



Autoreferat

Otrzymywanie, ocena oraz potencjalne zastosowanie przeciwbakteryjnych
związków peptydowych

dr n. farm. Katarzyna E. Greber

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej
Wydział Farmaceutyczny
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 2021

1. Imię i nazwisko:

Katarzyna Ewa Greber

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

12.07.2004 **Magister**
Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii
Tytuł pracy magisterskiej: „*Optymalizacja procesu otrzymywania Temporyny A*”
Promotor: dr Wojciech Kamysz

29.11.2011 **Doktor nauk farmaceutycznych**
Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z OML
Tytuł pracy doktorskiej: „*Synteza oraz badania właściwości fizykochemicznych i biologicznych surfaktantów opartych na lipopeptydach*”.
Promotor: prof. dr hab. Jerzy W. Łukasiak

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych:

Stanowisko	Okres	Jednostka
Technik	2004-2005	Katedra i Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny
Asystent	2005-2013	Katedra i Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny
Adiunkt	2013-obecnie	Katedra i Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny

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

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Otrzymywanie, ocena oraz potencjalne zastosowanie przeciwbakteryjnych związków peptydowych.

Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 219, ust. 1, pkt. 2b ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce stanowi cykl siedmiu powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Prace te zostały opublikowane w latach 2017-2020. Łączna wartość współczynnika oddziaływania **Impact Factor** (IF) prac składających się na osiągnięcie naukowe wynosi **24,915**, natomiast łączna liczba punktów **MNiSW** wynosi **510**.

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych:

- A1. Kirsten Reddersen, **Katarzyna E. Greber**, Izabela Korona-Głowniak, Cornelia Wiegand C. *The Short Lipopeptides (C₁₀)₂-KKKK-NH₂ and (C₁₂)₂-KKKK-NH₂ Protect HaCaT Keratinocytes from Bacterial Damage Caused by Staphylococcus aureus Infection in a Co-Culture Model*, Antibiotics. 2020; 9, 1-8.
(Wskaźnik **Impact Factor: 3,893**; punktacja **MNiSW: 70**)
- A2. **Katarzyna E. Greber**, Melanie Roch, Mauro A. Rosato, Maria P. Martinez, Adriana E. Rosato, *Efficacy of newly generated short antimicrobial cationic lipopeptides against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*, Int. J. Antimicrob. Agents. 2020, 55, 1-6.
(Wskaźnik **Impact Factor: 4,621**; punktacja **MNiSW: 100**)
- A3. Brita Hensel, Ulrike Jakob, Kathi Scheinpflug, Kristin Mühldorfer, Filip Schröter, Jana Schäfer, **Katarzyna Greber**, Markus Jung, Martin Schulze, *Low temperature preservation of porcine semen: influence of short antimicrobial lipopeptides on sperm quality and bacterial load*, Sci. Rep. 2020, 10, 1-12.
(Wskaźnik **Impact Factor: 3,998**; punktacja **MNiSW: 140**)
- A4. **Katarzyna E. Greber***, Joanna Zielińska, Łukasz Nierzwicki, Krzesimir Ciura, Piotr Kawczak, Joanna Nowakowska, Tomasz Bączek, Wiesław Sawicki, *Are the short cationic lipopeptides bacterial membrane disruptors? Structure-Activity Relationship and molecular dynamic evaluation*, BBA-Biomembranes. 2019, 1861, 93-99.
(Wskaźnik **Impact Factor: 3,411**; punktacja **MNiSW: 100**)
- A5. **Katarzyna Greber***, Krzesimir Ciura, Mariusz Belka, Piotr Kawczak, Joanna Nowakowska, Tomasz Bączek, Wiesław Sawicki, *Characterization of antimicrobial and hemolytic properties of short synthetic cationic lipopeptides based on QSAR/QSTR approach*, Amino Acids. 2018, 50, 479-485.
(Wskaźnik **Impact Factor: 2,520**; punktacja **MNiSW: 30**)
- A6. **#Katarzyna E. Greber***, Małgorzata Dawgul, *Antimicrobial peptides under clinical trials*, Curr. Top. Med. Chem. 2017, 17, 620-628.
(Wskaźnik **Impact Factor: 3,374**; punktacja **MNiSW: 40**)
- A7. Małgorzata Dawgul, **Katarzyna E. Greber[§]**, Sylwia Bartoszevska, Wioletta Barańska-Rybak, Wiesław Sawicki, Wojciech Kamysz, *In vitro evaluation of cytotoxicity and permeation study on lysine- and arginine-based lipopeptides with proven antimicrobial activity*, Molecules. 2017, 22, 1-7.
(Wskaźnik **Impact Factor: 3,098**; punktacja **MNiSW: 30**)

*Autor korespondencyjny

[§] Równorzędny pierwszy autor

Praca pogładowa

Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w Wykazie osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny.

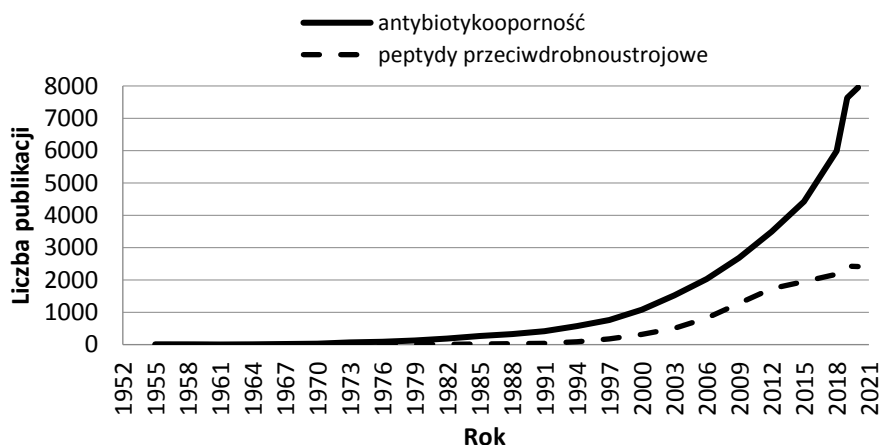
WPROWADZENIE

Rozprzestrzenianie się oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe jest problemem stale narastającym od wielu lat. Nowe mechanizmy oporności pojawiają się i rozprzestrzeniają na całym świecie, prowadząc tym samym do spadku skuteczności terapii wielu chorób zakaźnych [1]. Według raportu WHO (*Antibacterial agents in clinical development, an analysis of the antibacterial clinical development pipeline*, 2019) w samych Stanach Zjednoczonych każdego roku ponad 2,8 miliona osób zapada na choroby wywołane przez antybiotykooporne drobnoustroje. Z kolei analiza O’Neilla z 2014 roku (*Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance*) szacuje, że oporność na antybiotyki powoduje na świecie ponad 700 000 zgonów rocznie. Eksperti (*Antimicrobial resistance: global report on surveillance*, 2014) podkreślają, że świat wkracza w erę postantybiotyczną i, o ile nie zostaną podjęte inicjatywy, w postaci wielokierunkowych strategii walki z antybiotykoopornością, to pospolite i niegroźne dzisiaj infekcje bakteryjne mogą stać się wkrótce śmiertelne, a jak przewiduje O’Neill liczba zgonów do 2050 roku może wzrosnąć nawet do 10 milionów rocznie.

Jedną ze strategii walki z antybiotykoopornością, rekomendowaną przez WHO, jest opracowywanie nowych substancji leczniczych, wykazujących nowe mechanizmy działania. Doskonałą matrycą do tego celu jest grupa peptydów przeciwdrobnoustrojowych (Antimicrobial peptides - AMP) [2-5].

Naturalne AMP wytwarzane są przez szereg organizmów *Eucaryota*. Ich działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec patogenów, w tym bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, wirusów i grzybów, przebiega wg różnych mechanizmów, na przykład poprzez rozerwanie błony, oddziaływanie na struktury wewnątrzkomórkowe czy immunomodulację [6-12].

Chociaż kilka naturalnych AMP odkryto już na początku XX wieku to zainteresowanie nimi jako potencjalnymi antybiotykami wzrosło dopiero w obliczu widocznego wzrostu antybiotykooporności, czego odzwierciedleniem jest liczba opublikowanych doniesień naukowych w latach 1952-2020 (Ryc. 1) [13].



Rycina 1. Liczba publikacji dotyczących zagadnienia antybiotykooporności oraz peptydów przeciwdrobnoustrojowych opublikowanych w latach 1952 – 2020; (źródło: Scopus; hasło wyszukiwania: antimicrobial peptides; antibiotic resistance).

Większość naturalnych AMP to cząsteczki amfipatyczne, kationowe, złożone z 10-50 reszt aminokwasowych. Ładunek dodatni zapewniają cząsteczkom AMP aminokwasy zasadowe: arginina, lizyna i histydyna. Amfipatyczność cząsteczki AMP to najczęściej rezultat wzajemnego przestrzennego ułożenia hydrofilowych i hydrofobowych reszt aminokwasowych [14-18].

AMP charakteryzuje strukturalna różnorodność, gdyż w określonych warunkach ich cząsteczki mogą przyjmować drugorzędową strukturę np. β -harmonijki lub α -helisy. Do grupy amfipatycznych α -helikalnych AMP należą m.in. magainina i LL-37, u których drugorzędowa struktura pojawia się dopiero w zetknięciu ze środowiskiem niepolarnym, jakim jest np. błona bakteryjna. Inne AMP, takie jak defensyny, charakteryzują się dwoma lub więcej fragmentami sfaldowanymi w β -arkusz, stabilizowanymi wiązaniami disulfidowymi. Wreszcie peptydy, które nie mają określonego motywu strukturalnego i są definiowane przez wysoką zawartość określonych reszt aminokwasowych, takich jak histydyna, arginina, glicyna lub tryptofan. Na przykład ludzkie histatyny, bogate w reszty histydynowe i indolocydyna z bydłych leukocytów, która ma wiele reszt tryptofanu i argininy [16-23].

AMP w porównaniu z konwencjonalnymi antybiotykami prezentują kilka niekwestionowanych zalet. Po pierwsze, często działają z wykorzystaniem wielu niespecyficznych mechanizmów jednocześnie, stąd obserwuje się ich szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego. Po drugie, niespecyficzne mechanizmy działania sprawiają, że istnieje stosunkowo niskie prawdopodobieństwo pojawienia się lekooporności na AMP. Po trzecie, wybrane AMP oprócz bezpośredniego działania przeciwdrobnoustrojowego wykazują zdolność do modulowania odpowiedzi immunologicznej np. poprzez aktywność chemotaktyczną, czy modulację ekspresji prozapalnych cytokin [6,24-28].

Obok niezaprzeczalnych zalet istnieją też ograniczenia możliwości stosowania AMP pochodzenia naturalnego. Związane są one z podatnością na degradację proteolityczną, wiązaniem z białkami surowicy, spadkiem aktywności przeciwbakteryjnej w obecności fizjologicznego stężenia soli oraz wysokimi kosztami produkcji wynikającymi ze złożoności struktury [13,29-32]. Odpowiedzią na te ograniczenia mogą być krótkie lipopeptydy kationowe zaprojektowane i otrzymane *de novo*. Krótkie lipopeptydy kationowe stanowią atrakcyjną alternatywę w porównaniu z dłuższymi naturalnymi peptydami przeciwdrobnoustrojowymi ze względu na prostą strukturę, większą stabilność fizykochemiczną wynikającą z obecności D-aminokwasów i kwasów tłuszczowych, czy amidacji C-końca. Dodatkowo, krótkie lipopeptydy kationowe są cząsteczkami amfifilowymi, dlatego mają tendencję do tworzenia agregatów (miceli) o hydrofobowym rdzeniu i hydrofilowej powierzchni. Dzięki temu są lepiej chronione przed degradacją proteolityczną w porównaniu z peptydami, które agregacji nie ulegają. Liczne badania potwierdzają ich wysoką aktywność wobec szczepów opornych na konwencjonalne antybiotyki, w tym metycylinooporne *Staphylococcus aureus* (MRSA) i wankomycynooporne enterokoki (VRE), a także przeciwnowotworową i immunomodulującą [33-38].

ZAŁOŻENIA I CEL BADAŃ

Wobec rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki istnieje ciągle potrzeba poszukiwania nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych.

Celem podjętych badań naukowych, zaprezentowanych w cyklu 6 publikacji oryginalnych i 1 pracy pogładowej, była synteza, ocena właściwości biologicznych i fizykochemicznych oraz zaprezentowanie możliwości potencjalnego zastosowania związków przeciwdrobnoustrojowych o budowie peptydowej.

Związki peptydowe zaprojektowałam w taki sposób by odwzorować amfipatyczne właściwości II-rzędowej struktury naturalnych AMP i przelożyć je na strukturę I-rzędową. Założyłam, że dodatni ładunek syntezowanych cząsteczek będzie pochodził od reszt aminokwasów zasadowych (Lys, Arg). Amfipatyczność cząsteczek uzyskałam poprzez wprowadzenie hydrofobowego fragmentu kwasu tłuszczowego (dekanowego, dodekanowego, tetradekanowego i heksadekanowego).

Założyłam, że otrzymane w ten sposób lipopeptydy będą poddane ocenie właściwości przeciwdrobnoustrojowych wobec szczepów referencyjnych oraz klinicznych, w tym wobec szczepów metycylinoopornych, oraz ocenie aktywności w warunkach *in vivo* z wykorzystaniem larw *Galleria mellonella* (**publikacje A2, A7**). Postanowiłam ocenić toksyczność wybranych lipopeptydów wobec ludzkich keratynocytów oraz zweryfikować, czy lipopeptydy wykazują działanie ochronne wobec tych komórek w modelu zakażonej rany (**publikacje A1, A7**). Zaplanowałam, że wybrane lipopeptydy zostaną poddane ocenie właściwości konserwujących nasienie *Sus domesticus* (**publikacja A3**). Ponadto, zaplanowałam wykonanie modelowania jakościowej i ilościowej zależności pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością przeciwbakteryjną (Structure-Activity Relationship – SAR, Quantitative Structure-Activity Relationship – QSAR), ilościowej zależności pomiędzy strukturą chemiczną a toksycznością (Quantitative Structure-Toxicity Relationship – QSTR). Zaplanowałam także przeprowadzenie symulacji odzwierciedlających zachowanie badanych lipopeptydów w błonie bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych z wykorzystaniem dynamiki molekularnej (**publikacje A4, A5**). Dokonałam również przeglądu przeciwdrobnoustrojowych związków peptydowych, zakwalifikowanych do badań klinicznych (**publikacja A6**).

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWE I TOKSYCZNOŚĆ

Lipopeptydy powstałe w wyniku połączenia aminokwasów zasadowych z kwasem heksadekanowym C₁₆-KεK-NH₂, C₁₆-KRK-NH₂, C₁₆-RR-NH₂, C₁₆-RRR-NH₂ poddano ocenie właściwości przeciwdrobnoustrojowych, a wyniki zaprezentowano w pracy **A7**. Wszystkie badane związki wykazywały stosunkowo silne działanie przeciwbakteryjne i umiarkowane przeciwgrzybicze. Minimalne stężenie hamujące (MIC) wobec *Staphylococcus aureus* mieściło się w zakresie od 2 do 8 mg/L. Najbardziej aktywnym związkiem w teście MIC na *Staphylococcus aureus* był C₁₆-RRR-NH₂. W przypadku *Escherichia coli* zahamowanie wzrostu wymagało wyższego stężenia lipopeptydów, MIC dla badanych związków wynosiło od 8 do 16 mg/L. MIC wyznaczone dla *Candida albicans* było już znacznie wyższe i dla wszystkich związków wynosiło 128 mg/L. Uzyskane wartości minimalnego stężenia

bakteriobójczego (MBC) dla wszystkich testowanych szczepów były przeważnie równe MIC lub dwukrotnie od niego większe. W omawianej pracy (A7) uzyskane wyniki mikrobiologiczne porównano z wcześniej opublikowanymi danymi uzyskanymi dla lipopeptydów z dwoma łańcuchami kwasu tłuszczowego $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ i $(C_{12})_2$ -KKKK-NH₂, oraz z C_{16} -KKK-NH₂ [39,40]. Ponieważ charakteryzowała je podobna aktywność przeciwdrobnoustrojowa, postanowiłam dołączyć je do badań cytotoksyczności wobec komórek HaCaT. Na podstawie wykonanych testów stwierdzono wysoką toksyczność wszystkich lipopeptydów z jednym łańcuchem heksadekanowym. Ich wartość IC50 wahała się od 1,8 do 7,4 mg/L, co w przypadku tych lipopeptydów było poniżej najniższego stężenia aktywnego mikrobiologicznie. Najbardziej toksycznymi peptydami były C_{16} -KK-NH₂ i C_{16} -RR-NH₂, a najniższą toksyczność wykazywał lipopeptyd C_{16} -KεK-NH₂. Na podstawie otrzymanych wyników toksyczności badanych lipopeptydów z jednym kwasem heksadekanowym, wobec keratynocytów, stwierdzono że nie można ich zakwalifikować do dalszych badań nad zastosowaniem w terapii infekcji bakteryjnych.

W przeciwieństwie do lipopeptydów z jednym kwasem heksadekanowym, związki zawierające dwa łańcuchy kwasu dekanowego i dodekanowego okazały się nietoksyczne dla ludzkich keratynocytów w ich mikrobiologicznie aktywnych stężeniach. Wyznaczone wartości IC50 dla $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ i $(C_{12})_2$ -KKKK-NH₂ wynosiły odpowiednio 49,4 mg/L i 42,1 mg/L.

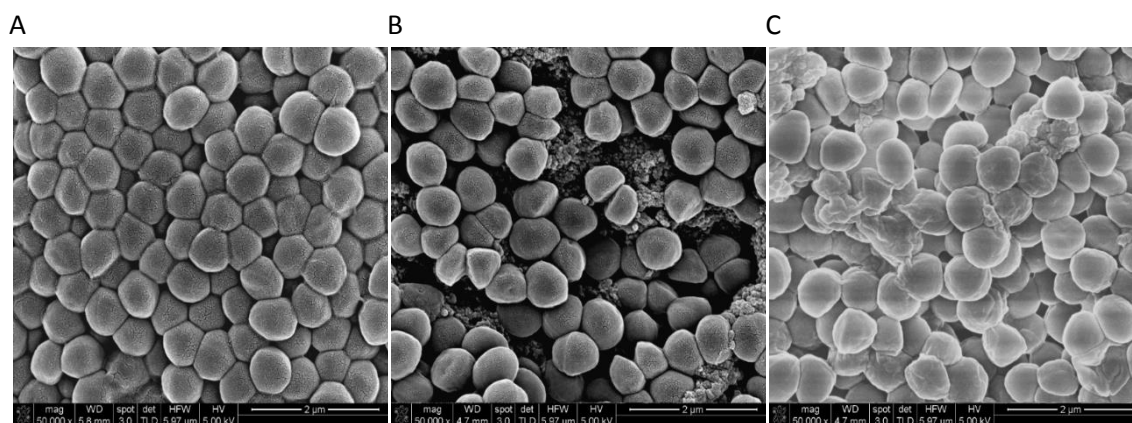
W pracy A7 przedstawiono wyniki badania zdolności lipopeptydów do przenikania przez skórę ludzką. Na sztuczne membrany umieszczone w komorach Franza aplikowano roztwory lipopeptydów w stężeniu 1 g/L. Po 24h eksperymentu nie stwierdzono obecności żadnego lipopeptydu w płynie akceptorowym. Można się zatem spodziewać, że związki te nie pokonują bariery skórnej.

Wysoka aktywność przeciwbakteryjna, potwierdzona we wcześniejszych pracach, oraz wysokie IC50 wobec HaCaT (A7) i ludzkich krwinek czerwonych [39] w mikrobiologicznie aktywnych stężeniach, zachęciły mnie do dalszych badań nad potencjalnym zastosowaniem lipopeptydów z dwoma łańcuchami kwasu tłuszczowego jako nowych środków przeciwdrobnoustrojowych. Szczególnie interesowało mnie badanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych w warunkach *in vivo*. W tym celu nawiązałam współpracę z Houston Methodist Research Institute (USA). Wynikiem tej współpracy jest publikacja A2, w której przedstawiono wyniki badań nad aktywnością przeciwdrobnoustrojową $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ i $(C_{12})_2$ -KKKK-NH₂ wobec szczepów *S. aureus* o znaczeniu klinicznym. Związkiem odniesienia w tych badaniach była daptomycyna, antybiotyk silnie aktywny wobec bakterii Gram-dodatnich i wykorzystywany w terapii zakażeń skóry i tkanek miękkich [41]. Badania wykazały podobną aktywność $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ i $(C_{12})_2$ -KKKK-NH₂ wobec wrażliwych na metycylinę szczepów *S. aureus* (MSSA) na poziomie 4 – 8 mg/L, oraz wobec metycylinoopornych szczepów *S. aureus* (MRSA) na poziomie 4 – 32 mg/L. Co ważne, oba lipopeptydy wykazały podobną aktywność wobec wszystkich 10 testowanych szczepów klinicznych MRSA, w tym szczepów opornych na daptomycynę, takich jak CB1634. Wyniki te sugerują, że lipopeptydy $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ i $(C_{12})_2$ -KKKK-NH₂ są aktywne wobec szczepów MRSA niezależnie od fenotypu. Stwierdzono też, że w przeciwieństwie do daptomycyny, aktywność lipopeptydów jest niezależna od obecności jonów wapnia w pożywce. Wyznaczenie krzywych przeżywalności przeprowadzone na 3 szczepach, jednym MSSA i dwóch MRSA, wykazało że $(C_{10})_2$ -KKKK-

NH₂, tak jak daptomycyna, wywoływał efekt bakteriobójczy u wszystkich badanych szczepów po 8h. Drugi z badanych lipopeptydów, (C₁₂)₂-K₄-NH₂, hamował rozwój drobnoustrojów przez pierwsze 8h lecz po 24h obserwowano ponowny wzrost komórek.

W celu zbadania, czy lipopeptydy (C₁₀)₂-K₄-NH₂ i (C₁₂)₂-K₄-NH₂ zachowują aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec szczepów MSSA i MRSA w warunkach *in vivo*, jako organizm modelowy zastosowano larwy barciaka większego (*Galleria mellonella*). Larwy zakażone *S. aureus* poddawano działaniu (C₁₀)₂-K₄-NH₂, (C₁₂)₂-K₄-NH₂ oraz daptomycyny. Zaobserwowano, że w pierwszym dniu terapii leczenie (C₁₀)₂-K₄-NH₂ skutkowało przeżywalnością larw między 50–90%, a (C₁₂)₂-K₄-NH₂ między 60–80%. Zbliżoną, 80–90% przeżywalność w pierwszym dniu terapii zaobserwowano wśród larw, którym podano daptomycynę.

Dzięki zastosowaniu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) zaobserwowano, że komórki bakteryjne po wystawieniu na działanie badanych lipopeptydów uległy znacznej deformacji, co wskazuje na zmiany strukturalne w obrębie błony bakteryjnej powiązane z uwolnieniem zawartości komórek (Ryc. 2).



Rycina 2. Zmiany morfologiczne komórek *Staphylococcus aureus* ATCC 29231 przed (A) i po zastosowaniu (C₁₀)₂-K₄-NH₂ (B) i (C₁₂)₂-K₄-NH₂ (C) obserwowane za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).

Badania nad aktywnością lipopeptydów z dwoma łańcuchami tłuszczowymi kontynuowałam w ramach współpracy z Uniwersytetem Friedricha Schillera w Jenie (Niemcy). Rezultatem tej współpracy jest publikacja **A1**, w której przedstawiono badania z wykorzystaniem wspólnej hodowli keratynocytów HaCaT i *S. aureus* służącej jako model *in vitro* zakażonej rany. Celem tych badań była ocena, czy lipopeptydy (C₁₀)₂-K₄-NH₂ i (C₁₂)₂-K₄-NH₂ mogą zapobiegać uszkodzeniom bakteryjnym keratynocytów wywołanym zakażeniem *Staphylococcus aureus*. Wykorzystano do tego celu pomiar stężenia komórkowego ATP, dehydrogenazy mleczanowej (LDH), oraz cytokin prozapalnych: interleukiny-6 i interleukiny-1 α .

Zaobserwowano, że w niezakażonej hodowli, czyli negatywnej próbie kontrolnej, zawartość ATP podwajała się co 24h, podczas gdy w hodowli zakażonej *S. aureus* (dodatnia próba kontrolna) poziomy ATP były bardzo niskie, gdyż infekcja powodowała poważne uszkodzenie keratynocytów HaCaT oraz ich bardzo małą żywotność. Zastosowanie lipopeptydów (C₁₀)₂-K₄-NH₂ i (C₁₂)₂-K₄-NH₂ zapobiegało uszkodzeniom keratynocytów HaCaT po zakażeniu *S. aureus*, przywracało żywotność komórek oraz poziom

ATP do poziomu niezakażonej próby kontrolnej. Zakażenie keratynocytów HaCaT *S. aureus* przyczyniało się do znacznego wzrostu LDH oraz cytokin IL-6 i IL-1 α po 24 i 48h, podczas gdy stężenia tych substancji w próbie negatywnej były bardzo niskie. Podobnie w zakażonych hodowlach HaCaT, które inkubowano z lipopeptydami, poziomy LDH, IL-6 i IL-1 α były bardzo niskie, co wskazuje na ochronę keratynocytów przed uszkodzeniem bakteryjnym przez oba badane lipopeptydy.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że obydwie lipopeptydy wykazują bardzo szybkie działanie przeciwbakteryjne, a tym samym zapobiegają uszkodzeniu keratynocytów przez *S. aureus* we wspólnej hodowli symulującej zainfekowaną ranę. Dodatkowo, lipopeptydy hamowały prozapalną reakcję keratynocytów wywołaną zakażeniem *S. aureus* co czyni je obiecującymi kandydatami o dużym potencjale terapeutycznym w leczeniu zakażeń miejscowych.

Wcześniej wspomniałam, że wysoka toksyczność badanych lipopeptydów z jednym łańcuchem kwasu heksadekanowego wyklucza je z dalszych badań nad ich zastosowaniem w terapii infekcji bakteryjnych. Jednak infekcje to nie jedyny obszar gdzie występuje konieczność zwalczania rozwoju drobnoustrojów. Innym obszarem jest konserwacja komórek, np. nasienia. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne, podobnie jak kriokonserwacja, wywołuje znaczny spadek wartości zapładniającej nasienia wybranych gatunków zwierząt [42-44]. Z tego względu, preferowaną metodą konserwacji takiego nasienia jest przechowywanie w stanie płynnym w obecności antybiotyków (Dyrektywa 90/429/EWG). Niestety coraz większa część szczepów zanieczyszczających ejakulatory jest oporna na antybiotyki powszechnie stosowane jako dodatki do rozcieńczalników nasienia [45,46].

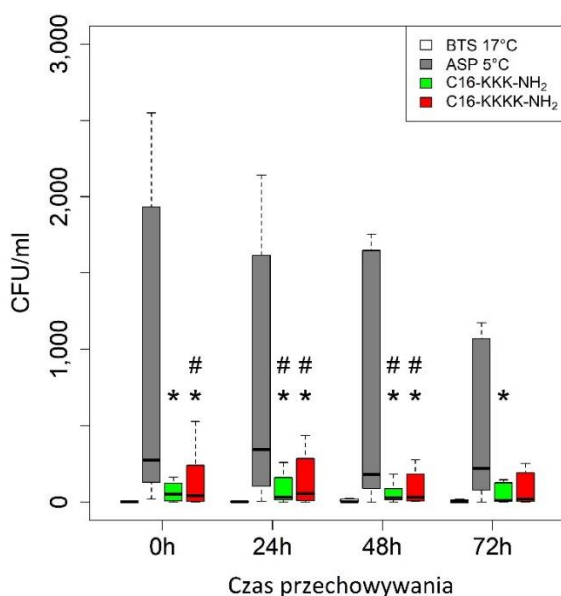
Z tego powodu postanowiłam zbadać, czy potencjał przeciwdrobnoustrojowy lipopeptydów, które są zbyt toksyczne by rozważać ich zastosowanie medyczne, mógłby zostać wykorzystany do konserwacji nasienia samców zwierząt hodowlanych. W tym celu nawiązałam współpracę z Instytutem Rozrodu Zwierząt Gospodarskich w Bernau bei Berlin (Niemcy). Rezultatem tej współpracy jest publikacja **A3**, której celem była ocena niskotemperaturowej konserwacji nasienia *Sus domesticus* z zastosowaniem lipopeptydów przeciwdrobnoustrojowych.

Pierwszy etap eksperymentu polegał na ocenie potencjalnego szkodliwego wpływu lipopeptydów na plemniki *Sus domesticus* rasy Pietrain. Wytypowano do badania siedem lipopeptydów: C₁₆-KK-NH₂, C₁₆-KKK-NH₂, C₁₆-KKKK-NH₂, C₁₄-KK-NH₂, C₁₄-KKK-NH₂, C₁₄-KKKK-NH₂, (C₁₀)₂-KKKK-NH₂. Sporządzono zawiesinę nasienia w rozcieńczalniku a następnie dodano lipopeptydy w takiej ilości by ich ostateczne stężenie wynosiło 1xMIC oraz 2xMIC. Próbkę inkubowano przez 30 i 300 min. w 38°C. Po zakończonej inkubacji dokonano analizy parametrów charakteryzujących jakość nasienia: aktywności mitochondriów (MITO), integralności akrosomu i błony plazmatycznej (PMAI) oraz ruchliwości progresywnej. Stwierdzono, że pięć z siedmiu lipopeptydów, C₁₆-KK-NH₂, C₁₄-KK-NH₂, C₁₄-KKK-NH₂, C₁₄-KKKK-NH₂, (C₁₀)₂-KKKK-NH₂, miało znaczny negatywny wpływ na większość badanych parametrów charakteryzujących jakość nasienia. Szczególnie niekorzystny wpływ obserwowano przy zastosowaniu stężenia 2xMIC. Dwa pozostałe lipopeptydy, C₁₆-KKK-NH₂ i C₁₆-KKKK-NH₂, również powodowały pogorszenie jakości nasienia w stężeniach 2xMIC, lecz ich wpływ na jakość nasienia w stężeniu 1xMIC był niewielki. Stwierdzono bowiem, że C₁₆-KKK-NH₂ wpłynął nieznacznie

na PMAI i ruchliwość progresywną, podczas gdy C₁₆-KKKK-NH₂ nie oddziaływał negatywnie na jakość badanego nasienia.

Wyselekcjonowane w pierwszym etapie eksperymentu lipopeptydy o najmniejszym wpływie na jakość nasienia (C₁₆-KKK-NH₂, C₁₆-KKKK-NH₂) poddano dalszej ocenie, której częścią były badania mikrobiologiczne. Postanowiono określić wpływ bezpiecznego dla nasienia stężenia lipopeptydów (1×MIC) na całkowitą liczbę drobnoustrojów w próbkach nasienia poprzez określenie jednostek tworzących kolonie (CFU/mL). CFU/mL określano po 0, 24, 48 i 72h przechowywania nasienia z gentamycyną (kontrola negatywna), nasienia bez substancji przeciwdrobnoustrojowej (kontrola pozytywna) oraz nasienia z lipopeptydami C₁₆-KKK-NH₂ lub C₁₆-KKKK-NH₂. Stwierdzono, że w porównaniu z kontrolą pozytywną, lipopeptydy znacząco zmniejszają CFU/mL konserwowanego nasienia we wszystkich okresach przechowywania (Ryc. 3).

Na podstawie przeprowadzonej analizy profilu bakteryjnego w nasieniu niekonserwowanym, stwierdzono obecność 103 subkultur bakteryjnych, podczas gdy suplementacja nasienia lipopeptydami C₁₆-KKK-NH₂ i C₁₆-KKKK-NH₂ zmniejszała liczbę wykrytych subkultur odpowiednio do 56 i 67. W nasieniu niekonserwowanym odnotowano obecność gatunków bakterii, które uważane są za szczególnie niekorzystne dla skuteczności sztucznej inseminacji, tj.: *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus porcinus*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella sp.*, *Providencia stuartii*. Spośród wyżej wymienionych, w próbkach nasienia konserwowanego lipopeptydem C₁₆-KKKK-NH₂ wykryto jedynie *S. porcinus*, a w próbkach zawierających C₁₆-KKK-NH₂ tylko *P. aeruginosa*. Wskazuje to, że nasienie konserwowane lipopeptydami spełnia normy jakości produktu przeznaczonego do zabiegów sztucznej inseminacji [47].



Rycina 3. Wpływ lipopeptydów oraz czasu przechowywania na całkowitą liczbę drobnoustrojów w nasieniu. Jednostki tworzące kolonie (CFU/ml) oznaczano po 0, 24, 48 i 72h przechowywania w 17°C w BTS z gentamycyną (kontrola negatywna) lub w 5°C w ASP bez suplementów (kontrola pozytywna) lub w ASP z suplementacją lipopeptydami w stężeniu 1xMIC. Gwiazdką oznaczono istotne różnice w stosunku do ASP (*P <0,05). Hashtagem oznaczono istotne różnice w stosunku do BTS 17°C (#P <0,05).

ANALIZA QSAR/QSTR ORAZ MODELOWANIE MOLEKULARNE

Dokładne mechanizmy działania przeciwdrobnoustrojowego związków peptydowych nie są w pełni poznane. Jak dotąd zaproponowano kilka modeli opierających się na oddziaływaniach z błoną bakteryjną (model klepek beczki, pierścieniowy, dywanowy) [6,7]. Wykazano też, że większość AMP oddziałuje z wrodzonymi składnikami układu odpornościowego, takimi jak neutrofile i makrofagi, lub moduluje odpowiedź adaptacyjnego układu odpornościowego [12]. Ogromna różnorodność strukturalna sprawia, że nie ma jednego mechanizmu, który mógłby w pełni opisać działanie przeciwdrobnoustrojowe AMP. Z tego powodu identyfikacja najważniejszych cech fizykochemicznych AMP, które mają największy wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową, jest niezbędna do poszerzenia wiedzy na temat mechanizmu ich działania.

W pracy **A5** przedstawiono wyniki badania wpływu deskryptorów molekularnych na aktywność przeciwdrobnoustrojową (QSAR) i toksyczność (QSTR) 35 krótkich lipopeptydów kationowych, różniących się długością łańcucha tłuszczowego oraz składem aminokwasowym fragmentu peptydowego (Tabela 1). Aktywność przeciwdrobnoustrojową przedstawiono jako minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów Gram dodatnich (MIC), a toksyczność jako minimalne stężenie wywołujące 10% hemolizę erytrocytów ludzkich (MHC). Ponadto w pracy (**A5**), za pomocą modeli QSRR, dokonano oceny deskryptorów mających największy wpływ na oznaczaną chromatograficznie lipofilowość.

Tabela 1. Struktury lipopeptydów poddanych analizie QSAR, QSTR i QSRR.

Krótkie lipopeptydy kationowe				
C ₁₆ -K-NH ₂	C ₁₄ -K-NH ₂	C ₁₂ -K-NH ₂	C ₁₀ -K-NH ₂	C ₈ -K-NH ₂
C ₁₆ -KK-NH ₂	C ₁₄ -KK-NH ₂	C ₁₂ -KK-NH ₂	C ₁₀ -KK-NH ₂	C ₈ -KK-NH ₂
C ₁₆ -KKK-NH ₂	C ₁₄ -KKK-NH ₂	C ₁₂ -KKK-NH ₂	C ₁₀ -KKK-NH ₂	C ₈ -KKK-NH ₂
C ₁₆ -KKKK-NH ₂	C ₁₄ -KKKK-NH ₂	C ₁₂ -KKKK-NH ₂	C ₁₀ -KKKK-NH ₂	C ₈ -KKKK-NH ₂
C ₁₆ -KG-NH ₂	C ₁₄ -KG-NH ₂	C ₁₂ -KG-NH ₂	C ₁₀ -KG-NH ₂	C ₈ -KG-NH ₂
C ₁₆ -KGK-NH ₂	C ₁₄ -KGK-NH ₂	C ₁₂ -KGK-NH ₂	C ₁₀ -KGK-NH ₂	C ₈ -KGK-NH ₂
C ₁₆ -KGKG-NH ₂	C ₁₄ -KGKG-NH ₂	C ₁₂ -KGKG-NH ₂	C ₁₀ -KGKG-NH ₂	C ₈ -KGKG-NH ₂

K – lizyna; G – glicyna; C₁₆ – reszta kwasu heksadekanowego; C₁₄ – reszta kwasu tetradekanowego; C₁₂ – reszta kwasu dodekanowego; C₁₀ – reszta kwasu dekanowego; C₈ – reszta kwasu oktanowego

Za pomocą programu HyperChem dokonano optymalizacji struktur 3D badanych lipopeptydów. Następnie za pomocą programu Dragon 7.0, na podstawie otrzymanych plików, obliczone zostały deskryptory teoretyczne ilościowo różnicujące anality.

Przeprowadzono analizę regresji wielorakiej (MLR), analizę regresji cząstkowej najmniejszych kwadratów (PLS) oraz analizę regresji ortogonalnych cząstkowych najmniejszych kwadratów (OPLS). Podczas obliczeń jako zmienne zależne zastosowano wartości eksperymentalnie wyznaczonych parametrów biologicznych: logarytm minimalnego stężenia hamującego wzrost (log MIC), logarytm stężenia wywołującego 10% hemolizę (log MHC), oraz lipofilowość wyznaczoną chromatograficznie za pomocą wysokosprawnej

chromatografii cieczonej (logk); a jako zmienne niezależne zastosowano deskryptory molekularne wyznaczone za pomocą metod obliczeniowych.

Na podstawie przeprowadzonej w pracy (A5) analizy QSAR można wnioskować, że mechanizm działania badanych lipopeptydów wobec bakterii Gram dodatnich jest niespecyficzny, a różne wartości MIC wobec badanych szczepów wynikają z różnego powinowactwa lipopeptydów do błon bakteryjnych. Skład lipidowej dwuwarstwy może być głównym czynnikiem determinującym wyższą aktywność lipopeptydów wobec *Staphylococcus epidermidis* i *Bacillus subtilis* niż wobec *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*. Najważniejsze deskryptory użyte do budowy modeli mają ten sam charakter i są związane z lipofilowością: deskryptory należące do grupy *Chemically Advanced Template Search* skorygowane o lipofilowość analitów (CATS), lipofilowość obliczona za pomocą programu AlogP (ALOGP), a także liczba atomów węgla. Ponadto zaobserwowano, że parametr otrzymany chromatograficznie (logk), który można zinterpretować jako chromatograficzny parametr lipofilowości, ma podobny wpływ na aktywność jak obliczone parametry lipofilowości.

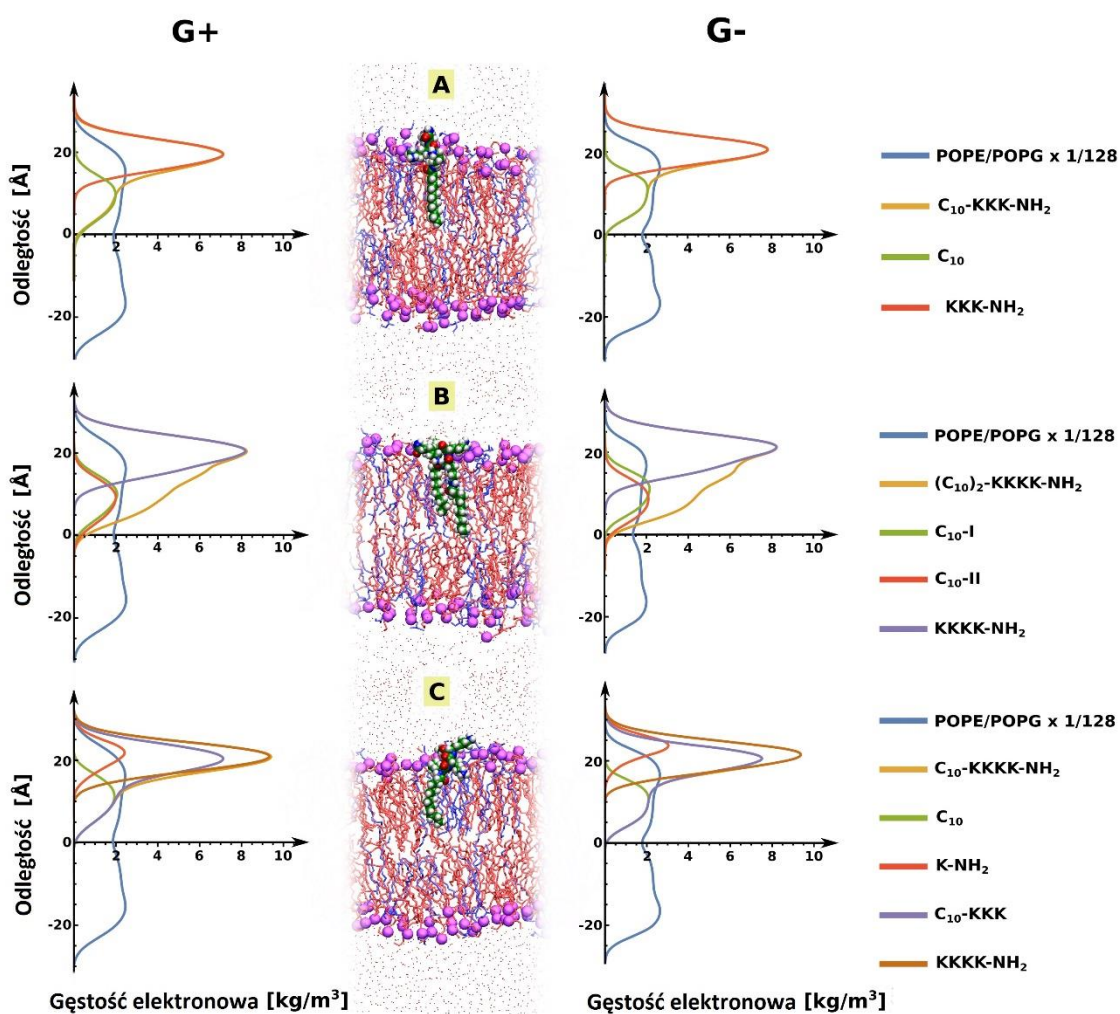
Aby uzyskać lepszy wgląd w molekularny mechanizm retencji lipopeptydów, zastosowano podejście QSRR - Quatitative Structure-Retention Relationship. Stwierdzono, że deskryptory, które silnie wpływają na retencję analitów w warunkach RP-HPLC, są związane z obliczoną lipofilowością (deskryptory ALOGP, MLOGP, CATS) oraz liczbą atomów węgla w cząsteczce. Wskazuje to, że parametr logk bardzo dobrze odzwierciedla właściwości lipofilowe badanych lipopeptydów i może być traktowany jako zamiennik logP. Z uzyskanych modeli QSTR wynika, że lipopeptydy oddziałują z błoną komórkową erytrocytów w taki sam sposób jak z błonami bakteryjnymi. Deskryptory otrzymane w modelu QSTR są bardzo podobne do opisanych wcześniej w modelach QSAR, należą do tej samej klasy i są związane z właściwościami lipofilowymi badanych lipopeptydów.

Badania nad zależnością struktura-aktywność (SAR) ułatwiają wybór wiodących struktur wykorzystywanych do dalszych badań, a także identyfikację ich właściwości molekularnych, które wpływają na aktywność biologiczną. Z kolei metody symulacji komputerowych pomagają w racjonalnym projektowaniu nowych substancji leczniczych, a ponadto dają wgląd w potencjalny mechanizm ich działania. Z tego powodu postanowiłam wykorzystać symulację dynamiką molekularną (MD) ażeby przeprowadzić wizualizację oddziaływań pomiędzy badanymi lipopeptydami a błonami lipidowymi bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych. W celu wyjaśnienia, w jaki sposób cechy strukturalne lipopeptydów wpływają na ich aktywność przeciwdrobnoustrojową, przeprowadzono analizę SAR. Wyniki tych symulacji i analiz, przedstawione w pracy A4, opierają się na wcześniejszych badaniach nad właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi lipopeptydów [39,40].

Na podstawie przeprowadzonej analizy SAR stwierdzono, że lipofilowość lipopeptydów wykazuje najsilniejszą korelację z ich aktywnością. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa lipopeptydów z jednym łańcuchem kwasu tłuszczowego (wyrażona jako logMIC) koreluje liniowo z ich lipofilowością (wyrażoną jako logP lub logk). Natomiast w przypadku lipopeptydów z dwoma łańcuchami kwasu tłuszczowego zaobserwowano hiperboliczną zależność między logMIC i logP.

Modele bakteryjnych błon lipidowych zostały przygotowane w programie CHARMM-GUI Membrane Builder. Symulacje MD przeprowadzono przy użyciu pakietu Gromacs 5.0.4. Na podstawie rozkładu gęstości elektronowych wzdłuż normalnej do błony,

odpowiadających poszczególnym fragmentom cząsteczek lipopeptydów (Ryc. 4), stwierdzono, że każdy łańcuch kwasu tłuszczowego lipopeptydów znajduje się w hydrofobowym rdzeniu membrany, podczas gdy polarna część, zbudowana z cząsteczek lizyny, pozostaje na powierzchni membrany. Wyniki prezentowane w pracy (A4) wskazują także, że czwarta reszta lizyny w lipopeptydzie C_{10} -KKKK-NH₂ znajduje się głównie w środowisku wodnym, przez co jej interakcje z membraną są niewielkie. Może to wyjaśniać brak znaczącej różnicy w aktywności między lipopeptydami zawierającymi trzy i cztery reszty lizyny. Ponadto nie zaobserwowano wpływu lipopeptydów na organizację lipidów błonowych.



Rycina 4. Gęstość elektronowa błony i wybrane składniki 13laboratoryjny względem dwuwarstwowej normy. A: C_{10} -KKK-NH₂, B: $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂, C: C_{10} -KKKK-NH₂.

Jednym z sugerowanych mechanizmów działania AMP jest działanie podobne do detergentów (detergent-like model), które polega m.in. na wbudowaniu się miceli w błonę a w konsekwencji utworzeniu micelnego kanału [46]. Podczas symulacji w modelu gruboziarnistym nie zaobserwowano tendencji badanych lipopeptydów do agregowania i tworzenia micel. Przeciwnie, zaobserwowano, że związki mają tendencję do odpychania się

w błonie. Wyniki te sugerują, że badane lipopeptydy nie działają w sposób charakterystyczny dla detergentów, co dodatkowo potwierdza brak zależności pomiędzy wyznaczonymi eksperymentalnie wartościami CMC a aktywnością przeciwbakteryjną badanych związków [39].

PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE W BADANIACH KLINICZNYCH

Liczne badania potwierdzają wysoką aktywność AMP wobec szczepów opornych na konwencjonalne antybiotyki. Z tego powodu od lat prowadzone są badania mające na celu zaprojektowanie i otrzymanie związków peptydowych, które wykazując podobne działanie biologiczne, byłyby zdolne do pokonania ograniczeń, jakim podlegają związki macierzyste. Obecnie kilkadziesiąt peptydów przeciwdrobnoustrojowych jest na różnych etapach badań klinicznych. Większość z testowanych produktów leczniczych z AMP opracowano do stosowania miejscowego, a wybrane z nich opisano w pracy poglądowej **A6**.

Zaawansowany etap III fazy badań klinicznych osiągnął omiganan (MBI-226), analog indolicydyny. W trwającym badaniu oceniana jest skuteczność w terapii trądziku różowatego. Inne badania kliniczne II fazy dotyczą oceny skuteczności omigananu w terapii trądziku pospolitego, brodawek wenerycznych zewnętrznych, śród nabłonkowej neoplazji sromu, czy atopowego zapalenia skóry. Z kolei PAC-113, analog histatyny, wysoce aktywny wobec *Candida albicans*, był testowany jako preparat w postaci roztworu do płukania jamy ustnej w leczeniu kandydoz. Producent General Biologicals Corporation wprowadziła go na rynek w serii produktów przeciwbakteryjnych do pielęgnacji jamy ustnej pod nazwą handlową „oh-care”. Do III fazy badań wprowadzono pexiganan, analog magaininy, który był testowany w postaci kremu na zakażenia owrzodzeń stopy cukrzycowej. Badania jednak zakończyły się niepowodzeniem ze względu na niezadawalające rezultaty w porównaniu do standardowych metod leczenia.

Lista badań klinicznych, które zakończyły się wprowadzeniem produktu z AMP na rynek jest krótka. Jednak liczba trwających badań klinicznych z udziałem AMP (Dramp Database) w ostatnich latach gwałtownie wzrosła. Należy więc mieć nadzieję, że rynkowy sukces peptydów jako substancji przeciwdrobnoustrojowych jest kwestią czasu.

PODSUMOWANIE

Rozprzestrzenianie się antybiotykooporności jest rosnącym problemem w medycynie, weterynarii i stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Rozwiązanie problemu antybiotykooporności wymaga wielokierunkowych działań w wielu obszarach. Jednym z kierunków działań, niezwykle ważnym ze społecznego punktu widzenia, jest opracowywanie nowych i skutecznych terapii zakażeń. Innym jest poszukiwanie nowych wariantów konserwacji jako sposobu zapobiegania niepożądanemu namnażaniu drobnoustrojów. Innowacyjne terapie oraz nowe sposoby konserwacji wymagają nowych substancji aktywnych. Źródłem tych ostatnich mogą być przeciwbakteryjne związki peptydowe. Badania dotyczące potencjalnego wykorzystania tej grupy związków przedstawiłam w cyklu publikacji A1-A7.

Najważniejsze rezultaty i wnioski wynikające z przeprowadzonych badań wchodzących w skład osiągnięcia:

1. Otrzymane i badane lipopeptydy charakteryzuje znacznie wyższa aktywność wobec bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych niż wobec grzybów. Lipopeptydy z dwoma łańcuchami tłuszczowymi $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ i $(C_{12})_2$ -KKKK-NH₂ charakteryzuje niższa toksyczność wobec keratynocytów niż badane lipopeptydy z jednym łańcuchem kwasu tłuszczowego (publikacja A7).
2. Lipopeptydy $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ i $(C_{12})_2$ -KKKK-NH₂ wykazują wysoką aktywność wobec metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Wykazano, że związek $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ ma działanie bakteriobójcze wobec badanych szczepów MRSA (publikacja A4).
3. Zsyntetyzowane lipopeptydy $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ i $(C_{12})_2$ -KKKK-NH₂ zapobiegają uszkodzeniu keratynocytów oraz hamują ich prozapalną reakcję wywołaną zakażeniem *Staphylococcus aureus*, co czyni je obiecującymi kandydatami o dużym potencjale terapeutycznym w leczeniu zakażeń miejscowych (publikacja A1).
4. Lipopeptydy C_{16} -KKKK-NH₂ i C_{16} -KKKK-NH₂ nie pogarszają znacząco parametrów nasienia *Sus domesticus*, oraz wyraźnie zmniejszają liczbę gatunków bakterii szczególnie niekorzystnych dla skutecznej sztucznej inseminacji. Nasienie konserwowane lipopeptydami spełnia minimalne normy jakości produktu przeznaczonego do zabiegów sztucznej inseminacji, co sugeruje że mogłyby zastąpić konwencjonalne antybiotyki (publikacja A3).
5. Mechanizm działania badanych lipopeptydów wobec bakterii Gram dodatnich jest niespecyficzny a ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa silnie koreluje z lipofilowością. Stwierdzono, że lipopeptydy nie wykazują tendencji do tworzenia agregatów w błonie bakteryjnej, stąd ich mechanizm działania nie wykazuje cech charakterystycznych dla detergentów (publikacja A4 i A5).
6. Większość z testowanych produktów leczniczych z AMP, które osiągnęły etap badań klinicznych, opracowano do stosowania miejscowego (publikacja A6).

Literatura

- [1] Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, Cohen J, Findlay D, Gyssens I, Heuer OE, Kahlmeter G, Kruse H, Laxminarayan R, Liébana E, López-Cerero L, MacGowan A, Martins M, Rodríguez-Baño J, Rolain JM, Segovia C, Sigauque B, Tacconelli E, Wellington E, Vila J. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect.* 2015;16(6):22-9.
- [2] World Health Organization, Global action plan on antimicrobial resistance, 2015 Geneva, Switzerland.
- [3] Lohner K. Membrane-active Antimicrobial Peptides as Template Structures for Novel Antibiotic Agents. *Curr Top Med Chem.* 2017;17(5):508-519.
- [4] Nuti R, Goud NS, Saraswati AP, Alvala R, Alvala M. Antimicrobial Peptides: A Promising Therapeutic Strategy in Tackling Antimicrobial Resistance. *Curr Med Chem.* 2017;24(38):4303-4314.
- [5] Magana M, Pushpanathan M, Santos AL, Leanse L, Fernandez M, Ioannidis A, Giulianotti MA, Apidianakis Y, Bradfute S, Ferguson AL, Cherkasov A, Seleem MN, Pinilla C, de la Fuente-Nunez C, Lazaridis T, Dai T, Houghten RA, Hancock REW, Tegos GP. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(9):e216-e230.
- [6] Raheem N, Straus SK. Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. *Front Microbiol.* 2019;12(10):2866.
- [7] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238-250.
- [8] Brice DC, Diamond G. Antiviral Activities of Human Host Defense Peptides. *Curr Med Chem.* 2020;27(9):1420-1443.
- [9] Vilas Boas LCP, Campos ML, Berlanda RLA, de Carvalho Neves N, Franco OL. Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(18):3525-3542.
- [10] Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):491-511.
- [11] Sharma D, Bisht GS. Recent Updates on Antifungal Peptides. *Mini Rev Med Chem.* 2020;20(4):260-268.
- [12] Otvos L Jr. Immunomodulatory effects of anti-microbial peptides. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2016;63(3):257-277.
- [13] Hye Been Koo, Jiwon Seo Antimicrobial peptides under clinical investigation. *Peptide science.* 2019;111(5):1-15.
- [14] Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2000;55(1):4-30.
- [15] Giangaspero A, Sandri L, Tossi A. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *Eur J Biochem.* 2001;268(21):5589-5600.
- [16] Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol.* 2012;132(3 Pt 2):887-895.
- [17] Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 2000;8(9):402-410.
- [18] Seo MD, Won HS, Kim JH, Mishig-Ochir T, Lee BJ. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules.* 2012;17(10):12276-12286.
- [19] Pahar B, Madonna S, Das A, Albanesi C, Girolomoni G. Immunomodulatory Role of the Antimicrobial LL-37 Peptide in Autoimmune Diseases and Viral Infections. *Vaccines (Basel).* 2020;8(3):517.
- [20] Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(11):1294-1313.
- [21] McMillan KAM, Coombs MRP. Review: Examining the Natural Role of Amphibian Antimicrobial Peptide Magainin. *Molecules.* 2020;25(22):5436.

- [22] Kavanagh K, Dowd S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol*. 2004;56(3):285-9.
- [23] Rokitskaya TI, Kolodkin NI, Kotova EA, Antonenko YN. Indolicidin action on membrane permeability: carrier mechanism versus pore formation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1808(1):91-7.
- [24] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415(6870):389-95.
- [25] Jorge P, Lourenço A, Pereira MO. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches. *Biofouling*. 2012;28(10):1033-61.
- [26] Mwangi J, Hao X, Lai R, Zhang ZY. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zool Res*. 2019;40(6):488-505.
- [27] van der Does AM, Hiemstra PS, Mookherjee N. Antimicrobial Host Defence Peptides: Immunomodulatory Functions and Translational Prospects. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1117:149-171.
- [28] Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. 2006;24(12):1551-7.
- [29] Wang J, Song J, Yang Z, He S, Yang Y, Feng X, Dou X, Shan A. Antimicrobial Peptides with High Proteolytic Resistance for Combating Gram-Negative Bacteria. *J Med Chem*. 2019;62(5):2286-2304.
- [30] Starr CG, Wimley WC. Antimicrobial peptides are degraded by the cytosolic proteases of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017;1859(12):2319-2326.
- [31] 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):4.
- [32] Luong HX, Thanh TT, Tran TH. Antimicrobial peptides - Advances in development of therapeutic applications. *Life Sci*. 2020;260:118407.
- [33] Armas F, Pacor S, Ferrari E, Guida F, Pertinhez TA, Romani AA, Scocchi M, Benincasa M. Design, antimicrobial activity and mechanism of action of Arg-rich ultra-short cationic lipopeptides. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212447.
- [34] Hutchinson JA, Hamley IW, Torras J, Alemán C, Seitsonen J, Ruokolainen J. Self-Assembly of Lipopeptides Containing Short Peptide Fragments Derived from the Gastrointestinal Hormone PYY₃₋₃₆: From Micelles to Amyloid Fibrils. *J Phys Chem B*. 2019;123(3):614-621.
- [35] Lin D, Grossfield A. Thermodynamics of Micelle Formation and Membrane Fusion Modulate Antimicrobial Lipopeptide Activity. *Biophys J*. 2015;109(4):750-9.
- [36] Lee J, Kim S, Sim JY, Lee D, Kim HH, Hwang JS, Lee DG, Park ZY, Kim JI. A potent antibacterial activity of new short d-enantiomeric lipopeptide against multi drug resistant bacteria. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2019;1861(1):34-42.
- [37] Domalaon R, Findlay B, Ogunsina M, Arthur G, Schweizer F. Ultrashort cationic lipopeptides and lipopeptoids: Evaluation and mechanistic insights against epithelial cancer cells. *Peptides*. 2016;84:58-67.
- [38] Findlay B, Mookherjee N, Schweizer F. Ultrashort cationic lipopeptides and lipopeptoids selectively induce cytokine production in macrophages. *PLoS One*. 2013;8(2):e54280.
- [39] Greber KE, Dawgul M, Kamysz W, Sawicki W, Łukasiak J. Biological and surface-active properties of double-chain cationic amino acid-based surfactants. *Amino Acids*. 2014;46(8):1893-8.
- [40] Greber KE, Dawgul M, Kamysz W, Sawicki W. Cationic Net Charge and Counter Ion Type as Antimicrobial Activity Determinant Factors of Short Lipopeptides. *Front Microbiol*. 2017;8:123.
- [41] Liu C, Mao Z, Yang M, Kang H, Liu H, Pan L, Hu J, Luo J, Zhou F. Efficacy and safety of daptomycin for skin and soft tissue infections: a systematic review with trial sequential analysis. *Ther Clin Risk Manag*. 2016;12:1455-1466.
- [42] Ubeda JL, Ausejo R, Dahmani Y, Falceto MV, Usan A, Malo C, Perez-Martinez FC. Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. *Theriogenology*. 2013;80(6):565-70.

- [43] Silva CG, Cunha ER, Blume GR, Malaquias JV, Bão SN, Martins CF. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology*. 2015;70(2):90-4.
- [44] Pesch, S. and B. Hoffmann. "Cryopreservation of Spermatozoa in Veterinary Medicine." *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie - Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology* 2007;4:101-105.
- [45] Goularte KL, Voloski FLS, Redú JFM, Ferreira CER, Vieira AD, Duval EH, Mondadori RG, Lucia T Jr. Antibiotic resistance in microorganisms isolated in a bull semen stud. *Reprod Domest Anim*. 2020;55(3):318-324.
- [46] Gączarzewicz D, Udala J, Piasecka M, Blaszczyk B, Stankiewicz T. Bacterial Contamination of Boar Semen and its Relationship to Sperm Quality Preserved in Commercial Extender Containing Gentamicin Sulfate. *Pol J Vet Sci*. 2016;19(3):451-459.
- [47] Waberski D, Riesenbeck A, Schulze M, Weitze KF, Johnson L. Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology*. 2019;137:2-7.
- [46] Bechinger B, Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(9):1529-39.

5. Działalność naukowa

Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Działalność naukową rozpoczęłam z chwilą zatrudnienia na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego AMG. Pracę doktorską pod tytułem „*Synteza oraz badania właściwości fizykochemicznych i biologicznych surfaktantów opartych na lipopeptydach*” wykonywałam pod kierunkiem prof. Jerzego Łukasiaka. W ramach pracy nad doktoratem zajmowałam się poszukiwaniem związków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i powierzchniowo czynnych pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako substancji konserwujących i emulgujących. W latach 2010-2011 realizowałam jako wykonawca projekt promotorski „*Synteza i badania właściwości fizykochemicznych i biologicznych surfaktantów opartych na lipopeptydach*” (NN 305 4124 38, grant przyznany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego i przekazany do realizacji w Narodowym Centrum Nauki).

Wyniki moich badań prezentowałam na XX Polskim Sympozjum Peptydowym we Władysławowie (2009) oraz XXI Naukowym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego w Gdańsku (2010). Rozwijając swoje zainteresowania związane z przeciwdrobnoustrojowymi peptydami współpracowałam z Katedrą i Zakładem Chemii Nieorganicznej GUMed, Kliniką Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed, Pracownią Badań Strukturalnych i Biopolimerów Uniwersytetu Gdańskiego oraz Pracownią Chemii Medycznej Uniwersytetu Gdańskiego.

W 2007 i 2008 roku zostałam wyróżniona Nagrodą Naukową Zespołową I stopnia przyznaną przez Rektora AMG.

Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych we współpracy z Katedrą Chemii Nieorganicznej GUMed realizowałam projekt „*Syntetyczne lipopeptydy – badanie właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej*”, (OPUS, 2012/05/B/ST5/00281; 2013-2016), w charakterze wykonawcy. Efektem realizacji tego projektu była publikacja w *Frontiers in Microbiology*, której jestem pierwszym autorem.

W 2015 roku odbyłam miesięczny staż w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (28.01.2015 – 01.03.2015; Kilonia, Niemcy). Praca w zespole prowadzonym przez prof. Jensa M. Schroeder'a rozwinęła mój warsztat chromatograficzny w zakresie izolacji peptydów przeciwdrobnoustrojowych ze skóry ludzkiej.

W ramach prowadzonych badań w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej GUMed w dalszym ciągu współpracowałam z Katedrą Chemii Nieorganicznej GUMed, Pracownią Badań Strukturalnych i Biopolimerów Uniwersytetu Gdańskiego, Pracownią Chemii Medycznej Uniwersytetu Gdańskiego oraz Kliniką Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed. Rozpoczęłam też nowe współprace naukowe w zakresie badań strukturalno-aktywność z Katedrą i Zakładem Chemii Farmaceutycznej GUMed oraz Katedrą Chemii Fizycznej Politechniki Gdańskiej. Wynikiem tych współprac są m.in. publikacje A4, A5 i A7 będące częścią osiągnięcia habilitacyjnego.

W celu realizacji badań w zakresie aktywności związków peptydowych wobec szczepów antybiotykoopornych w warunkach *in vivo*, nawiązałam współpracę z Houston Methodist Research Institute w USA. Z kolei by realizować badania nad właściwościami lipopeptydów jako substancji konserwujących nasienie, nawiązałam współpracę z Instytutem Rozrodu Zwierząt Gospodarskich w Bernau bei Berlin w Niemczech. Badania nad właściwościami lipopeptydów w modelu *in vitro* zakażonej rany, prowadziłam we współpracy z Kliniką Dermatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Jenie w Niemczech. Wynikiem moich współprac międzynarodowych są publikacje A1, A2 i A3 będące częścią osiągnięcia habilitacyjnego. Dodatkowo współpraca z Kliniką Dermatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Jenie zaowocowała złożeniem wspólnego projektu badawczego OPUS-LAP w roku 2020.

Recenzowałam 18 manuskryptów publikacji współpracując z takimi czasopismami jak ACS Infectious Diseases, Amino Acids czy Journal of Surfactants and Detergents.

W 2015 roku zostałam wyróżniona Nagrodą Naukową Zespołową I stopnia przyznaną przez Rektora GUMed, a w latach 2018, 2019 i 2020 Nagrodą Naukową Zespołową II stopnia przyznaną przez Rektora GUMed.

Zestawienie sumaryczne dorobku naukowego:

Liczba prac pełnotekstowych przed uzyskaniem stopnia doktora: **9**.

Łączna wartość współczynnika oddziaływania **Impact Factor** (IF) prac przed uzyskaniem stopnia doktora: **10,371**.

Łączna liczba punktów **MNiSW** prac przed uzyskaniem stopnia doktora: **111**.

Liczba prac pełnotekstowych po uzyskaniu stopnia doktora (łącznie z pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia): **20**.

Łączna wartość współczynnika oddziaływania **Impact Factor** (IF) prac po uzyskaniu stopnia doktora (łącznie z pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia): **67,507**.

Łączna liczba punktów **MNiSW** prac po uzyskaniu stopnia doktora (łącznie z pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia): **1400**.

Punktacja IF publikacji oryginalnych, w których jestem pierwszym autorem: **22,416**.

Liczba cytowań publikacji (bez autocytowań) według bazy Web of Science: **250**.

Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **9**.

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

Na moją działalność dydaktyczną składają się:


1. Prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych z chemii fizycznej dla studentów 2 roku Farmacji (od 2005; GUMed).
2. Prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych z chemii fizycznej dla studentów 1 i 2 roku Master of Pharmacy (od 2019; GUMed).
3. Prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych z chemii fizycznej dla studentów 1 roku Analityki Medycznej (od 2005; GUMed).
4. Prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych z fakultetu „Fizykochemiczne metody analityczne” dla studentów 3 roku Biotechnologii (od 2005; GUMed).
5. Prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych i seminariów w ramach fakultetu „Blok zajęć chemicznych”; kierunek Przemysł Farmaceutyczny i Kosmetyczny (od 2017; GUMed).
6. Prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych w ramach fakultetu „Analityczna kontrola leków, żywności i środowiska” dla studentów 4 roku Farmacji (od 2008; GUMed).
7. Pełnienie funkcji opiekuna pracy magisterskiej (17 prac magisterskich; od 2005; GUMed).
8. Współautorstwo skryptu „Materiały do ćwiczeń z chemii fizycznej dla studentów Wydziału Farmaceutycznego AMG”, Gdańsk: Akademia Medyczna w Gdańsku, 2006.

Na moją działalność organizacyjną na rzecz GUMed składają się:

1. Członkostwo w Komitecie organizacyjnym XIII Ogólnopolskiego Sympozjum Krzemooorganicznego, Chmielno, 17-19 września 2007.
2. Członkostwo w Kolegium Elektorów Uczelni w kadencji 2008-2011.
3. Członkostwo w Komitecie organizacyjnym XXI Naukowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego „Farmacja polska na tle Unii Europejskiej”, Gdańsk, 12-15 września 2010.
4. Pełnienie funkcji opiekuna 2 roku kierunku Przemysł Farmaceutyczny i Kosmetyczny (od 2019).
5. Członkostwo w Komisji ds. przeciwdziałania mobbingowi w kadencji 2020-2024.
6. Pełnienie funkcji sekretarza I Komisji weryfikującej dokumenty kandydatów ubiegających się o przyjęcie na 1 rok studiów na Wydziale Farmaceutycznym w roku akademickim 2020/2021.

Na moja działalność popularyzującą naukę składają się:

1. Prezentacja pokazów popularnonaukowych promujących zdrowy styl życia w ramach II Festynu Promocji Zdrowia Medykalia (2005).
2. Udział w Sympozjum „Kariera Farmaceuty” – wykład o możliwościach rozwoju naukowego na Wydziale Farmaceutycznym AMG (2008).
3. Prezentacja pokazów popularnonaukowych promujących nauki medyczne i farmaceutyczne w ramach Medycznego Dnia Nauki (2013).
4. Udział w zajęciach z młodzieżą w ramach programu Samorządu Województwa Pomorskiego „Zdolni z Pomorza” (2017).
5. Udział w I edycji Nauki dla Zdrowia – Dnia Otwartego GUMed na Wydziale Farmaceutycznym (2018).
6. **Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**


.....
(podpis wnioskodawcy)