do biofilmu bakteryjnego formowanego na soczewkach kontaktowych. Związek wykazał także silną aktywność w stosunku do biofilmu formowanego przez bakterie Gram-dodatnie na powierzchni polistyrenowej, silniejszą w porównaniu z chloramfenikolem, ciprofloksacyną, gentamycyną oraz neomycyną. Ponadto ekspozycja na lipopeptyd skutkowała trwałą redukcją metabolizmu bakterii, podczas gdy po wycofaniu konwencjonalnych środków przeciwdrobnoustrojowych obserwowano odnowienie populacji.

Badanie aktywności połączeń lipopeptydu $(C_{10})_2$-KKKK-NH_2 z gentamycyną wykazało silne działanie synergistyczne w stosunku do biofilmu gronkowcowego, który był niewrażliwy na działanie samego antybiotyku. Natomiast w przypadku lipopeptydu stężenie aktywne wobec biofilmu zostało zredukowane znacznie poniżej stężeń oznaczonych jako toksyczne wobec komórek ludzkich. Otrzymane wyniki sugerują duży potencjał lipopeptydów jako środków wspomagających standardową terapię infekcji związanych z biofilmem. Brak synergizmu pomiędzy związkami w stosunku do hodowli wolnopływajacych w zestawieniu z silną interakcją wobec biofilmu zachęca do dalszego poszukiwania skutecznych kombinacji obejmujących związki, które nie wykazują interakcji w badaniu FIC. Ponadto działanie synergistyczne wobec biofilmu zaobserwowano także dla lipopeptydu $(C_{12})_2$-KKKK-NH_2, który zastosowany samodzielnie nie wykazuje aktywności. W związku z powyższym planuję poszerzyć badania pod kątem interakcji o pochodne charakteryzujące się brakiem toksyczności wobec komórek eukariotycznych i niską aktywnością mikrobiologiczną. Wyniki aktywności mikrobiologicznej zostaną następnie uzupełnione o niezbędne dane toksykologiczne i farmakokinetyczne.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Swoją działalność naukową rozpoczęłam podczas studiów magisterskich na kierunku Farmacja, na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed). W latach 2005-2009 byłam przewodniczącą Studenckiego Koła Naukowego (SKN) w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej. Moja działalność w ramach SKN zaowocowała pracą poglądową w czasopiśmie o zasięgu krajowym oraz dwiema prezentacjami ustnymi wygłoszonymi na konferencji krajowej i międzynarodowej. W roku 2008 uzyskałam 6-miesięczne stypendium w ramach The Life Long Learning Programme, które realizowałam w Katedrze Chemii Analitycznej i Medycznej, Wydziału Nauk Farmaceutycznych na Uniwersytecie w Perugii we Włoszech. Efektami pracy w zespole prof. Benedetto Natalini'ego były moja praca magisterska, publikacja w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz streszczenie zjazdowe na konferencji zagranicznej (pozycje nr II.4.17. I II.7.59. w „Wykazie osiągnięć...”).

Po zakończeniu studiów magisterskich na kierunku Farmacja rozpoczęłam studia doktoranckie w Kolegium Studiów Doktoranckich GUMed. Pracę doktorską pt. „Badanie

peptydów przeciwdrobnoustrojowych pod kątem ich potencjalnego zastosowania w gronkowcowych infekcjach skórnych" realizowałam w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej pod opieką prof. dr hab. Wojciecha Kamysza.

Podczas studiów doktoranckich odbyłam miesięczną praktykę w Skin Research Laboratory, School of Pharmacy, Uniwersytetu w Londynie pod opieką dr Majelli Lane (08.2011 – 09.2011). Nabyte umiejętności posłużyły mi do realizacji zadań przewidzianych w pracy doktorskiej związanych z badaniem przenikania związków peptydowych przez skórę.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych odbyłam dwumiesięczny staż w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (06.2014 – 07.2014; Kilonia, Niemcy). Praca w zespole prowadzonym przez prof. Jensa M. Schroeder'a pozwoliła mi na dalsze rozwinięcie warsztatu badacza oraz pogłębienie wiedzy na temat peptydów przeciwdrobnoustrojowych i ich roli w patogenezie chorób człowieka.

Moje badania do uzyskania stopnia doktora były możliwe dzięki finansowaniu przyznanemu przez Narodowe Centrum Nauki (NCN): grant promotorski nr NN405025240 (2011-2013), którego byłam kierownikiem oraz projektom badawczym finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW), w których byłam wykonawcą. Projekt MNiSW nr NN405 630638 pt. „Czy peptydy przeciwdrobnoustrojowe są skuteczne w eradykacji biofilmu gronkowcowego?" był realizowany w latach 2010-2012 we współpracy z Katedrą i Kliniką Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed oraz z Katedrą Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwesytetu Gdańskiego. Projekt MNiSW nr NN405 627 838 pt. „Badanie aktywności i toksyczności wybranych antybiotyków peptydowych pod kątem ich zastosowania w gronkowcowych zakażeniach skórnych" (2010 – 2013) był realizowany wraz z następującymi jednostkami GUMed: Katedrą i Zakładem Chemii Fizycznej, Katedrą i Kliniką Dermatologi, Wenerologii i Alergologii oraz Zakładem Immunologii Klinicznej i Transplantologii. Rezultatem przeprowadzonych badań była moja rozprawa doktorska oraz publikacje nr II.4.13.; II.4.16. i II.4.20. zamieszczone w „Wykazie osiągnięć...".

W latach 2013-2016 byłam wykonawcą projektu NCN OPUS nr 2012/05/ B/ST5/00 281 pt. „Syntetyczne lipopeptydy - badanie właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej", którego efektem jest publikacja nr 4.2. wchodząca w skład prezentowanego osiągnięcia. Projekt był prowadzony we współpracy z Katedrą Technologii Chemicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

Po uzyskaniu stopnia doktora (w latach 2015-2016) realizowałam zadanie badawcze pt. „Wpływ krótkich lipopeptydów na biofilmy formowane na soczewkach kontaktowych" finansowane w ramach dotacji dla Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego przyznanych dla wydziału Farmaceutycznego GUMed, którego wynikiem jest praca nr 4.5. wchodząca

w skład prezentowanego osiągnięcia. W kolejnych latach realizowałam zadania badawcze „Młody naukowiec" finansowane ze środków GUMed: MN01-0185/08/508 pt. „Badanie właściwości biologicznych syntetycznych cyklicznych lipopeptydów" (2016-2017) i MN01-0373/08/508 pt. „Ocena aktywności syntetycznych lipopeptydów stosowanych w połączeniu z antybiotykami i antyseptykami" (2018-2019), które zaowocowały odpowiednio publikacją nr II.4.4. zamieszczoną w „Wykazie osiągnięć..." i pracą 4.6. wchodzącą w skład prezentowanego osiągnięcia.

Poza realizacją projektów i zadań badawczych byłam także zaangażowana w projekty rozwojowe przyznane firmie Lipopharm.pl. W latach 2010-2013, we współpracy z m.in. Instytutem Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników (Oddział Piastów), Wojskowym Instytutem Chemii i Radiometrii (Warszawa), Przedsiębiorstwem Sprzętu Ochronnego MASKPOL S.A. (Konieczki) i Wojskowym Instytutem Higieny i Epidemiologii (Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych w Puławach) brałam udział w realizacji projektu nr OR00002512 pt. „Zastosowanie efektywnych biocydów, w tym peptydów przeciwdrobnoustrojowych, jako biobójczych komponentów tworzyw i materiałów powłokowych w celu polepszenia właściwości środków ochrony przed skażeniami" finansowanemu przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Byłam także wykonawcą projektu nr UDA-POIG.01.04.00-22-052/11-01 pt. „Opracowanie grup peptydów aktywnych przeciwdrobnoustrojowo i przeciwnowotworowo" przyznanego przez Polską Agencję Rozwoju Przedsiębiorczości w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka realizowanego w latach 2012 – 2016.

Moja działalność naukowa zarówno przed, jak i po uzyskaniu stopnia doktora dotyczy przede wszystkim peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs). Celem moich badań jest poszukiwanie związków aktywnych wobec mikroorganizmów opornych na antybiotyki oraz biofilmu. Prowadzone przeze mnie badania obejmują projektowanie i ocenę właściwości biologicznych związków otrzymanych na drodze syntezy chemicznej. Dotychczas otrzymane wyniki potwierdzają wysoką aktywność badanych AMPs wobec szczepów referencyjnych i klinicznych bakterii i grzybów w formie planktonowej i tworzonych przez nie biofilmów. Najwyższą aktywność prezentują krótkie lipopeptydy, jednakże większość z nich prezentuje także stosunkowo wysoką aktywność hemolityczną wobec ludzkich erytrocytów, w związku z czym są one rozpatrywane w aspekcie zastosowania miejscowego na skórę.

Poza tematyką peptydów przeciwdrobnoustrojowych zaangażowałam się także w pracę zespołów naukowych poszukujących związków aktywnych mikrobiologicznie. We współpracy z zakładem z Zakładem Chemii Cukrów Uniwersytetu Gdańskiego prowadzę badania nad zastosowaniem syntetycznych saponin, jako związków przeciwgrzybiczych

i przeciwbakteryjnych (publikacje nr: II.4.1.; II.4.2.; II.4.8. i II.4.26. i streszczenia zjazdowe nr: II.7.5.; II.7.6.; II.7.12; II.7.13; II.7.21; II.7.22; II.7.27.; II.7.28.; II.7.33. w „Wykazie osiągnięć...”). Badania przeprowadzone we współpracy z Zakładem Analizy Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pozwoliły na identyfikację substancji przeciwdrobnoustrojowych w organizmach owadów (publikacje nr: II.4.10.; II.4.14.; II.4.15.; II.4.17.; II.4.19.; II.4.21. i II.4.22. w „Wykazie osiągnięć...”).

Poza publikacjami naukowymi wymienionymi w wykazie osiągnięć bezpośrednim rezultatem prowadzonych przeze mnie prac są także liczne doniesienia konferencyjne. Część z nich prezentowałam ustnie na konferencjach międzynarodowych oraz krajowych (Pozycje nr II.7.7.; II.7.14.; II.7.29.; II.7.34.; II.7.39.; II.7.42.; II.7.46.; II.7.47.; 7.60.; 7.61. w „Wykazie osiągnięć...”).

Moje zaangażowanie naukowe było wielokrotnie doceniane w ramach przyznanych nagród oraz stypendiów: Stypendium dla Doktorantów prowadzących badania naukowe na GUMed (12.2011 – 11.2012); Stypendium "Innodoktorant" - IV edycja programu (02.2012 – 08.2012); Stypendium doktorskie dla pracowników GUMed (5.2013 – 04.2014); Nagroda za najlepszą pracę eksperymentalną Forum Młodych Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego (03.2011, Łódź); Indywidualna Nagroda Rektora GUMed III stopnia (2015); Zespołowe Nagrody Rektora GUMed I stopnia (2012, 2015, 2017) i II stopnia (2016, 2018).

Mój dorobek naukowy w okresie po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 19 prac naukowych: 17 oryginalnych i 2 poglądowe (w tym 7 jako pierwszy autor i 8 jako autor korespondencyjny). Łączna punktacja IF, prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora wynosi 51,945, a liczba punktów KBN/MNiSW 770. Na moment składania wniosku mój dorobek naukowy obejmuje 39 prac naukowych (w tym 16 jako pierwszy autor, a 19 jako autor korespondencyjny) o łącznej punktacji IF 80,695 (1139 punktów KBN/MNiSW), natomiast h-indeks to 14/13, a prace były cytowane 438/406 (bez cytowań własnych) razy według, odpowiednio bazy Scopus/Web of Science Core Collection.

Moja działalność naukowa w najbliższej przyszłości będzie stanowiła kontynuację oraz rozszerzenie badań kombinacji AMPs i konwencjonalnych antybiotyków oraz antyseptyków pod kątem możliwości ich zastosowania w profilaktyce i zwalczaniu biofilmu bakteryjnego. Planowane badania będą miały na celu zidentyfikowanie połączeń związków skutecznych wobec struktur hodowanych na biomateriałach oraz próbę oceny mechanizmu interakcji pomiędzy związkami. Jest to szczególnie interesujące w przypadku substancji nie wykazujących interakcji wobec komórek wolnopływających, a dla których zaobserwowano działanie synergistyczne w stosunku do biofilmu. Swoją uwagę zamierzam skupić na

związkach o potwierdzonym braku działania toksycznego wobec organizmu ludzkiego, jednakże nie oznacza to rezygnacji z dalszego poszukiwania struktur o pożądanych właściwościach biologicznych.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Poza prowadzeniem badań naukowych angażuję się także w działalność towarzystw oraz wydawnictw naukowych, wypełniam powierzone obowiązki dydaktyczne i organizacyjne oraz aktywnie uczestniczę w życiu uczelni poprzez czynny udział w akcjach popularyzujących naukę i zdrowy styl życia.

Od 2009 roku należę do Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, a od 2013 roku jestem członkiem Zarządu Oddziału Gdańsk PTFarm. W latach 2011-2018 należałam do Europejskiego Towarzystwa Dermatologii Eksperymetntalnej (European Society for Dermatological Research).

W roku 2016 zajęłam się przygotowaniem numeru specjalnego na temat peptydów przeciwdrobnoustrojowych dla czasopisma Current Topics in Medicinal Chemistry (IF=3,218) wydawnictwa Bentham Science. Numer został opublikowany w 2017 roku (CTMC 17-06, 2017) i zawierał 9 artykułów przeglądowych prezentujących najnowsze dane z zakresu tematyki peptydów przeciwdrobnoustrojowych: metod pozyskiwania i projektowania związków, mechanizmu działania i potencjalnych zastosowań związków.

Obecnie pracuję nad numerem specjalnym dla czasopisma Antibiotics (IF = 3,893; https://www.mdpi.com/journal/antibiotics/special_issues/Mechanism_Peptide) wydawnictwa MDPI pt. ”Mechanisms of Antimicrobial Peptides on Pathogens”. Numer będzie zawierał artykuły oryginalne dotyczące mechanizmów działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Termin zgłaszania artykułów został ustalony na 15.01.2021.

W latach 2015-2020 sporządziłam 22 recenzje prac naukowych dla następujących czasopism: World Journal of Microbiology and Biotechnology (IF= 2,477; SPRINGER; 7 recenzji), Microorganisms (IF= 4,152; MDPI; 2 recenzje), European Journal of Pharmaceutical Sciences (IF = 3,616; ELSEVIER; 2 recenzje), International Journal of Molecular Sciences (IF = 4,556; MDPI; 2 recenzje), Nanomaterials (IF = 4,324; MDPI), Biomolecules (IF = 4,082; MDPI), Antibiotics (IF = 3,893; MDPI), Future Microbiology (IF = 3,607; FUTURE SCIENCE), Future Medicinal Chemistry (IF = 2,907; FUTURE MEDICINE), Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology (IF = 1,52;

HINDAWI), The Open Microbiology Journal (BENTHAM), Journal of Complementary Medicine Research (Journal of Intercultural Ethnopharmacology; C/O SUKASIREE PUBLICATION) oraz International Journal of Allergy Medications (CLINMED INTERNATIONAL LIBRARY).

Na moją działalność dydaktyczną składają się:

1. Prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych z Analizy chemicznej dla studentów 1 roku kierunków Farmacja i Analityka Medyczna (od 2010; GUMed).

2. Przygotowanie i prowadzenie wykładów oraz ćwiczeń laboratoryjnych w ramach przedmiotu do wyboru „Nieorganiczne Związki wykorzystywane w kosmetologii" przeznaczonego dla studentów 1 i 2 roku kierunku Farmacja (od 2018; GUMed).

3. Przygotowanie i przeprowadzenie wykładów z zakresu chemii nieorganicznej w ramach przedmiotu „Chemia Ogólna i Nieorganiczna"; kierunek Analityka Medyczna (rok akademicki 2017/18; GUMed).

4. Przygotowanie i przeprowadzenie ćwiczeń laboratryjnych w ramach fakultetu uzupełniającego „Blok zajęć chemicznych"; kierunek Przemysł Farmaceutyczny i kosmetyczny (lata 2017/18 i 2018/19; GUMed).

5. Przygotowanie zagadnień i pytań testowych na egzamin wstępny dla kandydatów na studia magisterskie na kierunku Przemysł Farmaceutyczny i kosmetyczny (lata 2017/18 i 2018/19; GUMed).

6. Pełnienie funkcji opiekuna nadzorującego przebieg sześciomiesięcznej praktyki zawodowej studentów Wydziału Farmaceutycznego z Odziałem Medycyny Laboratoryjnej w aptece ogólnodostępnej i szpitalnej (rok akademicki 2017/18).

7. Rola promotora pomocniczego pracy doktorskiej mgr Magdaleny Maciejewskiej pt. „Badanie krótkich lipopeptydów pod kątem ich potencjalnego zastosowania w profilaktyce i zwalczaniu infekcji oka związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych" (praca w trakcie oceny przez Recenzentów).

W ramach zadań organizacyjnych odpowiadam za układanie planu zajęć oraz obsługę rozliczania i planowania godzin dydaktycznych (system ePensum) w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej (od 2016 roku). W 2018 roku wzięłam udział w organizacji Dnia Otwartego na Wydziale Farmaceutycznym (członek komitetu organizacyjnego, 20.04.2018).

W ramach działalności popularyzującej naukę:

1. Od kwietnia 2017 prowadzę stronę Oddziału Gdańsk Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego na portalu Facebook.

2. Brałam udział w I edycji Nauki dla Zdrowia – Dnia Otwartego GUMed – stoisko Studenckiego Koła Naukowego Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej (20.04.2018).

3. Zajęłam się organizacją zajęć w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej w ramach English Winter Camp – charytatywny program edukacyjno-wychowawczy, którego celem jest wspieranie w rozwoju dzieci wychowujących się w domach dziecka, rodzinach zastępczych oraz w rodzinach o niskim statusie materialnym (2-9.02.2018).

4. Wzięłam udział w przygotowaniu i prezentacji doświadczeń chemicznych dla dzieci w ramach Festiwalu Nauki i Zabawy na rzecz Pomorskiego Hospicjum dla Dzieci (22.04.2017).

5. Wygłosiłam wykład pt. „Zastosowanie związków peptydowych w dermatologii i kosmetologii" w ramach Jesiennych Spotkań ze Zdrowiem „Piękni Jesienią" organizowanych przez Wyższą Szkołę Zdrowia w Gdańsku (7.11.2016).

6. Wykonałam prezentację eksperymentów z zakresu chemii nieorganicznej podczas VII Bałtyckiego Festiwalu Nauki (29-30.05.2009)

7. Przygotowałam artykuł dla czasopisma Laboratorium: DAWGUL M.*, Kamysz W. Naturalne antybiotyki peptydowe. Laboratorium 2009, nr 10, s. 12-15.

8. Przygotowałam i zaprezentowałam pokazy popularno-naukowe promujące zdrowy styl życia w ramach „Piknik na Zdrowie" (23.06.2007).

9. Przygotowałam i zaprezentowałam pokazy popularno-naukowe promujące zdrowy styl życia w ramach „Piknik AMG – Centrum Twojego Zdrowia (28.05.2006).

10. Zaprezentowałam cykl pokazów popularnonaukowych promujących zdrowy styl życia w ramach II Festyn Promocji Zdrowia Medykalia (14.05.2005).

7. **Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**

Poza przedstawioną w powyższych punktach działalnością naukową, dydaktyczną oraz popularyzującą naukę jestem zaangażowana także we współpracę z sektorem gospodarczym:

1. Odbyłam miesięczny staż w laboratorium farmaceutycznym Homeofarm w Gdyni (10.2010), gdzie zajmowałam się opracowywaniem alternatywnych mieszanin konserwujących do preparatów kosmetycznych.

2. Pełniłam funkcję opiekuna stażu w ramach projektu „Współpraca nauki i biznesu przyszłością Pomorza", dofinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki (2012).

3. Współpracuję z firmą Spreewaelder Arzneimittel GmbH w zakresie konsultacji nt. formulacji preparatów kosmetycznych i wyrobów medycznych do zastosowania na skórę (od 2019 – obecnie).

Małgorzata Paduszyńska

(podpis wnioskodawcy)

Literatura:

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999 May 21;284(5418):1318-22.
2. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001; 14;358(9276):135-8.]
3. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2017 May 1;41(3):276-301.
4. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence. 2011 Sep-Oct;2(5):445-59.
5. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. Clin Infect Dis. 2001 Oct 15;33(8):1387-92.

6. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. Heliyon. 2018 Dec;4(12):e01067.
7. Bryers JD. Medical biofilms. Biotechnol Bioeng. 2008 May 1;100(1):1-18.
8. Bispo PJ, Haas W, Gilmore MS. Biofilms in infections of the eye. Pathogens. 2015 Mar 23;4(1):111-36.
9. Zegans ME, Becker HI, Budzik J, O'Toole G. The role of bacterial biofilms in ocular infections. DNA Cell Biol. 2002 May-Jun;21(5-6):415-20.
10. O'Gara JP, Humphreys H. Staphylococcus epidermidis biofilms: importance and implications. J Med Microbiol. 2001 Jul;50(7):582-7.
11. Zimmerli W. Infection and musculoskeletal conditions: Prosthetic-joint-associated infections. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2006 Dec;20(6):1045-63.
12. Joo HS, Otto M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. Chem Biol. 2012 Dec 21;19(12):1503-13.
13. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. Antimicrob Resist Infect Control. 2019;8:76.
14. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2010 Apr;35(4):322-32.
15. Soares A, Roussel V, Pestel-Caron M, Barreau M, et al. Understanding Ciprofloxacin Failure in Pseudomonas aeruginosa Biofilm: Persister Cells Survive Matrix Disruption. Front Microbiol. 2019;10:2603.
16. Peschel A, Sahl HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. Nat Rev Microbiol. 2006 Jul;4(7):529-36.
17. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. Nucleic Acids Res. 2016 Jan 4;44(D1):D1087-93.
18. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Kamysz W, et al. Citropin 1.1-treated central venous catheters improve the efficacy of hydrophobic antibiotics in the treatment of experimental staphylococcal catheter-related infection. Peptides. 2006;27(6):1210-6.
19. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Kamysz W, et al. The lipopeptides Pal-Lys-Lys-NH(2) and Pal-Lys-Lys soaking alone and in combination with intraperitoneal vancomycin prevent vascular graft biofilm in a subcutaneous rat pouch model of staphylococcal infection. Peptides. 2007;28(6):1299-303.
20. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Kamysz W, et al. Temporin A alone and in combination with imipenem reduces lethality in a mouse model of staphylococcal sepsis. J Infect Dis. 2005 Nov 1;192(9):1613-20.

21. Simonetti O, Cirioni O, Goteri G, Ghiselli R, et al. Temporin A is effective in MRSA-infected wounds through bactericidal activity and acceleration of wound repair in a murine model. Peptides. 2008 Apr;29(4):520-8.
22. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. 2002 Jan 24;415(6870):389-95.
23. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends Immunol. 2009 Mar;30(3):131-41.
24. Shai Y. AD, inventor Antimicrobial and anticancer lipopeptides 2004.
25. Otto M. Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol. 2009 Aug;7(8):555-67.
26. Gkana EN, Doulgeraki AI, Chorianopoulos NG, Nychas GE. Anti-adhesion and Antibiofilm Potential of Organosilane Nanoparticles against Foodborne Pathogens. Front Microbiol. 2017;8:1295.
27. Bonsaglia E.C.R SNCC, Fernades A.Jr; Araujo J.P.Jr., Tsunemi H.H, Rall V.L.M. Production of biofilm by Listeria monocytogenes in different materials and temperatures. Food Control. 2014;35:386-91.
28. Willcox MD, Hume EB, Aliwarga Y, Kumar N, Cole N. A novel cationic-peptide coating for the prevention of microbial colonization on contact lenses. J Appl Microbiol. 2008 Dec;105(6):1817-25.
29. Cole N, Hume EB, Vijay AK, Sankaridurg P, Kumar N, Willcox MD. In vivo performance of melimine as an antimicrobial coating for contact lenses in models of CLARE and CLPU. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Jan;51(1):390-5.
30. Dutta D, Ozkan J, Willcox MD. Biocompatibility of antimicrobial melimine lenses: rabbit and human studies. Optom Vis Sci. 2014 May;91(5):570-81.
31. Mannis M.J CJ. The use of synthetic cecropin (Shiva-11) in preservative-free timolol and contact lens solutions. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993;34(859).
32. Sousa LB, Mannis MJ, Schwab IR, Cullor J, et al. The use of synthetic Cecropin (D5C) in disinfecting contact lens solutions. CLAO J. 1996 Apr;22(2):114-7.
33. Willcox MD, Harmis N, Cowell, Williams T, Holden. Bacterial interactions with contact lenses; effects of lens material, lens wear and microbial physiology. Biomaterials. 2001 Dec;22(24):3235-47.
34. Wu YT, Zhu H, Harmis NY, Iskandar SY, Willcox M, Stapleton F. Profile and frequency of microbial contamination of contact lens cases. Optom Vis Sci. 2010;87(3):E152-8.

35. Keay L, Stapleton F. Development and evaluation of evidence-based guidelines on contact lens-related microbial keratitis. Cont Lens Anterior Eye. 2008 Feb;31(1):3-12.
36. Willcox MD, Holden BA. Contact lens related corneal infections. Biosci Rep. 2001;21(4):445-61.
37. LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. Candida albicans biofilms produce antifungal tolerant persister cells. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(11):3839-46.
38. Douglas LJ. Candida biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003;11(1):30-6.
39. Rabadia A. KS KD. Study of synergistic action of cefotaxime and Terminalia chebula on Acinetobacter baumannii using checkerboard Assay. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2019;5(3):830-2.
40. Characterization of Genatmycin G, Genatmycin KRKA, Gentamycin WZF, Bedicort G. Triderm. Available online: http.//www.pharmindex.pl (accessed on 6 June 2020).
41. USP. Gentamicin Sulfate - PRODUCT DATA SHEET. Version 20. 2010.
42. Wang L, Di Luca M, Tkhilaishvili T, Trampuz A, Gonzalez Moreno M. Synergistic Activity of Fosfomycin, Ciprofloxacin, and Gentamicin Against Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa Biofilms. Front Microbiol. 2019;10:2522.
43. Batoni G, Maisetta G, Brancatisano FL, Esin S, Campa M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. Curr Med Chem. 2011;18(2):256-79.
44. Park SC, Park Y, Hahm KS. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. Int J Mol Sci. 2011;12(9):5971-92.
45. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. Biomolecules. 2018;19;8(1).