

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: Elżbieta Kamysz (do 16.08.2003 Łempicka)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

czerwiec 1995 r. – magister chemii, Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii
czerwiec 2000 r. – doktor nauk chemicznych, Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii,
rozprawa doktorska pt. „Wpływ wybranych modyfikacji cząsteczek hormonów
neuroprzysadkowych na ich czynność biologiczną” (promotor prof. Bernard Lammek)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

październik 1999 r.- czerwiec 2000 r. Wydział Chemii UG, Katedra Syntezy Organicznej,
asystent
lipiec 2000r. - obecnie Wydział Chemii UG, Katedra Chemii Organicznej, adiunkt

4. Osiągnięcia naukowe wynikające z art. 16, ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Synteza i badania peptydów występujących w jamie ustnej oraz peptydów przeciwdrobnoustrojowych, których jednym z potencjalnych miejsc podania i /lub działania może być jama ustna.

b) wykaz publikacji:

Łączny *Impact Factor* dla publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi **35,17**.

- H1. **Kamysz E.**, Jackiewicz-Barańska D., Łobocki L., Maćkiewicz Z.W., Kochańska B.: Determination of statherin stability in aqueous solution and whole human saliva over different pH ranges: a preliminary study., *Pol. J. Environ. Study* 2008, 17(6A-part II): 46-53. IF₂₀₀₈= 0,963
- H2. **Kamysz E***., Sikorska E.: Synthesis and conformational analysis of salivary proline-rich protein P-B., *J. Pept. Sci.* 2010, 16 (12): 709-715. IF₂₀₁₀=1,954
- H3. Popik P., **Kamysz E.**, Kreczko J., Wróbel M. : Human opiorphin: the lack of physiological dependence, tolerance to antinociceptive effects and abuse liability in laboratory mouse., *Behav. Brain Res.* 2010, 213(1): 88-93. IF₂₀₁₀= 3,393

- H4. Kotynia A., **Kamysz E.**, Czapor H., Brasuń J. : The synthesis of opiorphin and studies on its binding ability toward Cu(II)., *Tetrahedron Lett.* 2010, 51(18): 2486-2488. IF₂₀₁₀= 2.618
- H5. **Kamysz E.***, Mickiewicz B., Kamysz W., Bielińska S., Rodziewicz-Motowidło S., Ciarkowski J.: Synthesis, biological activity and solution structure of new analogues of the antimicrobial Gramicidin S. *J. Pept. Sci.* 2011, 17(3): 211-217. IF₂₀₁₁= 1,799
- H6. **Kamysz E.***, Sikorska E., Karafova A., Dawgul M.: Synthesis, biological activity and conformational analysis of head-to-tail cyclic analogues of LL37 and histatin 5. *J Pept. Sci.* 2012, 18(9): 560-566. IF₂₀₁₁= 1,799
- H7. **Kamysz E.**, Simonetti O., Cirioni O., Arzeni D., Ganzetti G., Campanati A., Giacometti A., Gabrielli E., Silvestri C., Kamysz W., Offidani A., Barchiesi F. : *In vitro* activity of the lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH₂, alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of *Candida* spp., *Peptides* 2011, 32(1): 99-103. IF₂₀₁₁= 2.434
- H8. Barchiesi F., Giacometti A., Cirioni O., Arzeni D., Silvestri C., Kamysz W., Abbruzzetti A., Riva A., **Kamysz E.**, Scalise G. In vitro activity of the synthetic lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH(2) alone and in combination with antifungal agents against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans.*, *Peptides* 2007, 28(8):1509-1513. IF₂₀₀₇= 2,368
- H9. Simonetti O., Arzeni D., Ganzetti G, Silvestri C., Cirioni O., Gabrielli E., Castelletti S., Kamysz W., **Kamysz E.**, Scalise G., Offidani A., Barchiesi F. : In vitro activity of the lipopeptide derivative (Pal-Lys-Lys-NH₂), alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of dermatophytes., *Br. J. Dermatol.* 2009, 161(2):249-252. IF₂₀₀₉= 4,260
- H10. Barchiesi F., Silvestri C., Arzeni D., Ganzetti G., Castelletti S., Simonetti O., Cirioni O., Kamysz W., **Kamysz E.**, Spreghini E., Abruzzetti A., Riva A., Offidani A.M., Giacometti A., Scalise G. : In vitro susceptibility of dermatophytes to conventional and alternative antifungal agents., *Med. Mycol.* 2009, 47(3): 321-326. IF₂₀₀₉= 2,133
- H11. Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Kamysz W., Silvestri C., Orlando F., Mocchegiani F., Vittoria AD., **Kamysz E.**, Saba V., Scalise G. : 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: 1299-1303. IF₂₀₀₇= 2,368
- H12. Dawgul M, Baranska-Rybak W, **Kamysz E**, Karafova A, Nowicki R, Kamysz W. : Activity of short lipopeptides and conventional antimicrobials against planktonic cells and biofilms formed by clinical strains of *Staphylococcus aureus.* *Future Med Chem.* 2012, 4(12): 1541-1551. IF₂₀₁₁= 2.522
- H13. Cirioni O., **Kamysz E.**, Ghiselli R., Kamysz W., Silvestri C., Orlando F., Rimini M., Brescini L., Gabrielli E., Marchionni E., Rocchi M., Provinciali M., Guerrieri M., Giacometti A. : Lipopeptide Laur-CKK-NH₂ dimer preserves daptomycin susceptibility and enhances its activity against *Enterococcus faecalis.* *J. Antimicrob. Chemother.* 2011, 66(4): 859-862. IF₂₀₁₁= 5,068

H14. Koszałka P., **Kamysz E.**, Wejda M., Kamysz W., Bigda J.: Antitumor activity of antimicrobial peptides against U937 histiocytic cell line., *Acta Biochim Pol.* 2011, 58(1): 111-117. IF₂₀₁₁= 1.491

* autor korespondencyjny

Oświadczenia współautorów prac wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 8. Oświadczenia habilitanta dotyczące wykonanych prac i procentowego w nich udziału znajdują się w załączniku 4.

c) Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Jama ustna odzwierciedla stan zdrowia całego organizmu. Jej prawidłowe funkcjonowanie zależy od składu i ilości wydzielanej śliny, stanu błony śluzowej i uzębienia. Niewielkie zmiany w obrębie jamy ustnej mogą mocno dać się we znaki choremu a ich niekorzystne następstwa mają wpływ na zdrowie całego organizmu. Najczęściej występujące zmiany w jamie ustnej to drożdżyca (kandydoza), stany zapalne, kserostomia, próchnica, afty, owrzodzenia, nieświeży oddech, opryszczka, leukoplakia. Coraz częściej zdarzają się nowotwory jamy ustnej. Jeżeli rak jamy ustnej nie zostanie wykryty wystarczająco wcześnie, może on wymagać zabiegu chirurgicznego, radioterapii i/lub chemioterapii. Może też prowadzić do śmierci. Zmiany, podrażnienia i uszkodzenia w obrębie jamy ustnej mogą sprawiać dolegliwości bólowe, powodować niekorzystny efekt kosmetyczny, utrudniać jedzenie, mówienie, jak również przysparzać problemów w kontaktach międzyludzkich. Powstanie jednego, nawet drobnego ogniska zapalnego, może wpływać na stan i funkcjonowanie innych organów. Infekcjom bakteryjnym jamy ustnej często towarzyszą zakażenia innych części organizmu. Przykładem może być zapalenie wsierdzia i osierdzia, które wciąż należą do chorób częstych i niebezpiecznych, a ich przyczyna tkwi nierzadko w siedlisku bakterii zlokalizowanym w jamie ustnej [1]. Przyczyną infekcyjnego zapalenia wsierdzia są bakterie: najczęściej alfa-hemolizujące streptokoki 50% przypadków (np. *Streptococcus viridans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. pneumoniae*), gronkowce 20% przypadków (np. *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*), enterokoki 15 % przypadków (np. *Enterococcus faecalis*, *E. coli*), grzyby i bakterie Gram-ujemne 10%

przypadków oraz *Neisseria gonorrhoeae* poniżej 5 % przypadków [2]. Aby zapobiec przedostaniu się bakterii do krwiobiegu z istniejącego w jamie ustnej ogniska zakażenia podaje się antybiotyki doustne. W przypadku zabiegów w obrębie jamy ustnej takich jak implantacja zęba, zabiegi w obrębie przyzębia, ekstrakcja zęba, leczenie kanałowe zęba również wykorzystywane są antybiotyki.

Jednym z często występujących schorzeń jamy ustnej jest drożdżyca, wywoływana zakażeniem grzybem drożdżopodobnym z rodzaju *Candida* [2-8]. Czynniki predysponującymi do rozwoju kandydozy są niedobory witamin, szczególnie z grupy B, zaburzenia odporności, ciężkie choroby ogólnoustrojowe (cukrzyca, białaczka, gruźlica, choroba nowotworowa) lub niedawno przeżyta chemio- lub radioterapia. Również stosowanie leków, takich jak antybiotyki, sterydy, doustne środki antykoncepcyjne, leki immunosupresyjne może sprzyjać zakażeniu grzybami. Do wystąpienia drożdżycy prowadzi również zła higiena jamy ustnej, zmniejszenie wydzielania śliny, długotrwałe stany zapalne błony śluzowej, noszenie protez zębowych i palenie tytoniu. Leczenie drożdżycy polega na stosowaniu preparatów przeciwgrzybiczych, początkowo miejscowych, a w razie nieskuteczności tego leczenia, konieczne może być zastosowanie terapii ogólnej. Leczenie w niepowikłanych przypadkach polega na zakraplaniu do jamy ustnej lub przecieraniu błony śluzowej po każdym posiłku stosowaną postacią leku o działaniu przeciwgrzybiczym. Przemycanie jamy ustnej roztworem przeciwbakteryjnym może pomóc w zmniejszeniu stanu zapalnego. W celu ograniczenia wtórnych zakażeń przepisywane są antybiotyki.

Narastanie oporności bakterii na konwencjonalne antybiotyki stanowi poważny problem współczesnej medycyny i skłania do poszukiwania nowych metod terapeutycznych wykorzystujących możliwości obronne ludzkiego ustroju. Obiecującym wydaje się być zastosowanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych w leczeniu tego typu przypadków [9-13]. Dużą zaletą antybiotyków peptydowych w przeciwieństwie do konwencjonalnych antybiotyków jest niewystępowanie oporności drobnoustrojów na te substancje. Uważa się, że leki oparte na peptydach przeciwdrobnoustrojowych mogą w przyszłości być wykorzystane na kilka możliwości: jako samodzielne substancje lub związki wchodzące w skład preparatów złożonych wykorzystując ich działanie synergistyczne z konwencjonalnymi lekami oraz jako peptydy o działaniu immunomodulującym lub środki neutralizujące endotoksynę.

W przedkładanym autoreferacie omówiono publikacje wchodzące w skład cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe. Szczegóły zawarte są w załączonych publikacjach, które oznaczono symbolem „H” [H1-H14]. Przedstawione prace można podzielić na 4 części. Część pierwsza dotyczy syntezy i badań poznawczych wybranych peptydowych składników śliny: stateryny [H1], polipeptydu P-B [H2] i opiorfiny [H3,H4]. Część druga obejmuje prace dotyczące syntezy i badania zależności struktura aktywność analogów peptydów przeciwdrobnoustrojowych (gramicydyny S, histatyny 5 i LL37) [H5-H6]. W części III zajmowano się badaniami porównującymi aktywność przeciwdrobnoustrojową lipopeptydów z aktywnością leków tradycyjnych [H7- H13]. W IV części przeprowadzono syntezę peptydów przeciwdrobnoustrojowych różniących się miejscem występowania, budową, mechanizmem działania i zbadano ich aktywność przeciwnowotworową [H14]. Każda część poprzedzona została krótkim wprowadzeniem literaturowym charakteryzującym obiekty badań.

I. Synteza i badania wybranych peptydowych składników śliny

Jama ustna przy zdrowym uzębieniu, zdrowej błonie śluzowej i odpowiedniej ilości śliny jest w stanie „bronić się” przed większością infekcji. Całkowita objętość śliny produkowanej w ciągu doby u osoby dorosłej waha się od 500 ml do 1500 ml [14]. Ślina jest wydzieliną gruczołów ślinowych, stanowiącą płynne środowisko jamy ustnej w skład którego wchodzi poza wodą (ok. 98%) szereg związków nieorganicznych i organicznych. Najważniejsze organiczne składniki śliny to białka i peptydy oraz niebiałkowe substancje azotowe (mocznik, kreatynina, kwas moczowy, aminokwasy), węglowodany, lipidy. Do składników śliny o charakterze peptydowym bądź białkowym należą: histatyny, stateryny, lizozym, cystatyny, białka bogate w prolinę (PRPs), anhydraza węglanowa, amylaza, peroksydaza, sIgA, mucyny, laktoferyna, LL-37, defensyny, opiorfina. W ramach niniejszej rozprawy habilitacyjnej prowadzone były badania wybranych peptydów ślinowych: stateryny, polipeptydu P-B i opiorfiny.

Stateryna

Stateryna (ang. *statherin*), jest polipeptdem wytwarzanym przez gruczoły ślinowe i wydzielanym wraz ze śliną do jamy ustnej. Nazwa tego polipeptydu, pochodzi od greckiego słowa

statheropio co oznacza stabilizować i jest związana z najważniejszą spośród wielu funkcji, jakie pełni ono w jamie ustnej - jednocześnie silnie hamuje pierwotną (spontaniczną) i wtórną precypitację soli wapniowo-fosforanowych [15]. Bierze udział w transporcie jonów wapniowych i fosforanowych podczas ich wydzielania się w gruczołach ślinowych, utrzymuje stan przesycony śliny w odniesieniu do fosforanów wapnia. Poza tym, stateryna wykazuje powinowactwo do hydroksyapatytu, wchodzi w interakcje z niektórymi bakteriami i grzybami, jest jednym ze składników nabytej błonki zębowej [16]. Może także funkcjonować jako „smar graniczny” (ang. *boundary lubricant*) na powierzchni szkliwa. Jest to istotna funkcja, która chroni przed wolnym ślizganiem i wysokim obciążeniem zgryzu, które pojawiają się podczas żucia i zgrzytania. Natywna stateryna jest białkiem sekrecyjnym powstającym drogą biosyntezy, a nie poprzez proteolizę jakiegoś większego białkowego prekursora. Gen dla stateryny jest zlokalizowany u człowieka w chromosomie 4q11-13 [17]. Stateryny, jest 43-aminokwasowy polipeptyd o masie cząsteczkowej 5380 Da i następującej strukturze pierwszorzędowej (rys. 1) [15]:

Stateryna DS(P)S(P)EEKFLRRIGRFGYGYGPYQPVPPEQPLYPQPYQPQYQQYTF

Rys.1. Sekwencja aminokwasowa stateryny. (P) – oznacza resztę fosforanową (-OH₂PO₃).

W niniejszej części pracy przeprowadzono badania trwałości stateryny natywnej i syntetycznej w ślinie ludzkiej mieszanej spoczynkowej w temperaturze pokojowej. Poddano badaniom również trwałość stateryny syntetycznej w roztworach wodnych i stateryny natywnej w ślinie ludzkiej mieszanej spoczynkowej o różnych wartościach pH [H1]. We wszystkich przypadkach materiał do badań laboratoryjnych stanowiła ślina ludzka mieszana spoczynkowa. Pobieranie śliny spoczynkowej dokonywano w dniu rozpoczęcia badań pomiędzy godziną 9.00 a 10.00. Ochotnicy 2 godziny przed zbieraniem śliny nie jedli, nie żuli gumy, nie palili papierosów ani nie płukali jamy ustnej. Ślinę spoczynkową zbierano przez okres 5 minut do polipropylenowych probówek typu Corning umieszczonych w lodzie. Syntetyczną staterynę otrzymano metodą syntezy w fazie stałej z wykorzystaniem chemii Fmoc. Stężenie syntetycznej stateryny w ślinie wynosiło 35 µg/ml. Próbkę analizowano metodą spektrometrii masowej MALDI-TOF w następujących odstępach czasu: bezpośrednio po przygotowaniu próbek, po 1 godz., po 2 godz., po 4 godz. i po 24 godz. Wybrane próbki śliny były również równolegle analizowane metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Bezpośrednio przed

analizą HPLC próbki śliny były rozcieńczane roztworem kwasu octowego i filtrowane przez filtry Titan Syringe Filter PTFE (0,45 μm wielkość porów, 17 mm średnica). Niezwłocznie po przygotowaniu próbek natywna stateryna została stwierdzona we wszystkich przypadkach w ślinie. W większości badanych próbek natywna stateryna w świeżej niemodyfikowanej ślinie ulegała rozkładowi w przeciągu 2-4 godzin. W przypadku stateryny syntetycznej po 4 godzinach w 3 z 5 badanych próbek wykryto obecność stateryny. Po 24 godz. przechowywania widma masowe potwierdziły rozkład zarówno stateryny natywnej jak i syntetycznej we wszystkich badanych próbkach. W kolejnej części pracy sprawdzono wpływ wartości pH i rodzaju użytego kwasu na trwałość stateryny syntetycznej w roztworach wodnych oraz stateryny natywnej w ślinie ludzkiej mieszanej spoczynkowej w temperaturze pokojowej. Wszystkie próbki przechowywano w temperaturze pokojowej w zamkniętych, polipropenowych probówkach, a następnie poddawano analizie MALDI-TOF MS na obecność stateryny w następujących odstępach czasu: niezwłocznie po przygotowaniu próbek, po 24 godz., po 1 tygodniu, po 2 tygodniach, po 1 miesiącu, po 2 miesiącach i po 3 miesiącach. Za pomocą odpowiednich reagentów doprowadzono pH próbek do następujących wartości: 10 (wodorotlenkiem sodu), 8 (10mM Tris-HCl), 4 i 2 (kwasem octowym, kwasem mlekowym, kwasem cytrynowym, kwasem trifluorooctowym). Przeprowadzone badania pokazały, iż w roztworach wodnych stabilność stateryny syntetycznej ściśle zależała od wartości pH. W próbkach, które zostały zakwaszone, stateryna syntetyczna odznaczała się zdecydowanie większą stabilnością niż w próbkach alkalizowanych do pH 8 i 10. Po jednym miesiącu stateryna uległa całkowitemu rozkładowi w roztworach wodnych o odczynie zasadowym, podczas gdy w roztworach o odczynie kwasowym była obecna nawet po trzech miesiącach przechowywania w RT.

W kolejnym etapie pracy zbadano trwałość stateryny natywnej w ślinie ludzkiej mieszanej spoczynkowej o różnych wartościach pH. W tym celu, zebraną, spoczynkową i nieodwirowaną ślinę podzielono na 11 równych części oznaczając próbki od A do K. Próbka A stanowiła próbkę kontrolną. próbki od H do K zostały zakwaszone do pH 2 poprzez dodanie kwasu cytrynowego (próbka I), kwasu mlekowego (próbka H), TFA (próbka K) i kwasu octowego (próbka J). próbki od D do G zostały zakwaszone do pH 4 kwasem cytrynowym (próbka E), kwasem mlekowym (próbka D), TFA (próbka G) oraz kwasem octowym (próbka F). Próbka B została doprowadzona przy użyciu 1M NaOH do pH 10 zaś próbka C poprzez dodanie 10 mM Tris- HCl (pH 8,1) do pH

8. Wszystkie próbki przechowywane były w zamkniętych, polipropylenowych probówkach w temperaturze pokojowej, a następnie analizowane na obecność stateryny za pomocą MALDI-TOF MS w następujących odstępach czasu: niezwłocznie po sporządzeniu, po 24 godz., po 1 tygodniu, po 1 miesiącu, po 2 miesiącach i po 3 miesiącach. W próbkach śliny o pH od 4 do 10 (próbki od A do G) natywna stateryna uległa rozkładowi w ciągu 24 godz. W próbkach o pH 2 (próbki od H do K) stateryna była obecna nawet po 3 miesiącach przechowywania w temperaturze pokojowej.

Podsumowując można powiedzieć, iż syntetyczna stateryna jest bardziej stabilna w roztworach kwaśnych niż zasadowych. Natomiast trwałość stateryny w ślinie mieszanej spoczynkowej zależy od wartości pH. Wykwaszenie śliny, do pH 2 pozwala na zahamowanie rozkładu stateryny podczas jej przechowywania w temperaturze pokojowej. Wyniki badania różnych składników śliny nabierają coraz większego znaczenia w diagnostyce. Przeprowadzone badania są wstępem do opracowania sposobu standaryzacji procedury pobierania i przechowywania śliny ludzkiej mieszanej w celu ilościowego oznaczania stateryny w ślinie. Ponadto, otrzymane wyniki mogą być wykorzystane w przyszłości przy pracach nad opracowaniem preparatu sztucznej śliny czy leczniczej gumy do żucia, których jednym ze składników może być stateryna.

Polipeptyd P-B

Białka bogate w prolinę (ang. *proline-rich proteins*, PRPs) stanowią większą część białkowych składników śliny. Ponad 20 PRPs jest obecnych w ślinie ludzkiej i dzieli się je na kwaśne (aPRPs), zasadowe (bPRPs) i glikozylowane (GPRPs) [18-19]. W ślinie wydzielanej przez śliniankę przyuszną stanowią aż 70 % zawartości białek [20]. Charakterystyczną cechą PRPs jest występowanie reszt proliny, glicyny i glutaminy, które stanowią od 70% do 88% ich składu aminokwasowego. aPRPs wiążą jony wapnia, inhibują narastanie kryształów fosforanu wapniowego w roztworach nim przesyconych [21]. Ponadto, aPRPs wiążą się do hydroksyapatytu (HAP). Adsorpcja PRPs na hydroksyapatycie indukuje zmiany konformacyjne tych białek, które pozwalają następnie na wiązanie licznych bakterii bytujących w jamie ustnej. Postulowana jest obecność tych białek w nabytej błonie zębowej. Z kolei, główną funkcją zasadowych PRPs jest ochrona przed działaniem tanin zawartych w żywności. Wykazują one również aktywność przeciwwirusową [22] oraz wiążą *C. albicans*, zaliczanego do rzędu drożdżaków [23]. Glikozylowane PRPs mają zdolność lubrykacji jamy ustnej [24], wiążą mikroorganizmy [25],

które mogą ułatwiać przyleganie bakterii do powierzchni jamy ustnej lub oczyszczanie jamy ustnej z bakterii w zależności od tego czy PRPs są obecne w błonie czy w ślinie [26]. GPRPs nie są zdolne do strącania tanin [27].

PRPs z wyjątkiem P-A i P-B [28] kodowane są przez rodzinę sześciu genów. Dwa z nich, PRP1 i PRP2 (PRH1 i PRH2) kodują kwaśne PRPs. Pozostałe geny PRB1-4 kodują zasadowe i glikozyłowane PRPs. P-B jest kodowany przez gen PROL3 umiejscowiony na chromosomie 4q13.3 [29] bardzo blisko genu kodującego staterynę (STATH). Polipeptyd P-B zaliczany jest do bPRPs, które charakteryzują się dużą zawartością reszt proliny (powyżej 20%) oraz powtarzających się sekwencji (PPGKPGQPP) [30-31]. Ponadto, charakterystyczną cechą P-B i P-A, wyróżniającą oba peptydy spośród pozostałych PRPs jest powtarzająca się sekwencja GPGXX'PPPP (X oraz X' dowolne reszty aminokwasowe). Polipeptyd P-A powstaje w wyniku cięcia enzymatycznego P-B. Struktura pierwszorzędowa P-B przedstawiona jest na rys 2. Stężenie polipeptydu P-B w niestymulowanej ślinie ludzkiej odpowiada około połowie stężenia stateryny. W ślinie ludzkiej oprócz polipeptydu P-B wykryto również jego fragmenty odpowiadające resztom 6-57 [32]. W wołowym szkliwie stwierdzono obecność PRP o masie 31000 Da, które w *N*-końcowej części zawiera 57-aminokwasowy fragment identyczny z sekwencją P-B.

P-B pQRGPRGPYPPGGLAPPQPF~~GF~~VPPPPPPYGPGRIPPPPPAPYGP~~GF~~IFPPPPQP

Rys. 2. Sekwencja aminokwasowa polipeptydu P-B.

Główną funkcją ślinowych bPRPs jest wiązanie i strącanie żywieniowych tanin. Zapobiegają w ten sposób wchłanianiu tej potencjalnej toksyny z przewodu pokarmowego. Rozciągnięta struktura peptydów sprzyja pełnieniu tej funkcji. Giętkość peptydów ułatwia ich wiązanie z taninami. Długość i giętkość peptydów wraz z ich wysokim stopniem podobieństwa sekwencji aminokwasowej pozwalają im oddziaływać wydajnie z cząsteczkami wielu różnych tanin prowadząc do ich strącenia.

Białka bogate w prolinę mogą przybierać konformację typu poliproliny II (PPII). PPII jest lewoskrętną helisą z wiązaniami peptydowymi X-Pro o geometrii *trans*. Na jeden skręt helisy przypadają trzy reszty aminokwasowe. Kąty dwusienne ϕ i ψ przyjmują odpowiednio wartości -75° i +145°, co powoduje iż struktura PPII jest strukturą rozciągniętą o silnie solwatowanym łańcuchu głównym. Wyniki badań konformacyjnych PRPs sugerują występowanie struktury poli-

L-proliny typu II. Niemniej jednak istnieją pewne rozbieżności w interpretacji konformacji tego typu peptydów w roztworze [33-35].

W ramach realizowanych badań po raz pierwszy zsyntezowano polipeptyd P-B występujący w ślinie ludzkiej. Polipeptyd otrzymano metodą syntezy w fazie stałej z zastosowaniem chemii Fmoc [H2]. Badania konformacyjne polipeptydu PB przeprowadzono z wykorzystaniem metod CD, spektroskopii FTIR i modelowania molekularnego [H2].

Analiza widm CD polipeptydu PB wykazała, iż drugorzędowa struktura peptydu jest niezależna od temperatury w zakresie 0-60°C przy pH = 7 oraz w zakresie pH 2-12 w temperaturze 37°C. Polipeptyd PB przyjmuje głównie strukturę nieuporządkowaną z miejscowo występującymi β -zgięciami. Biorąc pod uwagę wyniki badań CD i spektroskopii FTIR stwierdzono, że udział helisy poliproliny typu II (PPII) jest niewielki i stanowi około 10%. Podobny wynik otrzymano przeprowadzając badania metodą dynamiki molekularnej (MD). Symulacje ujawniły występowanie jedynie krótkich helis typu PPII w C-końcowym fragmencie peptydu (Pro51-Pro54), co stanowi zaledwie 7% całej struktury drugorzędowej peptydu [H2].

Wyniki przeprowadzonych badań będą pomocne przy ustalaniu roli otrzymanego polipeptydu, jaką pełni w jamie ustnej, gdyż jego funkcje nie zostały jeszcze dobrze poznane.

Opiorfina

Opiorfina (QRFSR) jest pentapeptydem występującym u ludzi. Po raz pierwszy została wykryta w ludzkiej ślinie [36]. Powstaje w wyniku cięcia enzymatycznego białka PROL1 kodowanego przez gen VCSB. Opiorfina jest inhibitorem zarówno ludzkiej neutralnej ekto-endopeptydazy (hNEP; CE 3.4.24.11), jak i ludzkiej ekto-aminopeptydazy (hAP-N; EC 3.4.11.2), enzymów katalizujących rozkład enkefalin. Peptyd ten wykazuje silną aktywność przeciwbólową w zwierzęcych modelach bólu, wywołanego bodźcami chemicznymi i mechanicznymi. Działa aktywując endogenną opioidozależną ścieżkę przekazywania sygnałów bólu [36-37]. Działanie przeciwbólowe opiorfiny jest równie silne, jak w przypadku morfiny, ale towarzyszy mu mniej efektów ubocznych [38]. Ponadto opiorfina może powodować skurcze okrężnicy oraz wpływać na erekcję u szczurów [39]. Średnia zawartość opiorfiny w ślinie oznaczona testem ELISA wynosi 61 ± 23 ng/ml dla kobiet i 59 ± 17 ng/ml dla mężczyzn [40]. Niedawno opracowana została metoda oznaczania opiorfiny w ślinie z wykorzystaniem techniki LC –MS/MS [41]. Średnia

zawartość opiorfiny w ślinie oznaczona tą metodą była ok. sześciokrotnie niższa niż z wykorzystaniem testu ELISA. Przez śliniankę podżuchwową szczura oraz prostatę dorosłych szczurów wydzielany jest pentapeptyd o podobnym działaniu- sialorfina (QHNPR). Związek ten, podobnie jak opiorfina wykazuje działanie przeciwbólowe, pobudza zachowania seksualne samców szczurów [42], oraz nasila erekcję u starzejących się szczurów [43]. Sialorfina jest inhibitorem neutralnej ekto-endopeptydazy (neprylizyna; NEP, EC 3.4.24.11) [44]. Ekto-endopeptydaza NEP jest wysoce konserwatywna między gatunkami. Szczurzy i ludzki enzym charakteryzuje się znacznym podobieństwem sekwencji 93%. Prekursor PROL1, z którego jest wytwarzana opiorfina oraz RATSMR1, z którego jest wytwarzana sialorfina są kodowane przez tę samą rodzinę genów [45-46]. Gen VCSA1, kodujący prekursor sialorfiny należy do rodziny, której członków zidentyfikowano u szczurów, ludzi i myszy. Funkcja ludzkiej opiorfiny może być więc ściśle związana ze szczurzą sialorfiną.

Wiele osób cierpiących na choroby nowotworowe wymaga podawania silnych leków przeciwbólowych. Za standard w leczeniu bólu w chorobach nowotworowych przyjęło się uważać podawanie morfiny. Przy dłuższym jej stosowaniu wyzwała się jednak tolerancja, która zmusza do stosowania u pacjenta coraz większych dawek. Kolejnym niebezpieczeństwem jest fakt, że morfina uzależnia. Dlatego naukowcy na świecie poszukują nowych leków i metod terapeutycznych leczenia bólu. W publikacji **H3** wchodzącej w skład cyklu opisano badania, w których wykazano, że opiorfina w dawce 0.3 mg/kg wykazuje działanie antynocyceptywne u myszy w teście rzucania ogona i że nie rozwija się tolerancja na ten związek. Dziesięciokrotne zwiększenie dawek opiorfiny nie powodowało rozwoju uzależnienia. Ponadto w teście wymuszonego pływania zaobserwowano, że opiorfina wykazuje działanie przeciwdepresyjne w dawce 3mg/kg. Uzyskane wyniki wskazują stosunkowo słabe ale jednocześnie korzystne działania podania dootrzewnowego (*ip*) opiorfiny w ostrym bólu, które nie były powiązane z efektami ubocznymi towarzyszącymi podaniu opioidów takimi jak rozwój tolerancji czy uzależnienia. Dodatkowo opiorfina wykazywała działanie przeciwdepresyjne. Stosunkowo słabe działanie przeciwbólowe peptydu może być związane z dootrzewnową drogą podania (*ip*), która może ograniczać dotarcie odpowiednich ilości opiorfiny do struktur kluczowych w przekazywaniu bodźców bólowych. Może wynikać również ze słabej stabilności metabolicznej i/lub dostępności biologicznej opiorfiny po podaniu *ip*, ponieważ peptyd wykazuje właściwości hydrofilowe. Wyniki przeprowadzonych badań mają znaczący wkład w wyjaśnianie roli jaką odgrywa opiorfina

w organizmie. Badany peptyd nie powoduje typowych dla opioidów efektów ubocznych takich jak depresja czy uzależnienie, może być więc obiecującym kandydatem do leczenia depresji u pacjentów, którzy nie mogą stosować obecnie dostępnych środków przeciwdepresyjnych. Wprowadzenie modyfikacji chemicznych zwiększających biodostępność opiorfiny może doprowadzić do otrzymania nowego związku przeciwbólowego.

W ślinie stwierdzono obecność wielu jonów metali. np. Ag, Au, Cr, Cu, Fe, Ni, and Zn [47]. Na ich poziom w ślinie wpływają różne czynniki: uzupełnienia protetyczne, aparaty ortodontyczne, dieta (rodzaj pożywienia, napoje w tym ujęcie wody pitnej), biżuteria, leki, używki, miejsce pracy oraz wiele innych. Jony metali mogą wiązać się z peptydami lub białkami, wpływając w ten sposób na pełnione przez nie funkcje [48-49]. W publikacji **H4** podjęto się sprawdzenia możliwości wiązania się opiorfiny z jonami Cu (II). W badaniach stosowano metody potencjometryczne i spektroskopowe (UV-Vis, EPR, CD). Opiorfinę otrzymano metodą syntezy w fazie stałej z zastosowaniem chemii Fmoc.

Badany peptyd tworzy pięć monomerycznych kompleksów: CuL, CuH₁L, CuH₂L, CuH₃L, CuH₄L. Jako pierwszy powstaje kompleks CuL poprzez utworzenie wiązania między jodem Cu(II) i atomem azotu N-końcowej grupy aminowej. Jednak charakterystyka spektroskopowa otrzymanego kompleksu nie była możliwa z powodu zbyt niskiego stężenia w badanej próbce (poniżej 10%). Następnie tworzy się kompleks CuH₁L poprzez utworzenie wiązań między jodem metalu i atomem azotu z grupy aminowej oraz między jodem metalu i atomem azotu z pierwszego wiązania peptydowego. Taką koordynację sugerują pasma charge transfer przy 312 i 270 nm. Przy wartościach pH powyżej 6,5 kolejne dwa protony dysocjują z kompleksów CuH₁L i CuH₂L i powstaje w roztworze CuH₃L. Kompleks CuH₂L osiąga najwyższe stężenia około 40% w pH 7. Przy tej wartości pH występują w roztworze również kompleksy CuH₁L i CuH₃L o stężeniu około 30% każdy, co utrudnia przeprowadzenie badań spektroskopowych dla kompleksu CuH₂L. Przy wartościach pH powyżej 7.5 dominuje w roztworze kompleks CuH₃L.

Przesunięcie maksimum absorpcji z 668 nm do 517 nm potwierdza wiązania jonu metalu przez kolejne dwa atomy azotowe tworząc 4N (cztero-azotową) formę kompleksową. Obecność pasm CT (charge transfer) na widmie CD przy długości fali: 310, 276 i 250 nm wskazuje na wiązanie grupy aminowej -NH₂ oraz na atom azotu z wiązania peptydowego. Na podstawie potencjometrycznych i spektroskopowych wyników można było założyć, że kompleks CuH₃L określa model wiązania typu: {NH₂, N⁻, N⁻, N⁻}. Ostatecznie w roztworze powyżej pH 9.5

powstaje kompleks CuH_4L ($\log\beta_{\text{CuH-3L}} - \log\beta_{\text{CuH-4L}} = 10.67$), nie zaobserwowano żadnej zmiany parametrów spektroskopowych dla tego kompleksu co świadczy o dysocjacji protonu z grupy bocznej Arg. Opiorfina tworzy te same typy kompleksów co pentapeptyd GGGGG jednak jest ona bardziej skuteczna w wiązaniu jonów miedzi (II). W porównaniu do GGGGG opiorfina tworzy bardziej stabilne kompleksy typu CuH_1L , co jest prawdopodobnie spowodowane obecnością bocznych łańcuchów trzech reszt aminokwasowych Gln-1, Arg-2 i Phe-3. Jak opisano powyżej w kompleksie CuH_1L tworzą się wiązania jonu Cu(II) z dwoma atomami azotu (z Gln-1 i Arg-2). Powstawanie tych wiązań może prowadzić do zmian sterycznych, które będą mogły powodować dodatkowo oddziaływania między łańcuchami bocznymi Gln-1, Arg-2 i Phe-3. Oddziaływania te przypuszczalnie mogłyby utrudniać wiązanie się drugiego azotu amidowego i tworzenie kompleksu CuH_2L . Może mieć to także wpływ na zmniejszenie stabilności dysocjacji protonu z jednej reszty Arg.

Dane otrzymane dla opiorfiny w pracy **H4** zachęcają do sprawdzenia jak z jonami Cu(II) będzie wiązała się sialorfina jak również ich analogi posiadające w pozycji 1 resztę piroglutaminy (Glp). Cechą charakterystyczną obu peptydów jest reszta glutaminy na N-końcu. Dane dostępne w literaturze wskazują, że w warunkach fizjologicznych N-końcowa reszta glutaminy może ulegać przekształcaniu do struktury cyklicznej zwanej piroglutaminą (Glp) [50]. Przedstawione w pracy **H4** badania dostarczyły informacji w jaki sposób jony miedzi (II) wiążą się z opiorfiną. Mogą być pomocne przy badaniu wpływu jonów metali na właściwości biologiczne opiorfiny.

II. Synteza i badania struktura aktywność analogów peptydów przeciwdrobnoustrojowych gramicydyny S [H5], histatyny 5 [H6] i LL37 [H6]

Przedmiotem publikacji **H5** była synteza i badania struktura aktywność analogów Gramicydyny S (GS). GS jest cyklicznym dekapeptydem o sekwencji cyklo-(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro)₂, wyizolowanym z bakterii *Bacillus brevis*. Badania konformacyjne wykazały, iż GS składa się z dwóch antyrównoległych β -kartek połączonych β -zgięciami typu II', których centralną część stanowią reszty D-Phe-Pro. Struktura GS wykazuje charakter amfipatyczny. Część hydrofobowa utworzona jest przez reszty Val i Leu, z kolei część hydrofilowa przez reszty Orn. Pomimo swojego szerokiego spektrum działania zarówno na bakterie Gram-dodatnie jak i

Gram-ujemne, a nawet niektóre grzyby, GS nie jest stosowana w terapii ze względu na wysoką toksyczność u ludzi. Z danych literaturowych wiadomo, że analogi GS zawierające reszty D-His i Lys zamiast reszt D-Phe i Orn charakteryzowały się dobrą aktywnością biologiczną i wykazywały zmniejszoną toksyczność [51-52]. Zamiana miejscami reszty Lys z resztami sąsiadującymi Leu lub Val oraz zmiana konfiguracji reszty Lys w 14 aminokwasowym analogu GS prowadziła do zaburzenia momentu amfipatycznego. Otrzymany peptyd charakteryzował się zwiększoną selektywnością i obniżoną toksycznością [53]. Podobne modyfikacje wprowadzono do analogu GS cyklo-(Val-Lys-Leu-D-His-Pro)₂ **I**, otrzymując trzy analogi: cyklo-(Val-Leu-Lys-D-His-Pro-Val-Lys-Leu-D-His-Pro) **II**, w którym resztę Lys w pozycji 2 zamieniono z resztą Leu w pozycji 3; cyklo-(Lys-Val-Leu-D-His-Pro-Val-Lys-Leu-D-His-Pro) **III**, w którym resztę Lys w pozycji 2 zamieniono z resztą Val w pozycji 1; cyklo-(Val-D-Lys-Leu-D-His-Pro-Val-Lys-Leu-D-His-Pro) **IV**, w którym zmieniono konfigurację reszty Lys w pozycji 2 na D. Badania konformacyjne analogu **I** wykazały, iż podobnie jak GS przyjmuje on konformację antyrównoległej β-kartki, w której obie nici połączone są β-zgięciami typu II' z resztami D-His-Pro w ich centralnej części. Struktura β-kartki stabilizowana jest wiązaniami wodorowymi NH(Lys3)–O(Val6), NH(Leu8)–O(Val1) oraz NH(Val1)–O(Leu8). Podobnie, peptyd **II** charakteryzuje się występowaniem struktury β-kartki. Niemniej jednak struktura ta jest krótsza niż w przypadku analogu **I** i stabilizowana jest tylko przez dwa wiązania wodorowe: (Lys3)–O(Val6) oraz NH(Leu8)–O(Val1). Z kolei analogi **III** i **IV** nie tworzą struktury β-kartki.

Pomimo różnic w konformacjach badanych analogów, struktury wszystkich peptydów charakteryzują się amfipatycznością. Oznacza to, że można wyróżnić w ich strukturach dobrze zdefiniowaną część polarną i niepolarną. Polarną część tworzą reszty Lys i D-His, a pozostałe reszty aminokwasowe tworzą stronę hydrofobową peptydów. W przypadku analogu **I** łańcuchy boczne reszt Lys i D-His umiejscowione są po tej samej stronie pierścienia tworząc duży polarny region. W pozostałych analogach łańcuchy boczne reszt Lys i D-His są umieszczone po przeciwnych stronach pierścienia, prowadzi to do niesymetrycznego rozmieszczenia ładunku elektrostatycznego względem powierzchni pierścienia. Obecność kationowych łańcuchów bocznych reszt Lys w niepolarniej części peptydów zmniejsza moment hydrofobowy cząsteczek i prawdopodobnie wpływa na aktywność analogów GS. Otrzymane związki nie wykazywały aktywności hemolitycznej. Jedynie w przypadku analogu **II**, w którym resztę Lys w pozycji 2 zamieniono z resztą Leu w pozycji 3 obserwowano lizę komórek przy stężeniu 1000 µg/ml.

Badane związki nie wykazywały aktywności zarówno wobec bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich jak i grzybów. Badania mikrobiologiczne prowadzono wobec szczepów referencyjnych bakterii Gram-dodatnich: *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Rhodococcus equi* ATCC 6939, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990; bakterii Gram-ujemnych: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus vulgaris* ATCC6038 oraz grzybów *Candida albicans* ATCC10231. Wprowadzone modyfikacje do analogów mające na celu zaburzenie momentu amfipatycznego spowodowały destabilizację struktury drugorzędowej prowadząc do zaniku aktywności mikrobiologicznej. Obecność β struktury z odpowiednim rozmieszczeniem potencjałów hydrofobowych i hydrofilowych względem jej powierzchni jest kluczowa dla zachowania aktywności biologicznej i niskiej aktywności hemolitycznej analogów GS. Badania większej grupy peptydów zawierających tego typu modyfikacje pozwoliłyby lepiej poznać rolę rozmieszczenia reszt hydrofobowych i hydrofilowych po przeciwnych stronach β struktury i ich wpływ na konformację peptydu. Otrzymane wyniki mogą zostać wykorzystane do planowania nowych analogów GS o korzystniejszym profilu farmakologicznym. Lepsze zrozumienie cech strukturalnych odpowiedzialnych za sposób działania peptydów jest kluczowe dla rozwoju nowej generacji antybiotyków.

Syntezę analogów GS przeprowadzono metodą syntezy w fazie stałej z zastosowaniem chemii Fmoc [H5]. Klasyczne podejście do syntezy *N*-koniec *C*-koniec cyklicznych peptydów obejmuje przygotowanie częściowo chronionych liniowych prekursorów w roztworze lub metodą syntezy w fazie stałej, a następnie przeprowadzenie cyklizacji w roztworze w warunkach dużego rozcieńczenia peptydu [54-57]. Do przeprowadzenia syntezy chronionych liniowych prekursorów odpowiednia jest żywica 2-chlorotrytylowa [58]. Zdejmowanie produktu z żywicy 2-chlorotrytylowej prowadzi się w warunkach łagodnych stosując następujące mieszaniny: kwas octowy (AcOH)/DCM/TFE [59-60] lub 1-5% TFA w DCM zawierającym 5% triizopropylsilanu (TIS) [61]. Metody opisane w literaturze wymagają obecności rozpuszczalnika nieprzyjaznego dla środowiska jakim jest DCM. Opracowano nową, prostą metodę zdejmowania chronionych peptydów z żywicy 2-chlorotrytylowej, która została wykorzystana w syntezie analogów GS. Do zdejmowania chronionych peptydów z nośnika stosowano 50% roztwór AcOH w toluenie w temperaturze 40°C (3 x 2 godz.). Po zdjęciu z nośnika w tych warunkach otrzymane peptydy miały chronione łańcuchy boczne. Żywice odsączano a roztwory odparowywano pod

zmniejszonym ciśnieniem. Peptydy wytrącano zimną wodą, odwirowywano i liofilizowano. Wydajności zdejmowania z nośnika chronionych liniowych peptydów były następujące: 79-86 % po pierwszych dwóch godzinach zdejmowania z nośnika, 13-18% po kolejnych 2 godz. i 1-3% po ostatnich 2 godzinach. Czystość HPLC chronionych peptydów po zdjęciu z nośnika była powyżej 90 %. Stosowany do zdejmowania peptydu z żywicy 2-chlorotrytylowej ciepły roztwór AcOH w toluenie może być łatwo odparowany pod zmniejszonym ciśnieniem po zakończeniu reakcji i jest bardziej przyjazny środowisku niż roztwór kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie. Opisana metoda może być wykorzystywana do otrzymywania cyklicznych peptydów. Poza tym metoda ta jest tak prosta, że może być stosowana zarówno w syntezie peptydów w skali laboratoryjnej jak i w syntezie prowadzonej w większej skali.

Celem publikacji **H6** była synteza i badania zależności struktura aktywność *N*-koniec *C*-koniec cyklicznych analogów LL37 i histatyny 5. LL37 jest peptydem przeciwdrobnoustrojowym o szerokim spektrum działania, podczas gdy histatyna 5 charakteryzuje się przede wszystkim działaniem przeciwgrzybiczym. LL37 występuje w neutrofilach, komórkach nabłonka, śliniance podzuchwowej, ślinie. Histatyna 5 występuje w śliniankach. Peptydy te są wrażliwe na proteolityczną degradację, co ogranicza możliwości podawania ich drogą doustną. Jednym ze sposobów zwiększenia stabilności peptydów jest cyklizacja, która często prowadzi do otrzymania peptydów, wykazujących zwiększoną aktywność biologiczną [62-64]. W celu zbadania zależności struktura aktywność zsyntezowano i zbadano LL37, histatynę 5 i ich *N*-koniec *C*-koniec cykliczne analogi. Badania mikrobiologiczne prowadzono wobec szczepów referencyjnych bakterii Gram-dodatnich: *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Rhodococcus equi* ATCC 6939, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; bakterii Gram-ujemnych: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* oraz grzybów *Candida albicans* ATCC10231, *Candida tropicalis* i *Aspergillus niger*. Histatyna 5 i jej cykliczny analog nie wykazywały aktywności przeciwdrobnoustrojowej w badanym zakresie stężeń. LL37 i jego *N*-koniec *C*-koniec cykliczny analog wykazywały podobną aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. W przypadku LL37 i jego analogu rodzaj pożywki wpływał na wyniki badań mikrobiologicznych wobec bakterii: *S. aureus*, *B. subtilis* i *E. coli*. LL37 i jego analog były bardziej aktywne w pożywce Bacto-peptone niż w pożywce Mueller-Hinton. Różnice były od jednego do czterech rozcieńczeń. Największa różnica w aktywność przeciwbakteryjnej spowodowana zmianą pożywki była obserwowana w przypadku bakterii *S.*

aureus. Zarówno LL37 jak i jego cykliczny analog wykazywały znaczącą aktywność przeciwgrzybiczą przy stężeniach 128 µg/ml. Całkowite zahamowanie wzrostu grzybów obserwowano przy 512 µg/ml. LL37, histatyny 5 i ich cykliczne analogi nie wykazywały aktywności hemolitycznej w badanym zakresie stężeń.

Strukturę cyklicznych peptydów oznaczano w dwóch układach micelarnych, dodecylofosfocholiny (DPC) i dodecylosiarczanie sodu (SDS). Pierwszy układ tworzy micelle zbudowane z jonów obojnaczych, drugi micelle na powierzchni których zgromadzony jest ładunek ujemny. Stosowane micelle imitują odpowiednio środowisko błon biologicznych kręgowców i mikroorganizmów. Strukturę cyklicznych peptydów zbadano z wykorzystaniem spektroskopii dichroizmu kołowego. Oba cykliczne peptydy ulegały zmianom konformacyjnym prowadzącym do stabilizacji struktury α -helikalnej w układzie z SDS. Niemniej jednak, w przypadku cyklicznej histatyny 5 do utworzenia struktury helikalnej w roztworze SDS, niezbędna była obecność jonów Zn^{2+} . Działanie jonów Zn^{2+} przypisywane jest obecności sekwencji His-Glu-X-X-His wiążącej jony Zn^{2+} [65]. Należy jednak podkreślić, iż obecność jonów Zn^{2+} w roztworze wodnym nie zawierającym miceli SDS nie powodowała tworzenia struktury helikalnej. W układzie micelarnym DPC tylko cykliczny analog LL37 przybierał strukturę helikalną.

Syntezę cyklicznych analogów *N*-koniec *C*-koniec LL37 i histatyny 5 przeprowadzono metodą syntezy w fazie stałej z zastosowaniem chemii Fmoc. Chronioną histatynę 5 i LL37 zdejmowano z nośnika stosując zmodyfikowaną metodę opracowaną przy syntezie analogów GS. Wprowadzona zmiana polegała na użyciu promieniowania mikrofalowego (50% AcOH w toluenie, 30W, 40°C) zamiast konwencjonalnego ogrzewania. Zdejmowanie peptydów z żywicy 2-chlorotrylowej przebiegało znacznie szybciej w obecności mikrofal niż przy zastosowaniu konwencjonalnego ogrzewania. Czas potrzebny do zdjęcia chronionego peptydu z nośnika był zależny od jego sekwencji. Chroniony LL37 jest bardziej hydrofobowy niż chroniona histatyna 5, stąd zdejmowanie LL37 z nośnika przebiegało dłużej. Użycie promieniowania mikrofalowego zwykle wpływa zarówno na wzrost czystości surowego produktu jak i wydajności czystego produktu [66-67]. Czystość HPLC surowych produktów otrzymanych metodą z użyciem mikrofal była tylko nieco wyższa niż w metodzie z konwencjonalnym ogrzewaniem. Wydajności zdejmowania chronionych peptydów LL37 i Histatyny 5 z żywicy metodą mikrofalową były odpowiednio o 5% i o 7% większe, niż w przypadku metody z konwencjonalnym ogrzewaniem.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że chronione peptydy mogą być z powodzeniem zdejmowane z żywicy 2-chlorotrylowej w 50% AcOH w toluenie w 40°C wobec promieniowania mikrofalowego. Wprowadzona modyfikacja powoduje, że przedstawiona metoda jest znacznie mniej czasochłonna. Może być przydatna do otrzymywania chronionych fragmentów peptydowych, które mogą być wykorzystywane w syntezie *N*-koniec *C*-koniec cyklicznych peptydów lub do kondensacji fragmentów peptydowych.

III. Synteza i badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej lipopeptydów, i porównywanie jej z aktywnością leków tradycyjnych [H7-H13]

Aktywność przeciwgrzybicza Pal-KK-NH₂ a tradycyjne leki [H7-H10]

W ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci wzrosła znacząco ilość zakażeń grzybami *Candida* a wraz z nimi zwiększają się potrzeby stosowania środków przeciwgrzybiczych. Jednocześnie wraz ze wzrostem liczby zakażeń *Candida spp.* rośnie ilość zakażeń wykazujących oporność na tradycyjne triazolowe leki przeciwgrzybiczne jak flukonazol i oporność krzyżowa na nowsze triazole. W skład prawidłowej flory jamy ustnej wchodzi różna liczba szczepów *Candida*. Najczęściej kojarzonym szczepem z jamą ustną jest *Candida albicans* ale również inne *Candida spp* były wyizolowane z jamy ustnej: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusi*, *C. dubliniensis* zarówno od osobników bez infekcji grzybiczej jak i z infekcją [4-5]. Czasami w jamie ustnej znajdują się również grzyby nie należące do rodzaju *Candida* takie jak *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula glutinis* i *Saccharomyces cerevisiae*. Około 40 % [6], a według niektórych doniesień nawet 60% [68] populacji jest bezobjawowymi nosicielami *Candida*, to jednak w stanach zmniejszonej odporności u tych osób może rozwijać się oportunistyczna infekcja grzybicza. Sytuacje te zdarzają się częściej np. u chorych na astmę, na cukrzycę czy HIV, u pacjentów po antybiotykoterapii, która zaburza równowagę mikroflory jamy ustnej. Wykazano, że u pacjentów z upośledzoną odpornością częściej występowały niektóre infekcje, np. grzybicze zapalenie przełyku czy zapalenie płuc przy współistniejącej masywnej kolonizacji jamy ustnej przez gatunki z rodzaju *Candida* [69]. Oportunistyczne infekcje *Candida spp* rozpowszechnione są również u osób w podeszłym wieku, które mają zmniejszone wydzielanie śliny lub noszą uzupełnienia protetyczne. Wybór właściwego sposobu leczenia infekcji

grzybiczej zależy od miejsca i rozmiaru zakażenia, jak również od skuteczności, bezpieczeństwa oraz kinetyki i profili dostępnych leków.

Przeprowadzone w pracy **H7** badania miały na celu porównanie aktywności przeciwgrzybiczej krótkiego lipopeptydu Pal-KK-NH₂ (PAL) [70-72] z tradycyjnymi lekami przeciwgrzybiczymi (amfoterycyna B, flukonazol, kaspofungina). Badania prowadzono na 24 szczepach klinicznych *Candida* : 4 szczepy *Candida albicans*, 4 *Candida parapsilosis*, 4 *Candida glabrata*, 4 *Candida krusei*, 4 *Candida tropicalis* i 4 *Candida guilliermondii*. Grzyby izolowano z krwi, układu pokarmowego, układu oddechowego, układu moczowego, ze zmian na paznokciach. Wykorzystywano również szczepy referencyjne *Candida albicans* ATCC 90029, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 750 i *Candida krusei* ATCC 6258. Wszystkie badane związki były aktywne wobec szczepów klinicznych w badanym zakresie stężeń, w szczególności kaspofungina i amfoterycyna, które wykazywały niższe minimalne stężenia hamujące wzrost niż flukonazol i lipopeptyd. Szczególnie interesujące wyniki otrzymano dla *C. krusei*, która była znacznie bardziej wrażliwa na Pal-KK-NH₂ niż na flukonazol. Ponadto obserwowano działanie synergistyczne Pal-KK-NH₂ /flukonazol, Pal-KK-NH₂ / amfoterycyna B, a w szczególności dla Pal-KK-NH₂ / kaspofungina.

Otrzymane wyniki są interesujące, ponieważ synergizm pomiędzy Pal-KK-NH₂ i kaspofunginą może być przydatny w badaniach klinicznych do leczenia inwazyjnych zakażeń grzybiczych. Według mojej wiedzy były to pierwsze badania działania synergistycznego lipopeptydu i leków przeciwgrzybiczych w warunkach *in vitro*. Dlatego badania kliniczne mające na celu ocenę potencjalnej użyteczności terapii kombinowanych a w szczególności zbadanie toksyczności Pal-KK-NH₂ powinny być wykonywane.

Oprócz *C. albicans* infekcje grzybicze jamy ustnej może powodować *Cryptococcus neoformans* [73-75]. Jest to oportunistyczny patogen grzybiczy, który może również powodować zapalenie opon mózgowych u pacjentów z obniżoną odpornością, głównie u osób zakażonych wirusem HIV. Leczenie kryptokokowego zapalenia opon mózgowych polega na podawaniu amfoterycyny B lub leczeniu skojarzonym amfoterycyną B i 5-fluorocytozyną. Leki azole takie jak flukonazol lub itrakonazol są stosowane w leczeniu podtrzymującym, w celu uniknięcia nawrotów choroby. W literaturze można znaleźć kilka doniesień dotyczących występowania oporności na amfoterycynę B, flukonazol, lub itrakonazol. Powszechne stosowanie flukonazolu do leczenia długoterminowego kryptokokozji może prowadzić do rozwoju mniej wrażliwych

szczepów na ten lek [76-77]. Występowanie oporności motywuje do poszukiwania nowych związków o alternatywnych mechanizmach działania. Wśród kandydatów do nowej klasy leków przeciwgrzybiczych znajdują się peptydy przeciwdrobnoustrojowe. W ramach przeprowadzonych badań [praca **H8**] określono *in vitro* aktywność Pal-KK-NH₂ oraz jego działanie synergistyczne z amfoterycyną B i flukonazolem na 14 szczepach *C. neoformans* wrażliwych na działanie amfoterycyny B i flukonazolu. Szczepy wyizolowano z krwi i płynu mózgowo rdzeniowego. Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost lipopeptydu Pal-KK-NH₂ wynosiły od 1,0 do 4,0 µg/ml. Działanie synergistyczne Pal-KK-NH₂ z amfoterycyną B było obserwowane dla trzech z czternastu badanych szczepów. Działanie grzybobójcze Pal-KK-NH₂ (6 godz.) było szybsze niż amfoterycyny B (24 godz.) na szczep H99. Ponadto obie substancje wykazywały grzybobójcze działanie względem pozostałych szczepów po 24 godz. inkubacji. Znacząca aktywność przeciwgrzybicza Pal-KK-NH₂ i działanie synergistyczne z amfoterycyną B sugerują, że może on być obiecującym kandydatem do leczenia infekcji powodowanych przez *C. neoformans*. Obecnie podstawowym lekiem do leczenia kryptokokozy jest amfoterycyna B sama lub w terapii skojarzonej z 5-fluorocytozyną. Niestety, amfoterycyna B jest lekiem bardzo toksycznym. Zbadany lipopeptyd charakteryzuje się szeroką aktywnością przeciwgrzybiczą *in vitro*, wykazuje działanie bakteriobójcze podobne do amfoterycyny B i nie powoduje powstawania antagonizmu wobec dwóch leków obecnie stosowanych w leczeniu infekcji grzybiczych powodowanych przez *C. neoformans*.

W pracach **H9** i **H10** zbadano możliwość wykorzystania Pal-KK-NH₂ w leczeniu zakażeń o innej lokalizacji niż jama ustna ale w stosunku do których prowadzi się terapię zarówno miejscową jak i ogólnoustrojową. W pracy **H9** zbadano *in vitro* wpływ Pal-KK-NH₂ na wzrost dermatofitów. Do leczenia infekcji powodowanych przez dermatofity stosuje się flukonazol, itraconazol, terbinafinę. Dostępne są dane literaturowe sugerujące występowanie oporności na tradycyjne leki. Wcześniej wykazano, że Pal-KK-NH₂ jest aktywny wobec wielu Gram-dodatnich ziarenkowców[72] i grzybów [**H7,H8**]. Podjęto się również sprawdzenia wpływu Pal-KK-NH₂ na wzrost dermatofitów [**H9-H10**], bowiem jednym z potencjalnych miejsc, szczególnie miejscowego działania tego typu związków oprócz jamy ustnej może być skóra, paznokcie. Badania przeprowadzono na izolatach dermatofitów pobranych ze zmian skórnych, włosów i paznokci pacjentów. Minimalne stężenia hamujące wzrost (MIC) peptydu Pal-KK-NH₂ przyjmowały wartości od 0,25 do 16 µg/ml i były podobne do MIC flukonazolu. Synergia była

obserwowana odpowiednio w 67%, 52% i 15% dla następujących układów Pal-KK-NH₂/intrakonazol, Pal-KK-NH₂/terbinafina i Pal-KK-NH₂/flukonazol. Antagonizm nie był obserwowany w żadnym z badanych układów. Przeprowadzone badania wykazały, że Pal-KK-NH₂ ma potencjalne możliwości działania przeciwko dermatofitom. Ponadto, aktywność jego w warunkach *in vitro* może być zwiększona przez połączenie z obecnie dopuszczonymi do obrotu lekami. Badany lipopeptyd może być stosowany w postaci aerozolu, lakieru lub maści, może stanowić w przyszłości cenne uzupełnienie terapii przeciwgrzybiczej w szczególności w połączeniu z leczeniem konwencjonalnym opornych zakażeń powodowanych przez dermatofity. Poprzednie badania interakcji leków przeciwko kilku grzybom, takim jak *Aspergillus spp.* lub *Cryptococcus neoformans* wykazały, że występowanie synergizmu w warunkach *in vitro* może się przełożyć na korzyści terapeutyczne w warunkach *in vivo*. Łączenie terapii miejscowej z ogólnoustrojową jest w wielu wypadkach korzystne. Przeprowadzone badania dostarczają interesujących danych na temat wrażliwości *in vitro* dermatofitów na lipopeptyd (PAL) w monoterapii, jak również w terapii skojarzonej z tradycyjnymi lekami.

W pracy **H10** przeprowadzono badania mające na celu porównanie aktywności przeciwgrzybiczej Pal-KK-NH₂ z γ -terpinenem i z tradycyjnym lekiem przeciwgrzybiczym flukonazolem. γ -Terpinen jest składnikiem rośliny leczniczej *Melaleuca alternifolia* o właściwościach przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych.

Badania przeprowadzono na izolatach dermatofitów pobranych ze zmian skórnych, włosów i paznokci pacjentów. Zrealizowane badania wykazały, że Pal-KK-NH₂ *in vitro* charakteryzuje się aktywnością względem dermatofitów przynajmniej podobną do flukonazolu i sugerują, że Pal-KK-NH₂ jest obiecującym kandydatem do leczenia infekcji powodowanych przez dermatofity. Miejscowe leczenie dermatoz preparatami przeciwgrzybiczymi na ogół jest wystarczające. Jednak w pewnych okolicznościach, takich jak rozległe infekcje czy infekcje paznokci lub skóry głowy leczenie miejscowe może być niewystarczające. W takich przypadkach konieczne będzie włączenie leczenia ogólnego. Jednak dermatozy są zwykle infekcjami powierzchniowymi i lipopeptydy mogłyby być stosowane w postaci lakierów, aerozolu lub maści, z których przenikałyby do warstwy rogowej naskórka lecząc infekcji. Doustne leki takie jak flukonazol lub intrakonazol są lekami przeciwgrzybiczymi stosowanymi obecnie w leczeniu ciężkich zakażeń. Oporność na flukonazol pojawiła się w przypadku kilku patogenów grzybowych i chociaż rzadko ale dotyczy również klinicznych izolatów dermatofitów. Dlatego

substancje przeciwwgrzybicze o nowym sposobie działania są poszukiwane. Wyniki dotyczące Pal-KK-NH₂ są zachęcające i wskazują, że związek ten zasługuje na dalsze badania jako potencjalny kandydat do leczenia infekcji powodowanych dermatofitami.

Badania wrażliwości biofilmu *S aureus* na lipopeptydy i tradycyjne leki [H11, H12]

Pierwszym etapem ewaluacji związków jako potencjalnych leków przeciwdrobnoustrojowych jest ocena ich aktywności *in vitro* w stosunku do szczepów referencyjnych, a następnie klinicznych drobnoustrojów. Zgodnie z bieżącymi doniesieniami literaturowymi niezwykle ważna jest także aktywność związków przeciwdrobnoustrojowych w stosunku do biofilmu. Są to trójwymiarowe dobrze zorganizowane struktury złożone z kolonii drobnoustrojów otoczonych polisacharydowym matriks zaopatrzonym w kanały transportujące substancje odżywcze i wodę. Mikroorganizmy wchodzące w skład biofilmu odznaczają się zwiększoną opornością na stosowane chemioterapeutyki w porównaniu z wolnopływającymi komórkami tego samego szczepu. Uważa się, że biofilm jest odpowiedzialny za ponad 60% infekcji o przewlekłym lub nawrotowym przebiegu oraz za zakażenia związane z implantami i innymi sztucznymi elementami zarówno w jamie ustnej jak i innych miejscach ludzkiego organizmu.

W pracy **H11** realizowano badania mające na celu ocenę wrażliwości biofilmu *S. aureus* [78-80] na peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Na 30 szczepach klinicznych gronkowca złocistego wykonano oznaczenia aktywności krótkich lipopeptydów (Pal-KK-NH₂, Pal-RR-NH₂, Pal-KRK-NH₂, Pal-KεK-NH₂, Pal-RR-NH₂ and Laur-OOC-NH₂) oraz antybiotyków konwencjonalnych (ampicylina, chloramfenikol, clindamycin, erytromycyna, fusidic acid, linezolid, mupirocyna, wankomycyna) w stosunku do bakteryjnych hodowli planktonowych oraz biofilmów formowanych na powierzchni polistyrenowej. Na podstawie wyników oznaczeń minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego zidentyfikowano wiele szczepów opornych na większość antybiotyków stosowanych powszechnie w lecznictwie (ampicylinę, chloramfenikol, erytromycynę oraz mupirocynę). Krótkie lipopeptydy były aktywne w stosunku do wszystkich badanych szczepów. Badania aktywności związków w stosunku do biofilmu wykazały niemal zupełny brak aktywności konwencjonalnych antybiotyków. Większość szczepów była zdolna do produkcji struktur niewrażliwych na wszystkie antybiotyki z wyjątkiem

wankomycyny. Badane lipopeptydy wykazały aktywność zbliżoną do aktywności tego antybiotyku.

Inne badania [H12] pozwoliły wykazać synergizm pomiędzy przeciwgronkowcowym działaniem krótkich lipopeptydów (Pal-Lys-Lys i Pal-Lys-Lys-NH₂) i wankomycyną. Badania *in vitro* w stosunku do komórek wolnopływających wykazały obniżenie wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego wankomycyny stosowanej w kombinacji z lipopeptydami. Wankomycyna i oba lipopeptydy wykazały porównywalną aktywność w stosunku do biofilmu gronkowcowego. Stwierdzono także synergizm działania pomiędzy tymi substancjami. Badanie *in vivo* obejmowało opracowanie szczurzego modelu infekcji gronkowcowej wywołanego przez implantację zakażonej protezy dakronowej do tkanki podskórnej szczura. Zwierzęta otrzymywały badane związki drogą dootrzewnową w monoterapii jak i w terapii skojarzonej. Otrzymane wyniki wykazały wysoką aktywność kombinacji wankomycyny wraz z lipopeptydami w zapobieganiu gronkowcowym infekcjom naczyniowym.

Aktywność przeciwbakteryjna dimeru Laur-CKK-NH₂ a tradycyjne leki [H13]

W jamie ustnej oprócz infekcji grzybiczych występują infekcje bakteryjne. Jednym z patogenów odpowiedzialnych za schorzenia bakteryjne jamy ustnej oraz towarzyszące im infekcje odpowiedzialna jest bakteria Gram-dodatnia *Enterococcus faecalis*. Bakteria ta może powodować: zapalenie wsierdza (pierwotnym źródłem zakażenia mogą być np. bakterie, które po ekstrakcji zęba lub stanie zapalnym dziąseł dostały się do krwiobiegu), bakterie, zakażenia ran po zabiegach chirurgicznych, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Lekiem ostatniej szansy w ciężkich zakażeniach bakteriami Gram-dodatnimi i opornymi na inne leki przeciwbakteryjne jest wankomycyna. Jednak stale rośnie liczba szczepów opornych na ten antybiotyk. Motywuje to wiele ośrodków do poszukiwania nowych antybiotyków aktywnych wobec opornych na wankomycynę bakterii. W ostatnich latach wprowadzony został do leczenia nowy antybiotyk (cykliczny lipopeptyd) daptomycyna, aktywny wobec bakterii Gram-dodatnich. Daptomycyna działa na błonę komórkową bakterii. Antybiotyk ten został dopuszczony w Stanach Zjednoczonych i w Europie do leczenia skomplikowanych zakażeń skóry i tkanek miękkich, wywoływanych przez *Staphylococcus spp.* i *Streptococcus spp.* oraz

prawostronnego infekcyjnego zapalenia wsierdza i bakteriemii wywoływanych przez *Staphylococcus aureus*. W publikacji **H13** przeprowadzono syntezę i badania mające na celu ocenę *in vitro* i *in vivo* rodzaju oddziaływania między dimerem Laur-CKK-NH₂ i daptomycyną używając dwóch szczepów *Enterococcus faecalis* o różnej wrażliwości (*E. faecalis* ATCC 29212 wrażliwy na wankomycynę, *E. faecalis* ATCC 51299 oporny na wankomycynę). Daptomycyna wykazywała odpowiednio wartości MIC 1 i 4 mg/L dla *E. faecalis* ATCC 29212 i *E. faecalis* ATCC 51299. Laur-CKK-NH₂ dimer wykazywał MIC 8 mg/L dla obu szczepów. Badania wykazały synergizm między dimerem Laur-CKK-NH₂ i daptomycyną. Badania cytotoksyczności przeprowadzono na komórkach A-549 ludzkiego raka płuc dla stężeń dimeru 1× i 2× MIC. Działanie cytotoksyczne dimeru Laur-CKK-NH₂ w badanych stężeniach było nieznaczne 3.2%. U myszy, na których przeprowadzono badania *in vivo* nie obserwowano efektów ubocznych ani reakcji nadwrażliwości na dimer Laur-CKK-NH₂. U myszy nie zainfekowanych ale leczonych dimerem lipopeptydu nie zaobserwowano zmian parametrów fizjologicznych.

W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że dimer Laur-CKK-NH₂ zapobiega powstawaniu oporności na daptomycynę oraz wykazano synergistyczne działanie między dimerem Laur-CKK-NH₂ i daptomycyną. Niemniej jednak, mechanizm tego oddziaływania jest nieznan. Rola lipopeptydów w działaniu synergistycznym może polegać na zaburzaniu struktury ściany komórkowej, umożliwiając tym samym lepszą penetrację i aktywność daptomycynie. Zastosowanie terapii skojarzonej dimeru z daptomycyną prowadziło do znacznego zmniejszenia śmiertelności (6,7%) i bakteremii w porównaniu z monoterapią zarówno w przypadku infekcji powodowanej *E. faecalis* ATCC 29212 jak i *E. faecalis* ATCC 51299. Otrzymane wyniki sugerują, że sposób działania badanych związków może być komplementarny. Przeprowadzone badania wykazały, że dimer Laur-CKK-NH₂ wykazuje działanie synergistyczne z daptomycyną i jednocześnie zapobiega powstawaniu oporności na daptomycynę, co sugeruje, że jest on dobrym kandydatem do leczenia ciężkich infekcji powodowanych przez enterokoki.

IV. Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na aktywność przeciwnowotworową [H14]

Główny mechanizm działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs) polega na oddziaływaniu z błoną komórkową i uszkodzeniu jej. Kluczowe jest tworzenie amfipatycznych

struktur, które ułatwiają AMPs oddziaływanie z błoną komórkową. AMPs o budowie kationowej mogą elektrostatycznie oddziaływać z błoną i gromadzić się na niej. Gdy krytyczne stężenie AMPs zostanie osiągnięte, zachodzą zmiany konformacyjne peptydów prowadzące do uszkodzenia błony komórkowej. Chociaż wydaje się, że większość AMPs głównie oddziałuje z błoną to nie rzadko występują również peptydy, które wnikają do cytoplazmy i powodują wewnątrzkomórkowe zmiany, w tym hamowanie syntezy białek lub DNA np. buforyna 2. Większość AMPs wykazuje pewien poziom specyficzności względem komórek docelowych. Z jednej strony jest on zależny od właściwości AMPs takich jak struktura drugorzędowa, ładunek, hydrofobowość z drugiej strony wpływ na niego mają właściwości błon komórek docelowych tj. skład fosfolipidów, krzywizna lub obecność cholesterolu. Różnice w składzie błon komórek zdrowy i nowotworowych prowadzą również do wzrostu selektywności komórek nowotworowych na działanie lityczne AMPs i do zaburzenia asymetrii błony komórkowej. Zewnętrzny listek błony komórkowej komórek nowotworowych zawiera obdarzoną ładunkiem ujemnym fosfatydyloserynę (PS) (stanowi od 3 do 9% fosfolipidów błonowych) w przeciwieństwie do zdrowych komórek, w których PS jest umiejscowiony wyłącznie w wewnętrznym listku błony komórkowej. Podwyższony poziom O-glikolizowanych mucyn powoduje również zwiększenie ujemnego ładunku błon komórkowych komórek nowotworowych. W rezultacie na powierzchni komórek nowotworowych w prównaniu z komórkami zdrowymi zgromadzony jest większy ładunek ujemny. Np. cekropiny i magaininy zabijają komórki nowotworowe w stężeniach niższych niż te wymagane do lizy zdrowych komórek np. limfocytów krwi obwodowej. AMPs mogą również pełnić funkcję mediatorów procesów zapalnych jak również wpływać na komórki nabłonka i komórki układu immunologicznego modulujące np., proliferację, angiogenezę, uwalnianie cytokin i chemotaksję przez wiązanie się do komórkowych receptorów przy niskich stężeniach i aktywować drogi przekazywania sygnałów.

W pracy **H14** w celu zbadania aktywności przeciwnowotworowej przeprowadzono syntezy w fazie stałej z wykorzystaniem chemii Fmoc następujących peptydów przeciwdrobnoustrojowych: pexigananu MSI-78, citropiny 1.1, protegryny 1, omigananu MBI-226, buforyny 2, demegenu P-113, temporyny A, Pal-KK-NH₂. Badania prowadzono na linii komórkowej białaczki mieloidalnej U937. Wśród badanych związków były zarówno endogenne jak i syntetyczne peptydy różniące się miejscem występowania, strukturą, mechanizmem

działania. Największą aktywność cytotoksyczną względem komórek U937 w teście MTT wykazywał pexiganan MSI-78, a następnie citropina 1.1, protegryna 1 i syntetyczny lipopeptyd Pal-KK-NH₂. Aktywność cytotoksyczna badanych peptydów była bardziej uzależniona od czasu inkubacji niż od stężenia. Dla tych czterech peptydów oraz buforyny 2, która nie wykazywała działania cytotoksycznego względem komórek nowotworowych przeprowadzono szczegółowe badania zależności dawka-aktywność w zakresie stężeń 0.5µg/ml - 20µg/ml. Spośród badanych peptydów najsilniejsze działanie przy dawce 20µg/ml wykazywał pexiganan. Buforyna 2 nie wykazywała działania cytotoksycznego nawet przy dawce 20µg/ml. Działanie cytotoksyczne Pal-KK-NH₂ było podobne do działania citropiny i protegryny 1. Jedynie w przypadku lipopeptydu, którego sposób działania polega na zaburzaniu potencjału elektrycznego błony komórkowej zależność między cytotoksycznością i stężeniem była prawie liniowa. Po wykonaniu testu na ciągłość błony komórkowej z błękitem trypanu, stwierdzono, że wysoka aktywność cytotoksyczna pexigananu MSI-78, protegryny 1 i lipopeptydu prowadząca do martwicy może być powodowana lizą błon komórkowych. Jednakże, w przypadku citropiny 1.1 ciągłość membrany została uszkodzona tylko w stopniu nieznacznym i niezależna była od stężenia peptydu. Dlatego, inny mechanizm działania może być odpowiedzialny za jej silne, zależne od dawki działanie cytotoksyczne, np. indukowanie apoptozy. W celu dalszego wyjaśnienia mechanizmu działania przeciwnowotworowego zbadano relacje pomiędzy LPS, czynnikiem martwicy nowotworu (TNF-α) i AMPs. Niektóre peptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą wiązać się do LPS rozbijając jego agregaty i zapobiegając wiązaniu się LPS do receptorów np. CD14 lub do białek nośnikowych w błonie i zapobiegając produkcji TNFα przez komórki pobudzone LPS [81]. Citropina 1.1, pexiganan MSI-78 lub protegryna 1, ale nie buforyna 2 i lipopeptyd zmniejszały stymulowanie LPS do wytwarzania TNFα. Rak jamy ustnej jest jedenastym z najczęściej występujących nowotworów na świecie [82]. Najwyższą zachorowalność obserwuje się w Indiach, Australii, Brazylii, Francji i RPA. W Europie najbardziej dotknięte regiony to Francja, francuskojęzyczna część Szwajcarii, północne Włochy i kraje Europy Środkowo-Wschodniej. W Polsce stanowi 1,34% wszystkich zarejestrowanych nowotworów złośliwych w roku 2008. Rak płaskonabłonkowy to najczęściej występujący rak jamy ustnej, jest nowotworem złośliwym, który może atakować kości żuchwy [83]. Jedną z cytokin zaangażowaną w rozwój raka nabłonkowego jamy ustnej jest TNFα. Zrozumienie zależności między strukturą AMPs i aktywnością przeciwnowotworową będzie pomocne w planowaniu syntetycznych peptydów o

większej aktywności przeciwnowotworowej i selektywności oraz mniejszej ilości efektów ubocznych.

Podsumowanie

- Przeprowadzono badania wstępne trwałości stateryny w ślinie ludzkiej mieszanej spoczynkowej w RT oraz badania trwałości stateryny syntetycznej w roztworach wodnych i stateryny natywnej w ślinie ludzkiej mieszanej spoczynkowej o różnych wartościach pH.
- Po raz pierwszy zsyntezowano polipeptyd P-B występujący w ślinie ludzkiej i zbadano jego strukturę drugorzędową. Polipeptyd PB przyjmuje głównie strukturę nieuporządkowaną z miejscowo występującymi β -zgięciami. Udział helisy poliproliny typu II (PPII) jest niewielki (10% CD i FTIR, 7% MD).
- Zsyntezowano opiorfinę i wykazano, że peptyd ten wykazuje działanie przeciwbólne u myszy, które nie jest powiązane z efektami ubocznymi towarzyszącymi zwykle podaniu opioidów takimi jak tolerancja czy uzależnienie. Dodatkowo opiorfina wykazywała działanie przeciwdepresyjne. Zbadano sposób wiązania się opiorfiny z jonami Cu(II).
- Zsyntezowano analogi GS zawierające modyfikacje zaburzające charakter amfipatyczny. Wprowadzone zmiany doprowadziły do zaniku aktywności mikrobiologicznej.
- Opracowano nową, metodę zdejmowania chronionych peptydów z żywicy 2-chlorotrylowej, która została wykorzystana w syntezie analogów GS. Metoda jest prosta i może być stosowana zarówno w syntezie peptydów w skali laboratoryjnej jak i w syntezie prowadzonej w większej skali.
- Zmodyfikowano metodę zdejmowania chronionych peptydów z żywicy 2-chlorotrylowej opracowaną przy syntezie analogów GS. Zmiana polegała na użyciu promieniowania mikrofalowego zamiast konwencjonalnego ogrzewania. Wprowadzona zmiana przyczyniła się do znacznego skrócenia czasu reakcji oraz nieznacznie wpłynęła na poprawę wydajności reakcji i czystość otrzymywanych produktów.
- Zsyntezowano *N*-koniec *C*-koniec cykliczne analogi histatyny 5 i LL37. Cykliczne analogi histatyny 5 i LL37 wykazywały odpowiednio taką samą lub podobną aktywność mikrobiologiczną jak ich liniowe odpowiedniki. Aktywność hemolityczna cyklicznych związków była taka sama jak ich liniowych odpowiedników. Strukturę cyklicznych

peptydów oznaczano w dwóch układach micelarnych, dodecylofosfocholinie (DPC) i dodecylosiarczanie sodu (SDS). Oba cykliczne peptydy ulegały zmianom konformacyjnym prowadzącym do stabilizacji struktury α -helikalnej w układzie z SDS. W przypadku cyklicznej histatyny 5 do utworzenia struktury helikalnej w roztworze SDS, niezbędna była obecność jonów Zn^{2+} . W układzie micelarnym DPC tylko cykliczny analog LL37 przybierał strukturę helikalną.

- Zsyntezowano i zbadano aktywność lipopeptydów Pal-KK-NH₂, Pal-RR-NH₂, Pal-KRK-NH₂, Pal-KεK-NH₂, Pal-RR-NH₂ i Laur-OOC-NH₂ wobec biofilmu gronkowcowego. Peptydy wykazywały aktywności zbliżone do wankomycyny.
- Lipopeptydy Pal-KK-NH₂ i Pal-KK-OH zarówno w monoterapii jak i terapii skojarzonej z wankomycyną wykazywały wysoką aktywność w zapobieganiu gronkowcowym infekcjom zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*.
- Lipopeptyd Pal-KK-NH₂ był aktywny wobec wszystkich szczepów klinicznych *Candida*, nawet wobec *C. krusi* i *C. glabrata*, które były odporne na flukonazol, wykazywał znaczącą aktywność przeciwgrzybiczą i działanie synergistyczne z amfoterycyną B wobec *Cryptococcus neoformans*, charakteryzował się w badaniach *in vitro* aktywnością względem dermatofitów przynajmniej podobną do flukonazolu. Lipopeptyd Pal-KK-NH₂ jest obiecującym kandydatem do leczenia kryptokokozy, dermatozy czy kandydozy. Niezbędne są dalsze badania Pal-KK-NH₂ oraz peptydów o podobnej budowie w celu oceny ich toksyczności oraz potencjalnych zastosowań.
- Zsyntezowano dimer Laur-CKK-NH₂, który w badaniach *in vitro* zapobiegał powstawaniu oporności na daptomycynę oraz wykazano synergistyczne działanie między dimerem Laur-CKK-NH₂ i daptomycyną wobec infekcji powodowanych przez *Enterococcus faecalis*.
- Pexiganan MSI-78, citropina 1.1, protegryna 1 i syntetyczny lipopeptyd Pal-KK-NH₂ wykazywały aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowej U937. Citropina 1.1, pexiganan MSI-78 i protegryna 1, zmniejszały stymulowanie LPS do wytwarzania TNF α .

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Działalność naukową rozpoczęłam jako studentka chemii Wydziału Matematyczno-Fizyczno-Chemicznego Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie pod opieką prof. Zbigniewa Maćkiewicza wykonałam pracę magisterską p.t.: „Synteza analogów fragmentu 144-152 proteiny p24^(gag) wirusa HIV wiążących się z białkami głównego układu zgodności tkankowej (MHC)“.

W październiku 1995 roku podjęłam naukę na studiach doktoranckich na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem mojej pracy doktorskiej był prof. Bernard Lammek. Praca doktorska dotyczyła badań nad zależnością między strukturą a aktywnością biologiczną analogów hormonów neuroprzysadkowych. Otrzymałam 39 nowych analogów oksytocyny i argininowej wazopresyny o spodziewanych właściwościach zarówno agonistycznych jak i antagonistycznych. Syntezę zaplanowanych analogów przeprowadziłam manualnie wykorzystując metodę syntezy peptydów w fazie stałej. Otrzymane peptydy poddano badaniom aktywności zarówno agonistycznej jak i antagonistycznej w testach presyjnych, antydiuretycznych i uterotonicznych. Określiłam wpływ wybranych modyfikacji na czynność biologiczną zsyntetyzowanych peptydów. Pracę doktorską zatytułowaną „Wpływ wybranych modyfikacji cząsteczek hormonów neuroprzysadkowych na ich czynność biologiczną” obroniłam 2-go czerwca 2000 roku na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego i uzyskałam stopień doktora nauk chemicznych. Recenzentami mojej pracy byli: prof. Janusz Zabrocki z Politechniki Łódzkiej i prof. Zbigniew Grzonka z Uniwersytetu Gdańskiego. W efekcie współpracy z prof. B. Lammkiem powstało sumarycznie 5 prac z czego 3 do roku 2000 czyli do uzyskania stopnia doktora. W 1999 roku zostałam zatrudniona jako asystent w Katedrze Syntezy Organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W 2000 roku po obronie pracy doktorskiej zostałam zatrudniona jako adiunkt w Katedrze Syntezy Organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W kwietniu 2001 roku (04.2001r. – 12.2002r.) wyjechałam na staż naukowy do firmy Polypeptide Laboratories AB w Szwecji. Pracowałam początkowo w dziale do spraw rozwoju technologii i procesów a po reorganizacji w dziale do spraw badań i rozwoju. Firma zajmowała się m.in. otrzymywaniem peptydowych substancji leczniczych. W czasie mojego pobytu w Polypeptide Laboratories AB byłam zaangażowana w opracowywanie technologii syntezy peptydów w dużej skali. Poza tym, uczestniczyłam w projekcie dotyczącym chemii białek. Opracowałam metodę koniugacji haptenu z chemicznie inaktywowaną toksyną bakterii

tęcza i przeprowadziłam tą reakcję w zwiększonej skali wg. opracowanej procedury. Po powrocie ze stażu zainteresowałam się badaniami dotyczącymi stateryny realizowanymi w Zakładzie Chemii Polipeptydów Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (kierownik prof. Z. Maćkiewicz) w ramach współpracy z dr hab. B. Kochańską, prof. nadzw. kierownikiem Katedry i Zakładu Stomatologii Zachowawczej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz badaniami peptydów przeciwdrobnoustrojowych prowadzonymi w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik dr hab. Wojciech Kamysz, prof. nadzw.). Obecnie uczestniczę w badaniach dotyczących zastosowania wyselekcjonowanych związków będących endogennie występującymi peptydami przeciwdrobnoustrojowymi oraz ich analogów w gumie do żucia. Badania są finansowane w ramach projektu MNiSW, w którym jestem wykonawcą (kierownik prof. Jerzy Łukasiak, tytuł: „Zastosowanie analogów peptydów ślinowych w gumie do żucia” , nr grantu N N405 625238, termin realizacji 2010-2013). Zaproponowana postać leku zawiera gumę do żucia jako matrycę dla substancji przeciwdrobnoustrojowej, związków powodujących odpowiednie nawilżenie, ale jednocześnie na drodze motorycznej stymuluje do wydzielania endogennej śliny. Przeprowadzone badania przyczynią się do rozwoju technologii otrzymywania i badania gumy do żucia jako postaci leku stosowanej w schorzeniu kserostomii. Część badań dotyczących peptydów przeciwdrobnoustrojowych była realizowane w ramach grantu MNiSW, w którym byłam wykonawcą (kierownik dr hab. Wojciech Kamysz, prof. nadzw., tytuł: „Czy peptydy przeciwdrobnoustrojowe są skuteczne w eradykacji biofilmu gronkowcowego?”, nr projektu N N405630638, termin realizacji 2010-2012).

Obecnie kontynuuję badania prowadzone w ramach przygotowywania prac do cyklu habilitacyjnego dotyczące opiorfiny, sialorfiny, LL37, histatyny 5, polipeptydu P-B i ich analogów. W ramach współpracy z dr hab. Jakubem Fichną z Zakładu Chemii Biomolekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi przeprowadzone zostały badania biologiczne opiorfiny, sialorfiny i ich analogów zawierających w pozycji 1 resztę piroglutaminy. Przygotowany manuskrypt został zgłoszony do druku. Kontynuuję również badania dotyczące oddziaływania jonów metali z opiorfiną, sialorfiną oraz ich analogami w ramach współpracy z dr hab. Justyną Brasuń z Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Kolejny manuskrypt dotyczący tej tematyki został wysłany do redakcji. Inhibitory enzymów rozkładających enkefalinę takie jak opiorfina i sialorfina wydają

się być cennym narzędziem farmakologicznym i potencjalnymi środkami terapeutycznymi, wymagają jednak dalszych badań. W ramach współpracy z dr inż. Emilią Sikorską z Katedry Chemii Organicznej UG kontynuowane są badania zależności struktura aktywność zarówno analogów LL37, histatyny 5 jak i polipeptydu P-B. Ponadto w ramach współpracy z Katedrą i Zakładem Chemii Nieorganicznej GUMed (dr hab. Wojciech Kamysz, prof. nadzw.) oraz Instytutem Chorób Zakaźnych i Zdrowia Publicznego w Ankonie (prof. Oscar Cirioni) prowadzę prace dotyczące możliwości wykorzystania w leczeniu zarówno ślinowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych jak i peptydów przeciwdrobnoustrojowych o innych źródłach pochodzenia.

Za prowadzone badania otrzymałam cztery Zespołowe Nagrody Rektora I-go stopnia Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W latach 2010-2011 ukończyłam trzysemestralne studia podyplomowe „Farmacja przemysłowa”. Tematem mojej pracy dyplomowej była „Guma do żucia jako postać leku”(promotor dr hab. K. Cal, prof. nadzw.).

Pełny wykaz opublikowanych prac naukowych znajduje się w załączniku nr 4.

Literatura

1. Banach M, Ostrowski S, Okoński P. Infekcyjne zapalenie wsierdza – aktualny stan wiedzy. *Przew. Lek.* 2004, 10(70): 80-88.
2. Jacobson JJ, Silverman S. Bacterial infections. In: Essentials of oral medicine (Eds: Silverman,S, Roy L, Edmond E, Truelove L), Ontario, BC Decker,2002, 159-169.
3. Epstein JB, Silverman S, Fleischmann J. Oral fungal infections, in: Essentials of oral medicine (Eds: Silverman,S, Roy L, Edmond E, Truelove L), Ontario, BC Decker ,2002, 170-179.
4. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Peixoto IT, Höfling JF, Gonçalves RB. Candida spp. in periodontal disease: a brief review. *J. Oral Sci.* 2010, 52(2): 177-185.
5. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel species. *Candida dubliniensis*. *AIDS*, 1997, 11: 557-567.
6. Kobińska-Brzoza J, Wrzyszczyk-Kowalczyk A. Występowanie drobnoustrojów *Candida* spp. w jamie ustnej u dzieci chorych na astmę oskrzelową. *Mikologia Lekarska*, 2007, 14 (4): 237-240.
7. Fotos PG, Vincent SD, Hellstein JW. Oral candidosis. Clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1992, 74: 41-49.

8. Meurman JH, Siikala E, Richardson M, Rautemaa R. Non-Candida albicans Candida yeasts of the oral cavity. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A. Mendez-Vilas (Ed.) FORMATEX 2007, 719-731.
9. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *CEJB*, 2007, 2(1): 1-33.
10. Peperney A, Chikindas ML. Antibacterial Peptides: Opportunities for the Prevention and Treatment of Dental Caries. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2011, 3: 68-96.
11. Laila HN, Cross KJ, Ung M, Myroforidis H, Veith PD, Chen D, Stanton D, He H, Ward BR, Reynolds EC. A review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2007, 13: 547-564.
12. Oyston PCF, Fox MA, Richards SJ, Clark GC. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *J. Med. Microbiol.* 2009, 58: 977-987.
13. Wiechuła BE, Tustanowski JP, Martirosian G. Peptydy antydrobnoustrojowe. *Wiad. Lek.* 2006, LIX, 7-8.
14. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.* 2001, 85: 162-169.
15. Schlesinger DH, Hay DI. Complete Covalent Structure of Statherin, a Tyrosine-rich Acidic Peptide Which Inhibits Calcium Phosphate Precipitation from human parotid saliva. *J. Biol. Chem.* 1977, 252: 1689-1695.
16. Hay DI. The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch. Oral Biol.* 1973, 18(12): 1517-1529.
17. Sabatini LM, Carlock LR, Johnson GW, Azen EA. cDNA cloning and chromosomal localization (4q11-13) of a gene for statherin, a regulator of calcium in saliva. *Am. J. Hum. Genet.* 1987, 41: 1048-1060.
18. Zalewska A, Pietruska MD, Knaś M, Zwierz K. Non mucin proteins of saliva with high homology of polypeptide chains. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2001, 55(5): 733-754 .
19. Bennick A. Salivary proline-rich proteins. *Mol. Cell Biochem.* 1982, 45: 83-99.
20. Kaufmann DL, Keller PJ. The basic proline-rich proteins in human parotid saliva from a single subject. *Arch. Oral Biol.* 1979, 24: 249-256.
21. Gron P, Hay DI. Inhibition of calcium phosphate precipitation by human salivary secretions. *Arch. Oral Biol.* 1976, 21: 201-205.
22. Gu M, Haraszthy GG, Collins AR, Bergey EJ. Identification of salivary proteins inhibiting herpes simplex virus 1 replication. *Oral Microbiol. Immunol.* 1995, 10(1): 54-59.

23. O'Sullivan JM, Cannon RD, Sullivan PA, Jenkinson HF. Identification of salivary basic proline-rich proteins as receptors for *Candida albicans* adhesion. *Microbiology*, 1997, 143: 341-348.
24. Hatton MN, Loomis RE, Levine MJ, Tabak LA. Masticatory lubrication. The role of carbohydrate in the lubricating property of a salivary glycoprotein-albumin complex. *Biochem. J.* 1985, 230: 817-820.
25. Murray PA, Prakobphol A, Lee T, Hoover CI, Fisher SJ. Adherence of oral streptococci to salivary glycoproteins. *Infect. Immun.* 1992, 60(1):31-38.
26. Gillece-Castro BL, Prakobphol A, Burlingame AL, Leffler H, Fisher SJ. Structure and bacterial receptor activity of a human salivary proline-rich glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 1991, 266(26): 17358-17368.
27. Lu Y, Bennick A . Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Arch. Oral Biol.* 1998, 43: 717-728.
28. Isemura S, Saitoh E. Nucleotide sequence of gene PBI encoding a protein homologous to salivary proline-rich protein P-B. *J. Biochem.*, 1997, 121: 1025-1030.
29. Isemura S. Nucleotide sequence of gene PBII encoding salivary proline-rich protein P-B. *J. Biochem*, 2000, 127:393-398.
30. Messana I, Cabras T, Inzitari R, Lupi A, Zuppi C, Olmi C, Fadda MB, Cordaro M, Giardina B, Castagnola M. Characterization of the human salivary basic proline-rich protein complex by a proteomic approach. *J. Proteom. Res.*, 2004, 3: 792-800.
31. Cid H, Varagas V, Bunster M, Bustos S. Secondary structure prediction of human salivary proline-rich proteins. *FEBS*, 1986, 198: 140-144.
32. Inzitari R, Cabras T, Rossetti DV, Fanali C, Vitali A, Pellegrini M, Paludetti G, Manni A, Giardina B, Messana I, Castagnola M. Detection in human saliva of different statherin and p-b fragments and derivatives. *Proteomics*. 2006, 6(23):6370-6379.
33. Shibata S, Asakura J, Isemura T, Isemura S, Saitoh E, Sanada K. Conformational study of the basic proline-rich polypeptides from human parotid saliva. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1984, 23: 158–165.
34. Murray NJ, Williamson MP. Conformational study of a salivary proline-rich protein repeat sequence. *Eur. J. Biochem.* 1994, 219: 915–921.
35. Simon C, Pianet I, Dufourc EJ. Synthesis and circular dichroism study of the human salivary proline-rich protein IB7. *J. Pept. Sci.* 2003, 9: 125–131.
36. Wisner A, Dufour E, Messaoudi M, Nejdí A, Marcel A, Ungeheuer MN, Rougeot C. Human opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006,103:17979–17984.

37. Thanawala V, Kadam VJ, Ghosh R . Enkephalinase Inhibitors: Potential Agents for the Management of Pain. *Curr. Drug Targets*. 2008, 9(10): 887-894.
38. Rougeot C, Robert F, Menz L, Bisson JF, Messaoudi M. Systemically active human opiorphin is a potent yet non-addictive analgesic without drug tolerance effects. *J Physiol. Pharmacol*. 2010, 61(4): 483-490.
39. Tong Y, Tar M, Melman A, Davies K. The opiorphin gene (ProL1) and its homologues function in erectile physiology. *BJUI* 2008, 102: 736 –740.
40. Rougeot C, Dufour E, Villard-Saussine S, Ungeheuer MN, Jouannet P, Patent, WO 2010/060995 A1.
41. Brkljačić L, Sabalić M, Salarić I, Jerić I, Alajbeg I, Nemet I. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantification of opiorphin in human saliva. *J. Chromatogr. B.*, 2011, 879: 3920– 3926.
42. Messaoudi M, Desor D, Nejdj A, Rougeot C. The endogenous androgen-regulated sialorphin modulates male rat sexual behavior. *Horm. Behav*. 2004, 46: 684–691.
43. Davies KP, Tar M, Rougeot C, Melman A. Sialorphin (the mature peptide product of Vcsa1) relaxes corporal smooth muscle tissue and increases erectile function in the ageing rat. *BJU Int* 2007, 99: 431–435.
44. Rougeot C, Messaoudi M, Hermitte V, Rigault AG, Blisnick T, Dugave C, Desor D, Rougeon F. Sialorphin, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. *PNAS* 2003, 100(14): 8549-8554.
45. Dickinson DP, Thiesse M. cDNA cloning of an abundant human lacrimal gland mRNA encoding a novel tear protein. *Curr. Eye Res*. 1996,15: 377–386.
46. Rougeot C, Rosinski-Chupin I, Rougeon F. Novel genes and hormones in salivary glands: from the gene for the submandibular rat1 protein (SMR1) precursor to receptor sites for SMR1 mature peptides. *Biomed. Rev*. 1998, 9: 17–32.
47. Garhammer P, Hiller KA, Reitingner T, Schmalz G. Metal content of saliva of patients with and without metal restorations. *Clin. Oral Invest*. 2004, 8: 238–242.
48. Barnea A. Use of metal complexes in neuroendocrine studies. *Methods Enzymol*. 1989, 168: 710-715.
49. Meng R, Becker J, Lin FT, Saxena S, Weber SG. Binding of copper(II) to thyrotropin-releasing hormone (TRH) and its analogs. *Inorg. Chim. Acta* 2005, 358: 2933-2942.
50. Schilling S, Hoffmann T, Manhart S, Hoffmann M, Demuth H. Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett*. 2004, 563: 191-196.

51. Kondejewski LH, Farmer SW, Wishart DS, Kay CM, Hancock REW, Hodges RS. Modulation of structure and antibacterial and hemolytic activity by ring size in cyclic gramicidin S analogs. *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 25261–25268.
52. Kondejewski LH, Farmer SW, Wishart DS, Hancock REW, Hodges RS. Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1996, 47: 460–466.
53. Lee DL, Hodges RS. Structure-activity relationships of de novo designed cyclic antimicrobial peptides based on gramicidin S. *Biopolymers* 2003, 71: 28–48.
54. Yun-hua Y, Xing-ming G, Mian L, Yan-chun T, Gui-ling Tian. Studies on the synthetic methodology of head to tail cyclization of linear peptides. *Lett. Pept. Sci.* 2003, 10: 571–579.
55. Tang YC, Xie HB, Tian GL, Ye YH. Synthesis of cyclopentapeptides and cycloheptapeptides by DEPBT and the influence of some factors on cyclization. *J. Pept. Res.* 2002, 60: 95–103.
56. Valero ML, Giralt E, Andreu D. A comparative study of cyclization strategies applied to the synthesis of head-to-tail cyclic analogs of a viral epitope. *J. Pept. Res.* 1999, 53: 56–67.
57. Alcaro MC, Sabatino G, Uziel J, Chelli M, Ginanneschi M, Rovero P, Papini AM. On-resin head-to-tail cyclization of cyclotetrapeptides: optimization of crucial parameters. *J. Pept. Sci.* 2004, 10(4): 218–228.
58. Barlos K, Chatzi O, Gatos D, Stavropoulos G. 2-Chlorotrityl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1991, 37: 513–520.
59. Barlos K, Gatos D, Kapolos S, Poulos C, Schäfer W, YaoWQ. Application of 2-chlorotrityl resin in solid phase synthesis of (Leu15)-gastrin I and unsulfated cholecystokinin octapeptide. Selective O-deprotection of tyrosine. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1991, 38(6): 555–561.
60. Bodi J, Suli-Vargha H, Ludanyi K, Vekey K, Orosz G. New strategy for the synthesis of large peptides as applied to the C-terminal cysteine-rich 41 amino acid fragment of the mouse agouti protein. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38: 3293–3296.
61. Barlos K, Gatos D, Hatzi O, Koch N, Koutsogianni S. Synthesis of the very acid-sensitive Fmoc-Cys(Mmt)-OH and its application in solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1996, 47(3): 148–153.
62. Monroc S, Badosa E, Feliu L, Planas M, Montesinos E, Bardají E. De novo designed cyclic cationic peptides as inhibitors of plant pathogenic bacteria. *Peptides* 2006, 27(11): 2567–2574.
63. Dartois V, Sanchez-Quesada J, Cabezas E, Chi E, Dubbelde C, Dunn C, Granja J, Gritzen C, Weinberger D, Ghadiri MR, Parr TR Jr. Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 3302–3310.

64. Oren Z, Shai Y. Cyclization of a cytolytic amphipathic alpha-helical peptide and its diastereomer: effect on structure, interaction with model membranes, and biological function. *Biochemistry* 2000, 39: 6103–6114.
65. Gusman H, Lendenmann U, Grogan J, Troxler RF, Openheim FG. Is salivary histatin 5 a metallopeptide? *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1545: 86–95.
66. Rizzolo F, Testa C, Lambardi D, Chorev M, Chelli M, Rovero P, Papini AM. Conventional and microwave-assisted SPPS approach: a comparative synthesis of PTHrP(1–34)NH₂. *J. Pept. Sci.* 2011, 17: 708–714.
67. Cemazar M, Craik DJ. Microwave-assisted Boc-solid phase peptide synthesis of cyclic cysteine-rich peptides. *J. Pept. Sci.* 2008, 14: 683–689.
68. Stenderup A. Oral mycology. *Acta Odontol. Scand.*, 1990, 48, 3-10.
69. Heimdahl A, Nord CE. Oral yeast infection in immunocompromised and seriously diseased patients. *Acta Odontol. Scand.*, 1990, 48: 77-84.
70. Vogler K, Lanz P, Quitt P, Studer RO, Lergier W, Bohni E, Fust B. Fettsäurehaltige basische Peptide mit antibakterieller Wirkung. *Helvetica Chimica Acta*, 1964, 47(2): 526-544.
71. Cegielska A, Dabrowska M, Lammek B, Mackiewicz Z, Taylor A, Kupryszewski G. Antibacterial peptide derivatives. Part VI. Derivatives of the L-lysine and L-ornithine dipeptides and their effect on the morphology of bacterial cells. *Mater Med Pol.* 1979, 11(4): 324-329.
72. Kamysz W, Silvestri C, Cirioni C, Giacometti A, Licci A, Vittoria AD, Okroj M, Scalise G. In vitro activity of lipopeptides Pal-Lys-Lys-NH₂ and Pal-Lys-Lys alone and in combination with antimicrobial agents against multiresistant Grampositive cocci. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(1): 354-358.
73. Kantarcioğlu AS, Gulenc M, Yücel A, Uzun N, Taskin T, Sakiz D, Altas K. Cryptococcal parotid involvement: an uncommon localization of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* 2006, 44(3):279-283.
74. Bernabé DG, Veronese LA, Miyahara GI, Biasoli ER, Moraes NP. Cryptococcosis parotid diagnosed by FNAC in a non-immunosuppressed patient. *Cytopathology* 2010, 21(5): 343-345.
75. Lynch DP, Naftolin LZ. Oral *Cryptococcus neoformans* infection in AIDS. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1987, 64(4): 449-453.
76. Perfect JR, Cox GM. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resist Update* 1999, 2: 259–269.
77. Rex JH, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin. Infect. Dis.* 2002, 35: 982–989.

78. Passariello C, Puttini M, Iebba V, Pera P, Gigola P. Influence of oral conditions on colonization by highly toxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Oral Dis.* 2012, 18(4): 402-409.
79. Marrelli M, Tatullo M, Dipalma G, Inchingolo F. Oral infection by *Staphylococcus aureus* in patients affected by White Sponge Nevus: a description of two cases occurred in the same family. *Int. J. Med. Sci.* 2012, 9(1): 47-50.
80. Cuesta AI, Jewtuchowicz VM, Brusca MI, Mujica MT, Rosa AC. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates in oral mucosa and pockets of patients with gingivitis-periodontitis. *Acta Odontol. Latinoam.* 2011, 24(1): 35-40.
81. Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. *J. Biol. Chem.* 2006, 281: 1636–1643.
82. Podlodowska J, Szumiło J, Podlodowski W, Starosławska E, Burdan F. Epidemiology and risk factors of the oral carcinoma. *Pol. Merkur. Lekarski* 2012,32(188): 135-137.
83. Jimi E, Furuta H, Matsuo K, Tominaga K, Takahashi T, Nakanishi O. The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2011, 17(5):462-468.

Elzbieta Kamysz