

Wydział Farmaceutyczny



**Badanie krótkich lipopeptydów pod kątem ich potencjalnego  
zastosowania w profilaktyce i zwalczaniu infekcji oka  
związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych**

Magdalena Maciejewska

Praca doktorska wykonana  
w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik Katedry i Zakładu  
Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Kamysz

*Promotor*  
*Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Kamysz*

*Promotor pomocniczy*  
*Dr n. farm. Małgorzata Paduszyńska*

Gdańsk 2020

## Spis treści

Wykaz skrótów i symboli stosowanych w pracy .....	5
I. Część teoretyczna .....	9
1. Budowa i funkcje oka .....	9
1.1. Aparat ochronny oka i immunologia powierzchni oka.....	9
1.1.1. Funkcja filmu łzowego .....	11
1.1.2. Komponenty przeciwbakteryjne filmu łzowego .....	13
1.1.3. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe powierzchni gałki ocznej.....	15
2. Soczewki kontaktowe .....	17
2.1. Rodzaje i kwalifikacja soczewek kontaktowych.....	17
2.2. Wpływ soczewek na film łzowy i płyny pielęgnacyjne.....	18
2.3. Choroby oka związane z użytkowaniem soczewek kontaktowych.....	20
2.3.1. Choroby zapalne spojówki.....	20
2.3.1.1. Zespół czerwonego oka związany z soczewkami kontaktowymi - CLARE.....	21
2.3.1.2. Zapalenie spojówek na skutek nieprawidłowości filmu łzowego – Zespół Suchego Oka (ZSO).....	21
2.3.1.3. Alergiczne spojówek wywołane soczewkami kontaktowymi.....	21
2.3.1.4. Brodawkowe zapalenie spojówki wywołane soczewkami kontaktowymi- CLPC .....	22
2.3.1.5. Zapalenie spojówek wywołane zakażeniami bakteryjnymi .....	22
2.3.2. Infekcje rogówki.....	23
2.3.2.1. Owrzodzenie części obwodowej rogówki związane ze stosowaniem soczewek kontaktowych - CLPU.....	23
2.3.2.2. Bakteryjne zapalenie rogówki .....	24
2.4. Profilaktyka i terapia infekcji odsoczewkowych.....	25
2.4.1. Antybiotykoterapia konwencjonalna.....	25
3. Biofilm bakteryjny .....	27
3.1. Etapy powstawania biofilmu.....	27
3.2. Odporność biofilmu na związki przeciwdrobnoustrojowe. Infekcje okulistyczne związane z biofilmem.....	29
4. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe jako alternatywa konwencjonalnej terapii i profilaktyki infekcji związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych .....	31
4.1. Klasyfikacja naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych.....	31
4.1.1. Bakteriocyny – peptydy przeciwdrobnoustrojowe bakterii.....	32
4.1.2. Endogenne peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs, antimicrobial peptides).....	33
4.1.2.1. Peptydy owadzie .....	34
4.1.2.2. Peptydy wydzielane przez płazy.....	34
4.1.2.3. Peptydy wytwarzane przez ssaki .....	35
4.2. Mechanizm działania endogennych peptydów przeciwdrobnoustrojowych .....	39

4.3.	Aktywność peptydów w stosunku do biofilmu .....	41
4.4.	Peptydy syntetyczne projektowane na podstawie AMPs.....	43
4.4.1.	Analogi natywnych AMPs .....	44
4.4.2.	Peptydomimetyki.....	46
4.4.3.	Krótkie lipopeptydy .....	46
II.	Cel pracy.....	50
III.	Część doświadczalna .....	51
1.	Materiały i metody.....	51
1.1.	Odczynniki i materiały .....	51
1.2.	Aparatura .....	52
1.3.	Szczepy referencyjne i warunki hodowli komórkowej.....	54
1.4.	Referencyjne związki przeciwdrobnoustrojowe.....	55
1.5.	Soczewki kontaktowe i płyny do soczewek .....	55
2.	Synteza i oczyszczanie peptydów.....	56
3.	Ocena aktywności krótkich lipopeptydów oraz związków odniesienia wobec szczepów odpowiedzialnych za infekcje oka .....	60
3.1.	Aktywność wobec komórek wolnopływających - minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC).....	60
3.2.	Aktywność wobec biofilmu bakteryjnego - minimalne stężenie eliminujące biofilm (MBEC).....	62
3.2.1.	MBEC związków wobec biofilmu wytworzonego na płytkach polistyrenowych .....	62
3.2.2.	MBEC związków wobec biofilmu wytworzonego na powierzchni soczewek kontaktowych .....	63
3.3.	Wpływ związków na proces formowania się biofilmu bakteryjnego - minimalne stężenie hamujące rozwój biofilmu (MBFIC) .....	64
3.3.1.	MBFIC oznaczone na powierzchni polistyrenowej .....	64
3.3.2.	MBFIC oznaczone na powierzchni soczewek kontaktowych .....	66
4.	Ocena aktywności cytotoksycznej badanych związków wobec ludzkich keratynocytów.....	67
5.	Ocena aktywności metabolicznej biofilmu wytworzonego na powierzchni polistyrenowej po ekspozycji na (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -K <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> , chloramfenikol i cyprofloksacynę.....	69
6.	Ocena aktywności metabolicznej biofilmu wytworzonego na powierzchni polistyrenowej po ekspozycji na (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -K <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> , chloramfenikol i cyprofloksacynę oraz ich usunięciu z pożywki.....	71
7.	Ocena aktywności metabolicznej biofilmu wytworzonego na soczewkach kontaktowych poddanego ekspozycji na (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -K <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> .....	78
8.	Oznaczenie antybiofilmowej aktywności (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -K <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> stosowanego w połączeniu z dostępnymi na rynku płynami do soczewek .....	79
8.1.	Aktywność płynów do soczewek suplementowanych (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> - K <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> wobec biofilmu na powierzchni polistyrenowej .....	79
8.2.	Aktywność (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -K <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> , płynów do soczewek oraz ich kombinacji wobec biofilmu utworzonego na soczewkach kontaktowych .....	81
9.	Ocena potencjału drażniącego oka .....	83

IV Omówienie wyników i dyskusja .....	84
1. Aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz związków konwencjonalnych wobec komórek wolnopływających szczepów odpowiedzialnych za infekcje oka .....	84
2. Aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz związków konwencjonalnych wobec biofilmu bakteryjnego .....	90
2.1. MBEC związków wobec biofilmu wytworzonego na płytkach polistyrenowych .....	90
2.2. MBEC związków wobec biofilmu wytworzonego na soczewkach kontaktowych .....	95
3. Oznaczenia wpływu badanych związków na formowanie się biofilmów bakteryjnych na powierzchni polistyrenowej oraz soczewek kontaktowych (MBFIC) .....	99
4. Ocena aktywności cytotoksycznej badanych związków wobec ludzkich keratynocytów .....	106
5. Oznaczenie aktywności (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub> i związków konwencjonalnych wobec biofilmu wytworzonego na powierzchni polistyrenowej .....	112
6. Oznaczenie aktywności (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub> i dostępnych na rynku płynów do soczewek oraz ich połączeń w stosunku do biofilmu bakteryjnego .....	117
6.1. Biofilmy formowane na powierzchniach polistyrenowych .....	117
6.2. Biofilmy formowane na powierzchni soczewek kontaktowych .....	118
7. Ocena potencjału drażniącego oka .....	122
V. Podsumowanie i wnioski .....	124
VI. Streszczenie .....	128
VII. Summary .....	131
VIII. Literatura .....	134
VIII. Suplement .....	152

## WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI STOSOWANYCH W PRACY

ACN	acetonitryl
AMPs	(ang. Antimicrobial peptides) – peptydy przeciwdrobnoustrojowe
APCs	(ang. antigen presenting cells) – komórki prezentujące antygen
ATCC	American Type Culture Collection
Boc	(ang. <i>tert</i> -butyloxycarbonyl) – grupa <i>tert</i> -butyloksykarbonylowa
tBu	grupa <i>tert</i> -butylowa
CALT	(ang. conjunctiva-associated lymphoid tissue) – tkanka limfatyczna worka spojówkowego i gruczołu łzowego
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLARE	(ang. contact lens-induced acute red eye) – zespół czerwonego oka związanego z soczewkami kontaktowymi
CLPC	(ang. contact lens papillary conjunctivitis) – brodawkowe zapalenie spojówki wywołane soczewkami kontaktowymi
CLPU	(ang. contact lens peripheral ulcer) – owrzodzenie części obwodowej wywołane przez soczewkę kontaktową
CVC	(ang. central venous catheter) – centralny cewnik żylny
DC	Komórki dendrytyczne
DCM	(ang. dichloromethane) – dichlorometan; odczynnik do syntezy
DIC	(ang. <i>N,N</i> -diisopropylcarbodiimide) – <i>N,N</i> -diizopropylkarbodiimid; odczynnik do syntezy
DMF	(ang. <i>N,N</i> -dimethylformamid) – <i>N,N</i> -dimetyloformamid; odczynnik do syntezy
EALT	(ang. Eye associated lymphoid tissue) – tkanka limfatyczna oka
DMSO	(ang. dimethyl sulfoxide) – dimetylosulfotlenek; odczynnik do syntezy
EC	<i>Escherichia coli</i>
ECB	(ang. European Chemicals Bureau) – Europejskie Biuro Chemiczne
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EPS	(ang. Extracellular polymeric substance) – polisacharydowa substancja zewnątrzkomórkowa
FDA	(ang. Food and Drug Administration) – Agencja Żywności i Leków,
Fmoc	(ang. Fluorenylmethyloxycarbonyl) – osłona 9-fluorenylometoksykarbonylowa
GRAS	(ang. Generally Recognized as Safe) – ogólnie uznany za bezpieczny
hBD	(ang. human $\beta$ Defensins) – ludzkie $\beta$ defensyny
HD	(ang. Human Defensins) – ludzkie defensyny
HDPs	(ang. Host-defence peptide) – peptydy odpornościowe
HEMA	metakrylan 2-hydroksyetylu
HNP	(ang. Human Neutrophil Peptide) – ludzkie białka neutrofilowe
HPLC	(ang. High-Performance Liquid Chromatography) – wysokosprawna chromatografia cieczowa
IL	interleukina

INF	interferon
LDALT	(ang. Lacrimal drainage-associated lymphoid tissue) – tkanka limfatyczna woreczka łzowego i przewodu nosowo-łzowego
LPS	(ang. Lipopolysaccharide) – lipopolisacharyd
MALDI-TOF	(ang. Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of flight detection) – desorpcja laserowa z udziałem matrycy z analizatorem czasu przelotu
MBEC	(ang. Minimal Biofilm Eradication Concentration) – minimalne stężenie eliminujące biofilm
MBFIC	(ang. Minimal Biofilm Formation Inhibitory Concentration) – minimalne stężenie hamujące biofilm
MIC	(ang. Minimum Inhibitory Concentration) – minimalne stężenie hamujące wzrost
MK	(ang. Microbial Keratitis) – zapalenie rogówki
MPS	(ang. Multipurpose Contact Lens Solutions)
MUC	mucyna
NAG	n-acetyloglukozoamina
NAM	kwasy N-acetylmuraminowe
OtBu	grupa O- <i>tert</i> -butylowa
Oxymopure	(ang. Ethyl cyano(hydroxyimino)acetale) – środek antyracemizacyjny
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	(ang. pathogen-associated molecular patterns) – wzorce molekularne związane z patogenami
Pbf	grupa 2,2,4,6,7-pentametylodihydrobenzenofuran-5-sulfonylowa
PBS	(ang. phosphate-buffered saline) – bufor fosforanowy
PEG	(ang. polyethylene glycol) – (poli)glikol etylenowy
PM	<i>Proteus mirabilis</i>
PPR	(ang. pattern-related receptors) – receptory rozpoznające wzorce
ppGpp	czterofosforan guanozyny
PS	polistyren
sPLA <sub>2</sub>	(ang. secretory phospholipase A <sub>2</sub> ) – wydzielnicza fosfolipaza A <sub>2</sub>
QS	(ang. quorum sensing) – mechanizm regulujący
QSAR	(ang. quantitative structure-activity relationship) – badania ilościowe zależności między strukturą chemiczną związku, a jego działaniem
QSTR	(ang. quantitative structure-toxicity relationship) – badania ilościowe zależności między strukturą związku, a toksycznością
RGP	(ang. rigid gas permeable) – soczewki twarde
RP-HPLC	(ang. Reversed-Phase High-Performance) – wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SK	soczewki kontaktowe

SLPI	(ang. Secretory leukocyte protease inhibitor) – wydzielniczy inhibitor proteaz leukocytarnych
SPPS	(ang. Solid-phase peptide synthesis) - synteza peptydów na stałym nośniku polimerowym
SP	(ang. Surfactant protein) – białka surfaktantu
TFA	(ang. Trifluoroacetic acid) – kwas trifluorooctowy
TIS	(ang. Triisopropylsilane) – triizopropylosilan
TLR	(ang. Toll like receptors) – receptory Toll-podobne
TNF- $\alpha$	(ang. tumor necrosis factor $\alpha$ ) – czynnik martwicy nowotworów
Trt	grupa trifenyloetylowa (trytylowa)
TTC	(ang. threshold of toxicological concern) – próg zagrożenia toksykologicznego
USDA	(ang. United States Department of Agriculture) – Departament Rolnictwa USA
WHO	(ang. World Health Organization) – Światowa Organizacja Zdrowia
ZSO	Zespół suchego oka
ZUM	Zakażenia układu moczowego

**SYMBOLE AMINOKWASÓW WYKORZYSTANYCH DO SYNTEZY  
PEPTYDÓW**

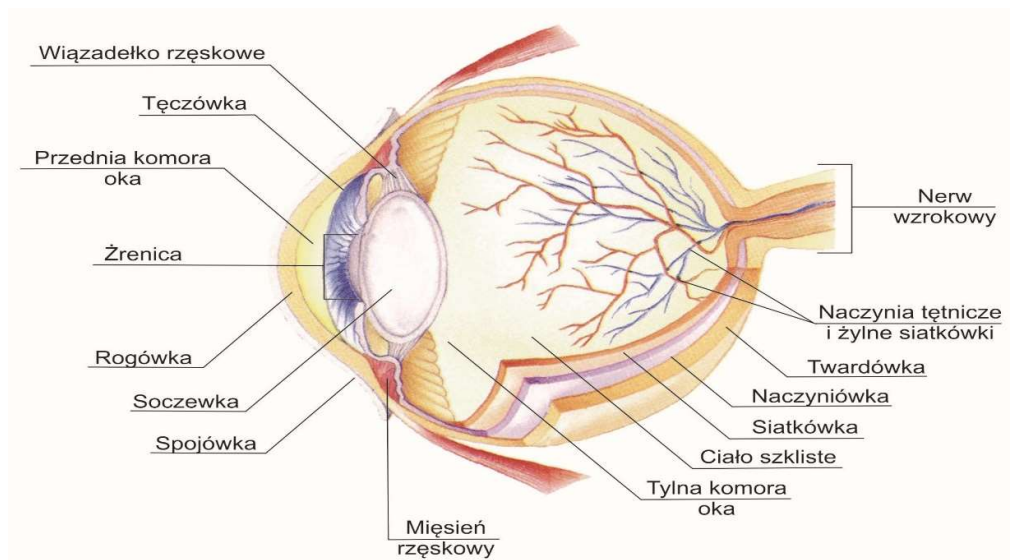
Nazwa	Skrót trzyliterowy	Skrót jednoliterowy
Alanina	Ala	A
Cysteina	Cys	C
Kwas asparaginowy	Asp	D
Fenylalanina	Phe	F
Glicyna	Gly	G
Izoleucyna	Ile	I
Lizyna	Lys	K
Leucyna	Leu	L
Prolina	Pro	P
Arginina	Arg	R
Seryna	Ser	S
Walina	Val	V



# I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

## 1. BUDOWA I FUNKCJE OKA

Oko (*łac. oculus*) to biologiczno-optyczny organ odbierający wrażenia wzrokowe ze środowiska. Jest on nieustannie narażony na działanie szkodliwych czynników zewnętrznych, co niesie za sobą ryzyko rozwoju schorzeń okulistycznych. Narząd wzroku mieści się w jamie oczodołu i składa się z oka oraz narządów dodatkowych. Składa się z gałki ocznej oraz łączącego ją z mózgiem nerwu wzrokowego. Do narządów dodatkowych oka zalicza się mięśnie gałki ocznej stanowiące jego aparat ruchowy oraz narządy spełniające rolę aparatu ochronnego, na który składają się powiezie oczodołu, powieki, spojówka i narząd łzowy [1]. Na rycinie 1 przedstawiono schemat budowy oka.



Rycina 1. Schemat budowy gałki ocznej.

### 1.1. Aparat ochronny oka i immunologia powierzchni oka

Układ odpornościowy narządu wzroku jest wypadkową odporności wrodzonej (nieswoistej) oraz odporności nabytej (swoistej).

Pierwszą fizyczną barierę dla czynników zewnętrznych stanowią powieki, które bezpośrednio osłaniają przedni odcinek oka przed środowiskiem zewnętrznym chroniąc przed wysychaniem, urazami mechanicznymi i inwazją mikroorganizmów. Poprzez odruchowe mruganie powiek rozprowadzany jest film łzowy, stanowiący warstwę ochronną oraz zapewniający stałe nawilżenie gałki ocznej [2].

Kolejnym istotnym elementem ochronnym oka jest rogówka (*łac. cornea*), która nadaje kształt gałce ocznej i jest pierwszym elementem układu optycznego oka.

Kluczową rolę w układzie odpornościowym oka stanowi spojówka (*łac. tunica conjunctiva*). Jest to delikatna błona śluzowa, wyścielająca tylną powierzchnię powiek i przednią powierzchnię gałki ocznej. Spojówka zawiera komórki kubkowe produkujące śluz (mucyny), który jest jednym z elementów filmu łzowego [1]. Nabłonek spojówki zawiera rozpuszczalne przeciwciała sIgA, które ograniczają adhezję mikroorganizmów. Układ odpornościowy spojówki opiera się na receptorach rozpoznających wzorce (PRRs - *pattern-related receptors*), które bezpośrednio rozpoznają antygeny PAMP (*patogen-associated molecular patterns*) oraz antygeny powstałe na skutek rozpadu komórek. W system ten zaangażowane są także endogenne peptydy przeciwdrobnoustrojowe o niespecyficznym mechanizmie działania.

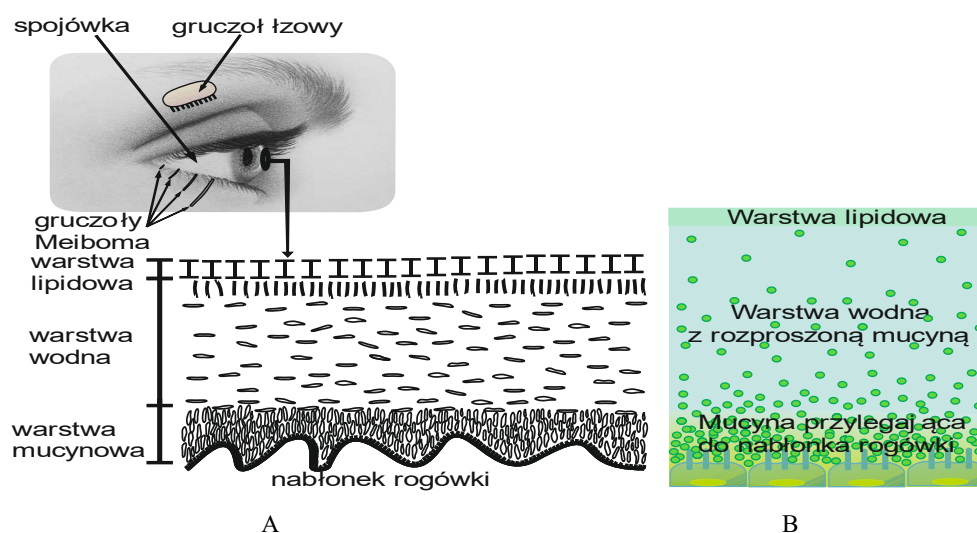
Oko posiada własną tkankę limfatyczną EALT (z ang. *eye associated lymphoid tissue*) na którą składa się tkanka limfatyczna całego systemu łzowego: tkanka limfatyczna worka spojówkowego i gruczołu łzowego - CALT (z ang. *conjunctiva-associated lymphoid tissue*) oraz tkanka limfatyczna obejmująca woreczek łzowy i przewód nosowo-łzowy LDALT (z ang. *lacrimal drainage-associated lymphoid tissue*). Reprezentują ją komórki prezentujące antygen (APCs - *antigen presenting cells*), do których należą komórki Langerhansa, makrofagi oraz komórki dendrytyczne (Dendritic cells - DCs) [3]. APCs rozpoznają i selektywnie łączą się z charakterystycznymi markerami dla danego patogenu i następnie prezentują ją limfocytom obecnym w lokalnych guzkach chłonnych, indukując odpowiedź immunologiczną [4]. Należy zwrócić uwagę, że centralna część rogówki pozbawiona jest komórek APC. Podczas trwania procesu zapalnego komórki nabłonkowe rogówki produkują IL-1, która stymuluje interakcje pomiędzy dwiema populacjami limfocytów. W wyniku dwukierunkowego oddziaływania, limfocyty B prezentują antygen limfocytom T oraz otrzymują od nich sygnał do proliferacji i różnicowania. Skutkiem aktywacji tej kaskady reakcji jest infiltracja obwodowej części rogówki przez APCs, które przenikają do centralnej części rogówki [5].

Antygeny są rozpoznawane przez receptory TLR (Toll-like receptors), które w warunkach fizjologicznych występują w różnych formach (TLR1, 2, 3, 5 i 6) w nabłonku spojówki i komórkach rąbkowych rogówki. W wyniku związania ligandu dochodzi do stymulacji kaskady prozapalnych cytokin tj: IL-6, INF-gamma, TNF- $\alpha$ . Związki te aktywują następnie produkcję chemokin, molekuł adhezyjnych i indukują

syntezę peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Część z nich np.  $\beta$ -defensyny 1 i 3 (hBD-1 i hBD-3) są stale produkowane przez nabłonek spojówki, natomiast ekspresja innych np. LL-37 i hBD-2 jest indukowana w warunkach zapalenia [6].

### 1.1.1. Funkcja filmu łzowego

Film łzowy produkowany jest w gruczołach łzowych i równomiernie rozprowadzany po powierzchni gałki ocznej poprzez stałe, bezwiedne ruchy powiek. Ściśle przylegając do powierzchni gałki ocznej, nawilża ją, wypłukuje zanieczyszczenia (drobnoustroje, kurz, pył) oraz zaopatruje powierzchnię oka w związki przeciwdrobnoustrojowe. Wygładza nierówności nabłonka rogówki, tworząc gładką powierzchnię optyczną. Wykazując wysoką zdolność do załamывania kąta promieni świetlnych film łzowy wpływa pośrednio na jakość procesu widzenia. Niedostateczna jakość lub ubytek w grubości filmu łzowego objawia się poczuciem dyskomfortu i skutkuje pogorszeniem ostrości widzenia. Niedostateczne wydzielanie łez lub/i nieprawidłowy skład filmu łzowego składają się na Zespół Suchego Oka (ZSO) i często są powiązane z zapaleniem rogówki [2, 7]. Film łzowy pełni także niezwykle istotną funkcję metaboliczną - odżywia i dostarcza tlen do pozbawionej naczyń krwionośnych rogówki. Ponadto, za pośrednictwem filmu łzowego usuwane są produkty przemiany materii (dwutlenek węgla) [7].



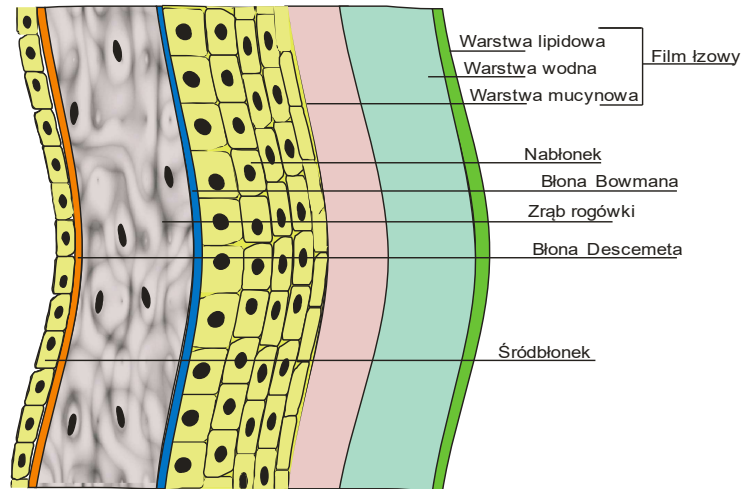
**Rycina 2.** Trójwarstwowa struktura filmu łzowego. A) Klasyczny model wg Wolffa (1946), B) Nowy model budowy ze zmniejszającym się ku warstwie lipidowej stężeniem mucyn rozpuszczonych w wodzie [8].

Kluczową rolę dla prawidłowego i komfortowego widzenia odgrywa struktura filmu łzowego, która została przedstawiona na rycinie 2. Zgodnie z klasycznym modelem wg Wolffa, przedstawionym na rycinie 2.A wyróżnia się trzy warstwy filmu: zewnętrzną warstwę lipidową, warstwę wodną i warstwę mucynową, bezpośrednio związaną z nabłonkiem rogówki. Ostatnie badania potwierdziły, że warstwy filmu przenikają się wzajemnie i nie da się ich precyzyjnie wyodrębnić (Rycina 2.B) [8].

Zewnętrzną warstwę lipidową (0.1  $\mu\text{m}$ ) stanowią estry, trójglicerydy oraz wolne kwasy tłuszczowe, wydzielane przez gruczoły Meiboma i gruczoły Zeissa. Powłoka tłuszczowa zapewnia stabilność filmu łzowego. Pod względem ilościowym, główną składową filmu jest środkowa warstwa wodna (7  $\mu\text{m}$ ) obejmująca 98% jego grubości. Tworzy ją rozcieńczony wodny roztwór elektrolitów oraz substancji organicznych takich jak rozpuszczalne mucyny, enzymy i białka. Warstwa wodna nawilża nabłonek rogówki, dostarcza do niego tlen oraz pełni funkcje dezynfekcyjne dzięki zawartości związków o działaniu przeciwbakteryjnym: lizozymu, laktoferyny, defensyny, wydzielniczych immunoglobulin IgA i składników dopełniacza. Źródłem komponentu białkowego łez jest główny gruczoł łzowy, a także komórki nabłonka rogówki i spojówki, wysięk surowiczy oraz neutrofile [9].

Wewnętrzna warstwa mucynowa (0,02-0,04  $\mu\text{m}$ ) stanowi komponent śluzowy i chroni powierzchnię oka przed wysychaniem i patogenami. Warstwa śluzowa składa się z mucyn związanych z błoną komórkową (MUC1, MUC4, MUC16), oraz mucyn wolno występujących (MUC2, MUC5AC, MUC19), które wiążą patogeny bezpośrednio w filmie łzowym i umożliwiają ich wypłukiwanie [10]. Mucyny produkowane i wydzielane są konstytutywnie przez komórki kubkowe spojówki oraz komórki nabłonka rogówki (Rycina 3). W stanach zapalnych ich produkcja jest indukowana przez cytokiny prozapalne: IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  oraz poprzez stymulację receptorów TLR nabłonka rogówki.

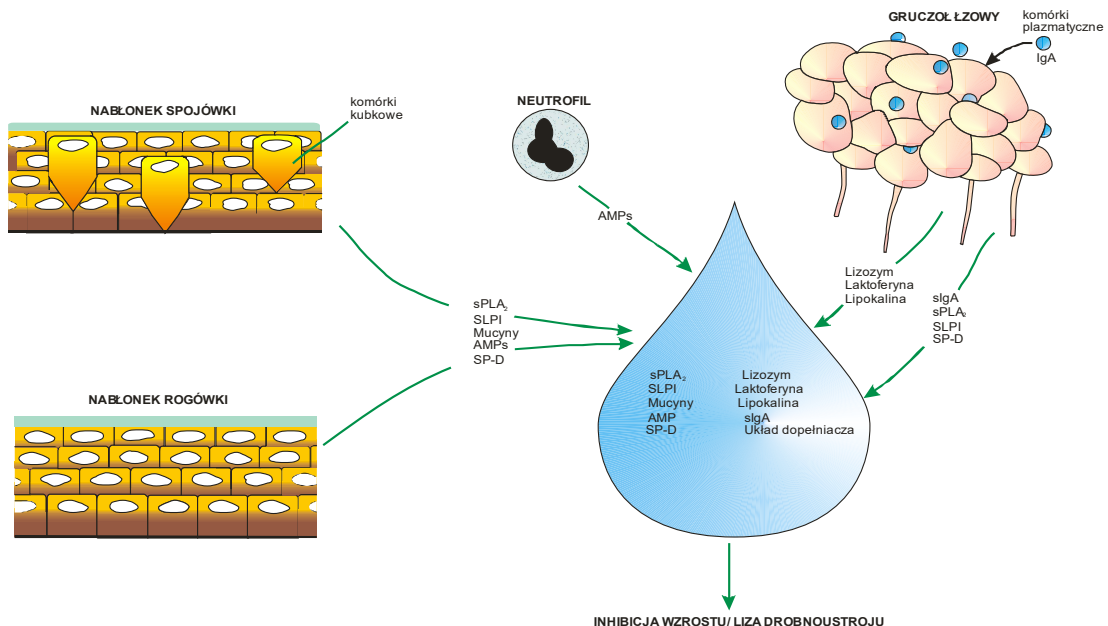
Specyficzny skład chemiczny filmu łzowego warunkuje jego działanie antybakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe.



Rycina 3. Przekrój rogówki oka w centralnej części [1].

### 1.1.2. Komponenty przeciwbakteryjne filmu łzowego

Film łzowy zawiera ok. 500 różnych białek, część z nich wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową. Tylko cztery białka o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych występują w istotnie dużym stężeniu: lizozym (2,07g/l), wydzielnicze immunoglobuliny A (sIgA- 3,69 g/l), laktoferyna (1,65 g/l) oraz lipokalina (1,55 g/l) [11]. Związki te wytwarzane są w gruczołach łzowych i wydzielane są do filmu łzowego (Rycina 4).



Rycina 4. Komponenty przeciwdrobnoustrojowe filmu łzowego [11].

Lizozym jest jednym z najlepiej zbadanych enzymów hydrolitycznych, jego właściwości przeciwbakteryjne zostały opisane już w 1922 przez Alexandra Flemminga [12]. Lizozym stanowi ok. 20-30% komponentu białkowego łez [9]. Znajduje się w ziarnistościach granulocytów, monocytów i makrofagów. Jako naturalny element nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, działa litycznie wobec ściany komórkowej bakterii. Działanie lizozymu opiera się na hydrolizie wiązań  $\beta$ -1,4glikozydowych pomiędzy cząsteczkami kwasu acetylmuraminowego (NAM), a N-acetyloglukozoaminą (NAG) peptydoglikanu [13]. Wykazuje aktywność bakteriobójczą głównie wobec bakterii Gram-dodatnich w tym wobec *Streptococcus sp.* i *Staphylococcus sp.* odpowiedzialnych za zapalenie spojówek.

Laktoferyna jest endogennym białkiem o właściwościach przeciwbakteryjnych wchodzącym w skład płynów biologicznych ssaków, zwłaszcza mleka, śliny i filmu łzowego [14]. Dodatnio naładowany N-końcowy fragment białka umożliwia laktoferynie interakcje z ujemnie naładowanymi błonami komórkowymi bakterii, grzybów i wirusów, hamując ich rozwój [15]. Poprzez wiązanie z błoną komórkową wykazuje aktywność wobec szczepów *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* oraz *Pseudomonas sp.* Laktoferyna poprzez odwracalne łączenie się z jonami żelaza, zapobiega wykorzystaniu ich jako czynnika wzrostowego przez bakterie. Działając w sposób synergistyczny z lizozymem wykazuje aktywność bakteriobójczą wobec *Staphylococcus epidermidis* (SE) [16].

Lipokalina podobnie jak laktoferyna prezentuje działanie bakteriostatyczne poprzez blokowanie drobnoustrojom dostępu do jonów żelaza [17, 18]. Wykazując silne powinowactwo do wiązania kwasów tłuszczowych w filmie łzowym, zapobiega inaktywacji lizozymu [19]. W sposób pośredni wspomaga więc przeciwbakteryjne działanie filmu łzowego i przyczynia się do utrzymania właściwego napięcia powierzchniowego łez [20].

Przeciwciała IgA wydzielnicze pełnią funkcje ochronne, zapobiegając adhezji drobnoustrojów do powierzchni gałki ocznej. Wykazano, że wpływają chemotaktycznie wobec neutrofilii fagocytarnych, a także zapobiegają wiązaniu *Pseudomonas aeruginosa* i *Acanthamoeba polyphaga* do powierzchni soczewek kontaktowych [21, 22].

Wydzielnicza fosfolipaza A2 (sPLA<sub>2</sub>), produkowana przez nabłonek spojówki, rogówki i gruczoł łzowy, jest aktywna wobec bakterii Gram-dodatnich. W warunkach fizjologicznych nie wykazuje aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych [23]. Dzięki

kationowej strukturze, łatwo wiąże się z ujemnie naładowanymi błonami komórkowymi bakterii i hydrolizuje fosfolipidy błonowe, w szczególności fosfatydyloglicerol [24, 25].

Innym przeciwdrobnoustrojowym białkiem, wytwarzanym przez nabłonki spojówki, rogówki oraz gruczoł łzowy, jest wydzielniczy inhibitor proteaz leukocytarnych SLPI (*Secretory leukocyte protease inhibitor*). SLPI hamując aktywność proteaz, w tym elastazy neutrofilii, chroni powierzchnię oka przed degradacyjnym działaniem tych enzymów. Potwierdzone zostały również jego właściwości przeciwzapalne i przeciwdrobnoustrojowe, zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, grzybów, a także wirusa HIV [26].

Płyn łzowy zawiera także specyficzne białka surfaktantu SP (*Surfactant protein*) należące do rodziny kolektyn, białka SP-A i SP-D [27]. Zarówno SP-A i SP-D wytwarzane są przez gruczoł łzowy oraz nabłonek spojówki i rogówki [28]. Wykazują zdolność wiązania patogenów w obecności neutrofilii oraz modulacji odpowiedzi komórkowej gospodarza. Wiążą się z węglowodanami na powierzchni drobnoustrojów i receptorami na komórkach fagocytujących. *In vivo* potwierdzono aktywność SP-D wobec *P.aeruginosa* w nabłonku rogówki [29-31].

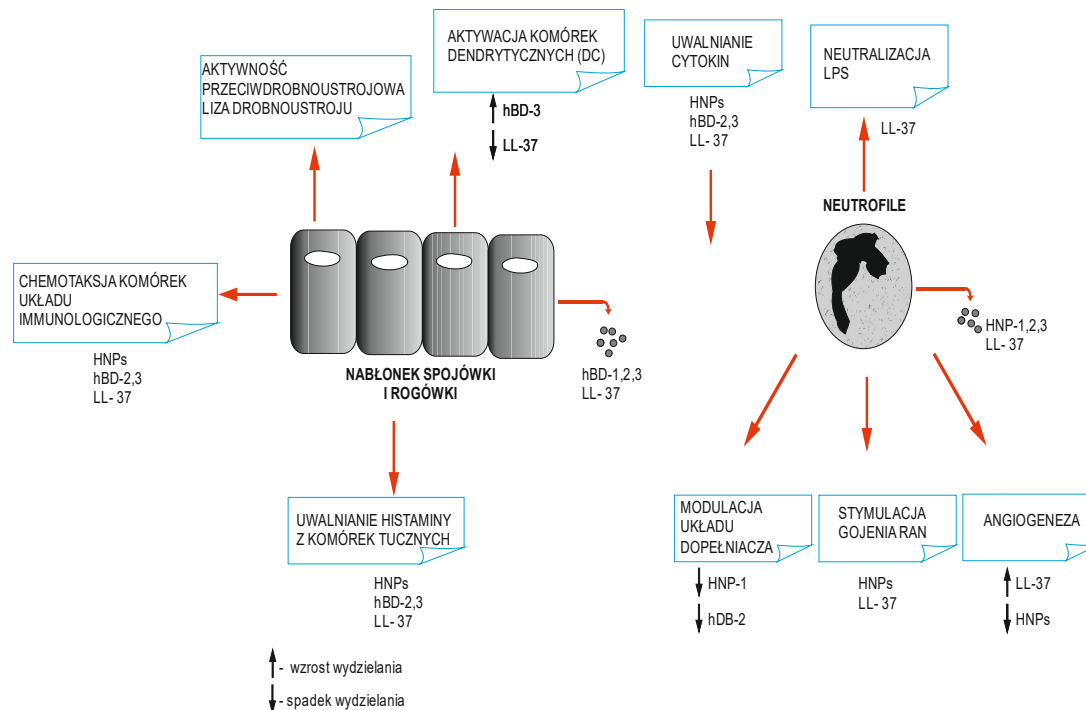
Liczne badania wskazują na znaczącą rolę ochronnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych AMPs – HDPs (ang. *Host-defence peptide*) wchodzących w skład filmu łzowego. Wytwarzane są przez główny i/lub dodatkowe gruczoły łzowe oraz przez komórki nabłonkowe rogówki i spojówki. Źródłem tych związków są również neutrofile naturalnie występujące w niewielkiej ilości w filmie łzowym, szczególnie w warunkach otwartej powieki [32].

### 1.1.3 Peptydy przeciwdrobnoustrojowe powierzchni gałki ocznej

Naturalnie występującymi peptydami przeciwdrobnoustrojowymi AMPs na powierzchni oka są ludzka katelicydyna LL-37 oraz  $\alpha$ -defensyny i  $\beta$ -defensyny (hBD) [6, 13]. AMPs wydzielane są do płynu łzowego, stanowiąc istotny mechanizm wrodzonej odporności wobec szerokiego spektrum drobnoustrojów. Rogówka i nabłonek spojówki wytwarzają  $\beta$ -defensyny i katelicydynę LL-37, a także RNazę-7 i psoriazynę [33]. W warunkach fizjologicznych, film łzowy zawiera niewielką ilość  $\alpha$ -defensyn HNP-1,-2,-3. Stwierdzono, że ich wydzielanie do filmu łzowego przez neutrofile znacząco nasila się po operacjach okulistycznych przedniego segmentu oka [34, 35]. Podobne wyniki otrzymano w przypadku hBD-2 i hBD-3 [36]. W odpowiedzi na stan zapalny neutrofile zaopatrują film łzowy w dodatkową ilość

LL-37 oraz  $\alpha$ -defensyn [37]. Wyniki badań *in vitro* sugerują, że LL-37 i ludzka  $\beta$ -defensyna-3 wykazują niezależną aktywność przeciwbakteryjną. Pozostałe defensyny działają synergistycznie, wzmacniając ochronę powierzchni oka przed inwazją patogenów modulując reakcje układu odpornościowego oraz stymulując proces gojenia się ran. Na rycinie 5 przedstawiono podstawowe funkcje peptydów przeciwdrobnoustrojowych istotne dla układu immunologicznego oka.

Oprócz najlepiej poznanych, opisanych powyżej peptydów: katelicydyny LL-37 oraz defensyn, na powierzchni oka zidentyfikowano inne związki peptydowe o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Psoriazyna (S100A7) jest peptydem wrodzonej odporności wytwarzanym konstytutywnie przez komórki nabłonkowe spojówki, rogówki, a także gruczoł łzowy. Wydzielana do filmu łzowego, prezentuje silną aktywność wobec *Escherichia coli* (EC), a jej produkcja jest stymulowana obecnością cytokiny IL-1 $\beta$  [38]. W takich samych warunkach do filmu łzowego wydzielana jest RNaza-7, produkowana przez nabłonek rogówki i spojówki [39]. W płynie łzowym stwierdzono również obecność innych AMP, dermicydyny [40] oraz przeciwgrzybiczej histatyny 5 [41].



Rycina 5. Schemat przedstawiający funkcje peptydów przeciwdrobnoustrojowych oka.



## 2. SOCZEWKI KONTAKTOWE

Soczewki kontaktowe są stosowane przez miliony ludzi na całym świecie. Aplikowane bezpośrednio na gałkę oczną stanowią dokładną i komfortową metodę korekcji wad wzroku. Ponadto mogą być stosowane jako narzędzie terapeutyczne w przypadku trudno gojących się i nawracających ubytków nabłonka tworząc osłonę dla regenerującej się tkanki. Inne lecznicze zastosowania soczewek kontaktowych związane są m.in. z utrzymaniem ciągłości rogówki, ograniczeniem bólu poprzez ochronę odsłoniętych zakończeń nerwowych oraz zapewnieniem odpowiedniej podpory górnej powieki u pacjentów z miopatią. Hydrożelowe soczewki kontaktowe mogą być wykorzystywane jako matryca dla substancji leczniczej, która zapewnia jej przedłużone działanie [42]. Niestety soczewki kontaktowe jak każdy biomateriał są podatne na adhezję drobnoustrojów przez co ich noszenie zwiększa ryzyko rozwoju zakażeń w obrębie gałki ocznej. Według dostępnych danych od 30% do nawet 85% soczewek jest zanieczyszczonych mikrobiologicznie bez wywoływania objawów zakażenia podczas codziennego noszenia [43-45]. Przy zachowaniu odpowiednich zasad higieny i prawidłowej pielęgnacji oraz przestrzeganiu czasu i trybu noszenia soczewek kontaktowych, ryzyko zanieczyszczenia soczewek oraz możliwość rozwoju infekcji można ograniczyć do minimum. Właściwa pielęgnacja soczewek wymaga staranności ze względu na właściwości hydrofilne materiału żelowego soczewek miękkich, zdolności bakterii do przylegania do powierzchni soczewek oraz wnikania w ich porowatą strukturę. Odkładanie się osadów białkowych i tłuszczowych oraz substancji nieorganicznych na powierzchni soczewek może prowadzić do wzmożonej adhezji drobnoustrojów i zapoczątkowania formowania się biofilmu.

### 2.1. Rodzaje i kwalifikacja soczewek kontaktowych

Zasadniczym kryterium klasyfikacji soczewek kontaktowych jest elastyczność materiału z którego są wykonane. Soczewki dzielimy na na miękkie i twarde [7]. Soczewki twarde typu RGP (ang. *rigid gas permeable*) zbudowane są z gazorozpuszczalnych materiałów typu Polycon z dodatkiem silikonu lub fluoru. Obecnie ich stosowanie ogranicza się do leczenia wyjątkowych jednostek chorobowych np. w stożku rogówki zapewniając istotne zwiększenie dopływu tlenu do rogówki [7, 46]. Drugim typem soczewek są soczewki miękkie produkowane z wykorzystaniem

metakrylanu 2-hydroksyetylu (HEMA), które okazały się lepiej tolerowane i bezpieczniejsze w stosowaniu.

Ze względu na tryb noszenia soczewek wyróżnia się soczewki użytku dziennego (czas noszenia od 6-14h) oraz soczewki przedłużonego noszenia, przeznaczone do stosowania przez kilka do kilkunastu dni bez przerwy. Biorąc pod uwagę bezpieczeństwo stosowania, większą popularnością cieszą się soczewki użytku dziennego, które obejmują soczewki jednodniowe, dwutygodniowe i miesięczne. Ze względu na ryzyko powikłań okulistycznych odradza się stosowania soczewek kwartalnych lub rocznych.

Istotnym kryterium podziału soczewek jest także zawartość wody w materiale, z którego zostały wyprodukowane. Soczewka pozbawiona wody jest twarda i nieprzezroczysta. Wraz ze wzrostem uwodnienia materiału soczewka jest bardziej miękka i podatna na rozciąganie lub rozdarcie. Zmienia się także przepuszczalność i właściwości powierzchniowe materiału. Ze względu na stopień uwodnienia soczewki miękkie dzielimy na soczewki hydrożelowe i silikonowo-żelowe. Wysokouwodnione hydrożelowe soczewki charakteryzują się niższą odpornością na urazy mechaniczne [46, 47]. Modyfikacja hydrożelowej matrycy soczewek poprzez dodanie monomerów silikonowych pozwoliła uzyskać materiał mniej uwodniony lecz o zwiększonej przepuszczalności tlenu. W wyniku tego soczewka stała się bardziej sztywna, zmniejszając komfort noszenia i zwiększając ryzyko wystąpienia komplikacji m.in. brodawkowego zapalenia spojówek [7]. Kolejne modyfikacje soczewek silikonowo-hydrożelowych dotyczyły zwiększenia stopnia uwodnienia i gładkości powierzchni. Dzięki optymalizacji materiału silikonowo-hydrożelowego otrzymano soczewki III generacji o wysokiej przepuszczalności tlenu przy wysokim stopniu sprężystości, porównywalnym do hydrożeli, istotnie poprawiając komfort ich użytkowania [48].

## **2.2. Wpływ soczewek na film łzowy i płyny pielęgnacyjne**

Badania wśród użytkowników soczewek kontaktowych wykazały, że głównymi przyczynami zaprzestania ich stosowania są dyskomfort, objawy zespołu suchego oka (ZSO), stan zapalny, rozpoznanie infekcji lub problemy z widzeniem [49, 50]. Problemy te wynikają często z niewystarczającego stopnia nawilżenia lub stabilności filmu łzowego. Nałożona soczewka w krótkim czasie adsorbuje lub wiąże składowe filmu łzowego co prowadzi do zmiany jego struktury, składu i właściwości [51]. Zasadnicze

zmiany w strukturze filmu łzowego zachodzą w zewnętrznej warstwie lipidowej. Soczewka zanurzona w filmie łzowym powoduje spłaszczenie warstwy wodnej, utrudniając tym samym rozprządzenie lipidowej powłoki filmu łzowego podczas mrugania. Prowadzi to do nasilonego parowania łez z powierzchni oka i skrócenia czasu wysychania filmu łzowego [13, 52]. Stosowanie soczewek kontaktowych może skutkować wtórnym niedoborem wodnej składowej części filmu łzowego w wyniku niedostatecznego spoczynkowego wydzielania, prowadząc w następstwie do klinicznych objawów zespołu suchego oka i obniżenia ostrości widzenia [2, 53].

Wymaganą cechą dotyczącą wszystkich materiałów, które bezpośrednio kontaktują się z tkanką jest ich biokompatybilność. Biomateriały są nietoksyczne, immunobojętne i nie wywołują stanów zapalnych w otaczających tkankach. W przypadku soczewek kontaktowych niespełnienie tego kryterium może spowodować m.in. zwiększoną adsorpcję i absorpcję składników filmu łzowego. Należy uwzględnić także właściwości płynów pielęgnacyjnych i ich wpływ na soczewkę. Zadaniem płynów używanych do pielęgnacji soczewek kontaktowych jest obniżenie adhezji bakteryjnej na powierzchni soczewki oraz usunięcie z niej osadów oraz zanieczyszczeń. Po umieszczeniu soczewki na powierzchni oka, składowe płynu dyfundują z soczewki i są zastępowane przez białka i lipidy obecne w filmie łzowym. Interakcja pomiędzy powierzchnią soczewki kontaktowej, a składowymi filmu łzowego opiera się na niespecyficznych wiązaniach. Kluczową rolę w tej interakcji odgrywa materiał soczewki oraz osobniczy skład filmu łzowego. Wykazano, że hydrofilowe soczewki kontaktowe preferencyjnie adsorbują lizozym z płynu łzowego, podczas gdy hydrofobowe soczewki kontaktowe kumulują więcej lipokaliny i laktoferyny [54, 55]. Hydrofobowe obszary na soczewkach promują odkładanie się na ich powierzchni także wapnia i lipidów [56]. Osad pojawiający się na powierzchni soczewki w trakcie noszenia zaburza stabilność filmu łzowego oraz obniża aktywność biologiczną zawartych w nim białek, co zwiększa podatność na infekcje [13, 57, 58]. Różnice w proporcjach odkładanych składników zależą od właściwości biomateriałów. Soczewki na bazie silikonozeli wykazują zwiększone odkładanie składowych lipidowych [59], a konwencjonalne hydrożele adsorbują głównie białka (albuminy i lizozym) [60, 61]. Białka filmu łzowego wykazują zdolność do osadzania się na powierzchni miękkich soczewek kontaktowych już kilka godzin po aplikacji [62]. Skutkiem odkładania się depozytów białkowych jest osłabienie ostrości widzenia [63], zmniejszenie komfortu noszenia [64], dehydratacja soczewki [65] oraz zwiększone prawdopodobieństwo wystąpienia powikłań o charakterze zapalnym,

w tym zapalenia spojówki, ostrych infekcji w obrębie przedniego segmentu oka (brodawkowe zapalenie spojówek) [66, 67] oraz zespołu „czerwonego oka” związanego z soczewkami kontaktowymi – CLARE (z ang. *contact lens-related red eye*) [68]. Zwiększona kumulacja osadów lipidowych jest obserwowana u osób z dysfunkcją gruczołów Meiboma oraz w przypadku stosowania niewłaściwych kosmetyków pielęgnacyjnych [69]. Czynniki te istotnie ułatwiają przyleganie oraz rozwój bakterii na powierzchni soczewki kontaktowej [70].

Postępowanie w przypadku wystąpienia objawów niepożądanych obejmuje poprawę jakości filmu łzowego poprzez odpowiednio dobrany proces czyszczenia soczewek, zmianę kosmetyków pielęgnacyjnych, zwiększenie częstotliwości wymiany soczewek lub zmianę tworzywa soczewek [71].

### **2.3. Choroby oka związane z użytkowaniem soczewek kontaktowych**

Najczęściej występujące niepożądane objawy związane ze stosowaniem soczewek kontaktowych są spowodowane przez zaburzenia metaboliczne rogówki i spojówki, czynniki infekcyjne, schorzenia endogenne, wady samych soczewek kontaktowych, zaburzenia produkcji i wydzielania łez, urazy mechaniczne oraz reakcje alergiczne i działanie toksyczne składników konserwujących zawartych w płynach do pielęgnacji.

Infekcje oka o podłożu bakteryjnym są stosunkowo rzadkimi, ale poważnymi w skutkach powikłaniami stosowania soczewek kontaktowych. Czynnikiem wpływającym na zwiększenie ryzyka występowania zakażeń okulistycznych są głównie uszkodzenia nabłonka rogówki m.in. poprzez stosowanie soczewek kontaktowych, które zwiększają podatność wystąpienia bakteryjnych zakażeń gałki ocznej [72]. Zdecydowana większość infekcji wynika z niewłaściwego stosowania soczewek kontaktowych: lekceważenia zaleceń dotyczących zasad higieny, użytkowania i pielęgnacji lub przedłużania czasu noszenia.

#### **2.3.1. Choroby zapalne spojówki**

Zapalenia spojówki są jedną z najczęstszych infekcji narządu wzroku, o różnorodnej etiologii, która determinuje sposób terapii. Stany zapalne spojówki rozwijają się najczęściej na skutek zakażenia, alergii lub zaburzeń w produkcji filmu łzowego (Zespół Suchego Oka - ZSO). Objawy infekcji różnią się w zależności od

przyczyny. Na obraz kliniczny mogą składać się pieczenie, swędzenie, łzawienie, przekrwienie spojówki, odczuwanie ciała obcego pod powiekami, światłowstręt, zwężenie szpary powiekowej i obecność ropnej lub ropno-śluzowej wydzieliny [42, 73]. Infekcja może przebiegać z różnym nasileniem i zwykle ustępuje w ciągu 10-14 dni bez stosowania leczenia. W uzasadnionych przypadkach zaleca się jednak wprowadzenie odpowiedniej antybiotykoterapii ze względu na możliwość przejścia infekcji w stan przewlekły oraz z powodu zwiększonego ryzyka nadkażenia rogówki. W terapii najczęściej stosowane są leki o szerokim spektrum działania w postaci preparatów pojedynczych lub złożonych. Miejscowo podaje się krople zawierające związki z grupy fluorochinolonów (cyprofloksacyna, norfloksacyna, ofloksacyna) oraz maści zawierające neomycynę, gramicydynę, bacytracynę, polimiksyne.

#### **2.3.1.1. Zespół czerwonego oka związany z soczewkami kontaktowymi - CLARE**

Zespół czerwonego oka - CLARE jest ostrą reakcją zapalną rogówki i spojówki w wyniku stosowania soczewek kontaktowych (szczególnie w trybie całodobowego noszenia). Przyczyną rozwoju stanu zapalnego są endotoksyny uwolnione przez bakterie Gram-ujemne. Subiektywne objawy schorzenia to przekrwienie oka, ból i łzawienie [74].

#### **2.3.1.2. Zapalenie spojówek na skutek nieprawidłowości filmu łzowego – Zespół Suchego Oka (ZSO)**

Zespół suchego oka to szereg zaburzeń, w przebiegu których dochodzi do niedostatecznego nawilżenia powierzchni oka przez film łzowy. Nieprawidłowości warstwy lipidowej łez oraz niedobory filmu prowadzą do wysychania rogówki i spojówki. Typowe objawy zespołu suchego oka to nasilające się w ciągu dnia pieczenie lub łzawienie oka, podwójne widzenie oraz uczucie „piasku pod powiekami”. Poza dyskomfortem ZSO sprzyja uszkodzeniom powierzchni oka i zwiększa jego podatność na zakażenia bakteryjne. Złuszczający się, wysuszony nabłonek stanowi dobrą powierzchnię do kolonizacji przez bakterie, a osiadające zanieczyszczenia mechaniczne mogą wywołać stan zapalny. Powstające mikrouszkodzenia na powierzchni oka mogą prowadzić do owrzodzeń i uszkodzeń rogówki.

#### **2.3.1.3. Alergiczne zapalenie spojówek wywołane soczewkami kontaktowymi**

Obraz kliniczny zapalenia spojówek wywołanego soczewkami kontaktowymi jest zróżnicowany w zależności od stopnia nasilenia. Objawia się uczuciem światłowstrętu,

pieczeniem, swędzeniem, czemu towarzyszy wydzielanie gęstej, lepkiej wydzieliny sklejującej powieki szczególnie po przebudzeniu. Przyczyną alergicznego zapalenia spojówek jest najczęściej uczulenie na środek konserwujący zawarty w płynach do pielęgnacji soczewek. Szczególnie narażone są osoby nieprzestrzegające zaleceń higienicznych np.: poprzez wydłużanie czasu noszenia soczewek. Leczenie zachowawcze obejmuje przestrzeganie właściwej higieny oraz edukację pacjenta w zakresie prawidłowego używania środków pielęgnacyjnych [2].

#### **2.3.1.4. Brodawkowe zapalenie spojówki wywołane soczewkami kontaktowymi-CLPC**

CLPC (z ang. *contact lens induced papillary conjunctivitis*) dotyczy 2 – 5% pacjentów stosujących miękkie soczewki kontaktowe i jest reakcją alergiczną na wprowadzoną soczewkę [75]. Dodatkowym czynnikiem predysponującym są gromadzące się na powierzchni soczewek zdenaturowane osady białkowe, które działają jako czynnik alergizujący. CLPC charakteryzuje się powstawaniem zmian o charakterze grudek, a następnie brodawek olbrzymich ( $\geq 1\text{mm}$ ) na wewnętrznej powierzchni górnych powiek w odpowiedzi na ciało obce. Do pozostałych objawów CLPC zalicza się występowanie śluzowej wydzieliny, uczucie swędzenia, decentrowanie się soczewek na oczach oraz pogorszenie widzenia na skutek zatłuszczenia biomateriału. Nietolerancja na tworzywo z którego wykonano soczewki może się nasilać. Postępowanie terapeutyczne polega na zmianie stosowanych soczewek oraz zwiększeniu częstotliwości ich wymiany (stosowanie soczewek jednodniowych), poprawie sposobu czyszczenia lub zmianie rodzaju płynów pielęgnacyjnych. W przypadku nie ustąpienia dolegliwości zaleca się zaprzestanie ich stosowania i włączenie leczenia farmakologicznego [75, 76].

#### **2.3.1.5. Zapalenie spojówek wywołane zakażeniami bakteryjnymi**

Bakteryjne zapalenie spojówki jest, obok zapalenia alergicznego, najczęstszą chorobą spojówek u dorosłych. Na ogół infekcji towarzyszy dysfunkcja innych elementów narządu wzroku, a samo zapalenie często jest wynikiem innych powikłań m.in. niedostatecznego wydzielania łez lub/i nieprawidłowym składem filmu łzowego. Infekcja rozwija się zazwyczaj na skutek bezpośredniego zanieczyszczenia spojówki, np.: poprzez przeniesienie patogenów rąk lub okolic oczu, przy ich pocieraniu. Czynnikiem predysponującym może być stosowanie soczewek kontaktowych, zapalenie zatok obocznych nosa, stany upośledzonej odporności i bezpośredni kontakt

z wydzielinami osób zakażonych [2]. Mikroorganizmy mogą zostać wprowadzone do oka w momencie nakładania soczewek – drogą brudnych rąk, zainfekowanych pojemników i systemów pielęgnacyjnych lub niesterylnych leków ocznych.

U dorosłych bakteryjne stany zapalne spojówki rozwijają się najczęściej na skutek działania paciorkowców (*Streptococcus pneumoniae*) i gronkowców (*Staphylococcus aureus*- SA, *Staphylococcus epidermidis*- SE), rzadziej pałeczką *Haemophilus influenzae* lub jelitowymi bakteriami Gram-ujemnymi (*Escherichia coli* - EC) oraz dwoinką rzeżączki (*Neisseria gonorrhoea*). U dzieci bakteryjne zapalenie spojówki wywołuje przeważnie pałeczka *Haemophilus influenzae*. Klinicznie objawia się powierzchownym zaczerwienieniem oka, które w przebiegu ostrego zapalenia przechodzi w silne przekrwienie spojówek powodując światłowstręt, swędzenie i pieczenie powiek. W niektórych przypadkach następuje obrzęk limfatycznych węzłów przyuszniczych, podżuchwowych i szyjnych. Najbardziej charakterystycznym objawem zapalenia jest ropna wydzielina, która powoduje sklejanie brzegów powiek (w szczególności po przebudzeniu) [2].

Bakteryjne zapalenie spojówek jest schorzeniem samoograniczającym się i zazwyczaj nie trwa dłużej niż 5 – 7 dni. Tradycyjne leczenie zapalenia spojówek rozpoczyna się od zastosowania kropli i maści przeciwbakteryjnych o szerokim spektrum działania (fluorochinolony, aminoglikozydy). W celu zmniejszenia ryzyka rozwoju antybiotykoodporności bakterii niezbędne jest stosowanie się do zaleceń dotyczących dawkowania kropli.

Powikłania mogą pojawić się w wyniku zakażenia ekstremalnie zjadliwymi szczepami i szczególnie dotyczy to osób stosujących soczewki kontaktowe. Zakażenie *Pseudomonas aeruginosa* (PA) może skutkować ciężkim owrzodzeniem rogówki, które nieprawidłowo leczone może prowadzić do upośledzenia wzroku [58, 77].

### **2.3.2. Infekcje rogówki**

#### **2.3.2.1. Owrzodzenie części obwodowej rogówki związane ze stosowaniem soczewek kontaktowych - CLPU**

Kolonizacja soczewek kontaktowych przez patogenne bakterie Gram-dodatnie, głównie SA i SE prowadzi do postępującego owrzodzenia części obwodowej rogówki – CLPU (z ang. *Contact lens-induced peripheral ulceration*). Rozwija się ono w wyniku reakcji rogówki na adhezję drobnoustrojów i tworzenie się biofilmu na biomateriale. CLPU głównej mierze dotyczy osób wydłużających czas noszenia soczewek [78].

Produkowane przez bakterie toksyny nasilają reakcje odpornościowe na powierzchni oka, prowadząc do powstania charakterystycznego, kolistego wędrującego w kierunku peryferii rogówki nacieku. Leczenie obejmuje natychmiastowe zaprzestanie stosowania soczewek oraz włączenie miejscowej antybiotykoterapii [2].

### 2.3.2.2. Bakteryjne zapalenie rogówki

Bakteryjne zapalenie rogówki (*keratitis*) jest rzadkim, ale jednym z najpoważniejszych powikłań związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych i może prowadzić do utraty wzroku w wyniku bliznowacenia rogówki [79]. Przyczyną tego powikłania jest najczęściej infekcja bakteryjna po urazie rogówki lub w wyniku dekompensacji po przedłużonym noszeniu soczewek. Wszelkie patologiczne zmiany (ubytki, urazy) w obrębie nabłonka rogówki skutkują uczuciem dyskomfortu i stanowią otwartą bramę dla drobnoustrojów, zwiększając podatność głębszych warstw rogówki na infekcje bakteryjne, pełzakowate, grzybicze i wirusowe.

Czynnikiem predysponującym do rozwoju *keratitis* są także zaburzenia w składzie i w wydzielaniu filmu łzowego, stosowanie zakażonych leków okulistycznych i płynów do przechowywania soczewek oraz uszkodzenia w obrębie nabłonka rogówki powstałe w wyniku stosowania miękkich soczewek kontaktowych szczególnie w trybie przedłużonego noszenia [2].

Patogenami odpowiedzialnymi za rozwój bakteryjnego zapalenia rogówki są najczęściej gronkowce (*S. aureus*, gronkowce koagulazo-ujemne) i paciorkowce (*S. pneumoniae*) oraz pałeczka ropy błękitnej (*P. aeruginosa*), która jest głównym czynnikiem etiologicznym zakażeń będących powikłaniami po stosowaniu soczewek kontaktowych.

Większość patogenów może wywołać zapalenie jedynie w przypadku uszkodzenia nabłonka, ale niektóre np. *N. gonorrhoeae* i *H. influenzae* wykazują zdolność przenikania przez nieuszkodzony nabłonek [42].

Typowymi objawami infekcji jest ból, światłowstręt i głęboki spadek ostrości wzroku w wyniku zmętnienia rogówki. Na rogówce powstają nacieki zapalne powodujące utratę jej przezroczystości, które mogą powiększać się w związku z obrzękiem istoty właściwej. Zmianom towarzyszy obrzęk spojówki, przekrwienie okołorąbkowe oraz zwężenie szpary powiekowej powstałe w wyniku obrzęku powiek.

Szczególnie trudne w leczeniu są ciężkie zakażenia wywołane przez *P. aeruginosa* stanowiące 70% przypadków zapalenia rogówki związanych ze



stosowaniem soczewek kontaktowych [80]. Wysoka zjadliwość szczepu i ciężki przebieg infekcji wiąże się ze zdolnością produkcji proteaz umożliwiających wnikanie i lizę komórek nabłonkowych rogówki. Aktywacja receptorów TLR poprzez wiązanie lipopolisacharydu bakteryjnego stymuluje dodatkowo komórki nabłonkowe do produkcji mediatorów zapalnych. Odpowiedź immunologiczna i związana z tym fagocytoza bakterii w sytuacji przedłużającego się stanu zapalnego może prowadzić do destrukcji nabłonka rogówki i postępującej martwicy enzymatycznej tkanki. Postępujące ciężkie owrzodzenie w niektórych przypadkach powoduje przebicie rogówki i prowadzi do bakteryjnego zapalenia wnętrza gałki ocznej. Zakażenia tego typu występują najczęściej u osób stosujących niewłaściwie odkażane soczewki kontaktowe [2]. Od ostatniej dekady odnotowuje się zwiększoną częstotliwość zakażeń rogówki wywołaną przez gronkowce koagulazo-ujemne [81]. Według niektórych doniesień 45% wszystkich przypadków bakteryjnego zapalenia rogówki jest odpowiedzialny *S. epidermidis* [82, 83].

## **2.4. Profilaktyka i terapia infekcji odsoczewkowych**

### **2.4.1. Antybiotykoterapia konwencjonalna**

Antybiotykoterapia jest standardową i skuteczną metodą leczenia infekcji okulistycznych. Jednak nadużywanie związków przeciwdrobnoustrojowych o szerokim spektrum działania indukuje rozwój szczepów opornych wobec stosowanych terapeutyków. Jednocześnie długotrwałe narażenie na miejscowe działanie leków, zwłaszcza zawierających konserwanty zwiększa ryzyko wystąpienia działań niepożądanych np. jatrogennego uszkodzenia powierzchni oka.

Droga podania leku okulistycznego jest ściśle zależna od rodzaju zakażenia, dolegliwości, wyników otrzymanych na podstawie posiewu i antybiogramu. Antybiotyki i chemioterapeutyki mogą być podawane ogólnie (dożylnie, domięśniowo, doustnie) i miejscowo w postaci kropli, zawiesin, maści lub iniekcji. Standardowymi substancjami leczniczymi stosowanymi w zakażeniach okulistycznych są antybiotyki aminoglikozydowe i fluorochinolony [77].

Do szczególnie ciężkich przypadków terapeutycznych należą zakażenia wewnątrzgałkowe i zakażenia tkanek miękkich oczodołów. Infekcje tego typu są najczęściej powikłaniem po zabiegach chirurgicznych lub urazach gałki ocznej i wymagają ogólnej antybiotykoterapii cefalosporynami podanymi parenteralnie. W ten sposób podaje się cefuroksym, ceftazydym, cetriakson i cefotaksym, który najlepiej

przenika przez barierę krew-siatkówka. W celu uzyskania odpowiedniego stężenia leku wykonuje się także wstrzyknięcia podspojówkowe i okołogałkowe lub bezpośrednio do komory ciała szklistego [2, 84].

Infekcje rogówki są często wynikiem zakażeń mieszanych, dlatego terapia pierwszego rzutu obejmuje miejscowe stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum. Przed rozpoczęciem leczenia zalecane jest pobranie wymazu spojówkowego oraz zeszkobin z dna i brzegów owrzodzenia w celu wykonania diagnostyki różnicowej. Leczenie bakteryjnego zapalenia rogówki opiera się na dwóch metodach: monoterapii fluorochinolonem (np. 3% cyprofloksacyna lub 0,3% ofloksacyna) lub terapii podwójnej opartej na synergistycznym działaniu aminoglikozydów i cefalosporyny. Obie metody są skuteczne wobec większości patogenów, a oporność bakterii szacuje się na ok. 5% przypadków [42].

Do głównych ograniczeń wykorzystywanej terapii zalicza się umiarkowaną aktywność fluorochinolonów wobec *S. pneumoniae*, natomiast stosowana w terapii cyprofloksacyna może powodować powstawanie białkowych złogów na rogówce, opóźniając tym samym proces gojenia [2, 42, 77]. Poza tym antybiotykoterapia wykazuje ograniczoną skuteczność w infekcjach oka związanych z tworzeniem się biofilmu. Zakażenia związane z biofilmem stanowią wyzwanie dla dzisiejszej medycyny i wskazują potrzebę opracowania nowych strategii terapeutycznych. W celu opracowania nowych leków skutecznych w walce z zakażeniami należy uwzględnić mechanizmy nabywania oporności, czynników wirulencji, w tym zdolność mikroorganizmów do formowania biofilmu.

### 3. BIOFILM BAKTERYJNY

Zdolność drobnoustrojów do kolonizacji i tworzenia biofilmu odgrywa istotną rolę w patogenezie zakażeń związanych ze stosowaniem biomateriałów. Biofilm jest złożoną, wielowarstwową, trójwymiarową strukturą przylegającą do powierzchni stałych. Otoczone zewnętrzną, polisacharydową substancją (EPS – Extracellular Polymeric Substance) mikroorganizmy egzystują jako skupiska jednego, kilku lub kilkunastu gatunków. Drobnoustroje zorganizowane przestrzennie w jedno lub wielowarstwowe mikrokolonie, oddzielone są od siebie kanałami, tworząc system zaopatrujący je w tlen, substancje odżywcze i odprowadzający produkty przemiany materii [85]. Warstwa EPS chroni mikroorganizmy przed niekorzystnym działaniem czynników zewnętrznych tj. antybiotyków oraz elementów komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Narażenie na powyższe czynniki może nasilać proces formowania się biofilmu i inicjować wzmożoną adhezję kolejnych powierzchni, w tym tkanek, ciał obcych i biomateriałów [86].

#### 3.1. Etapy powstawania biofilmu

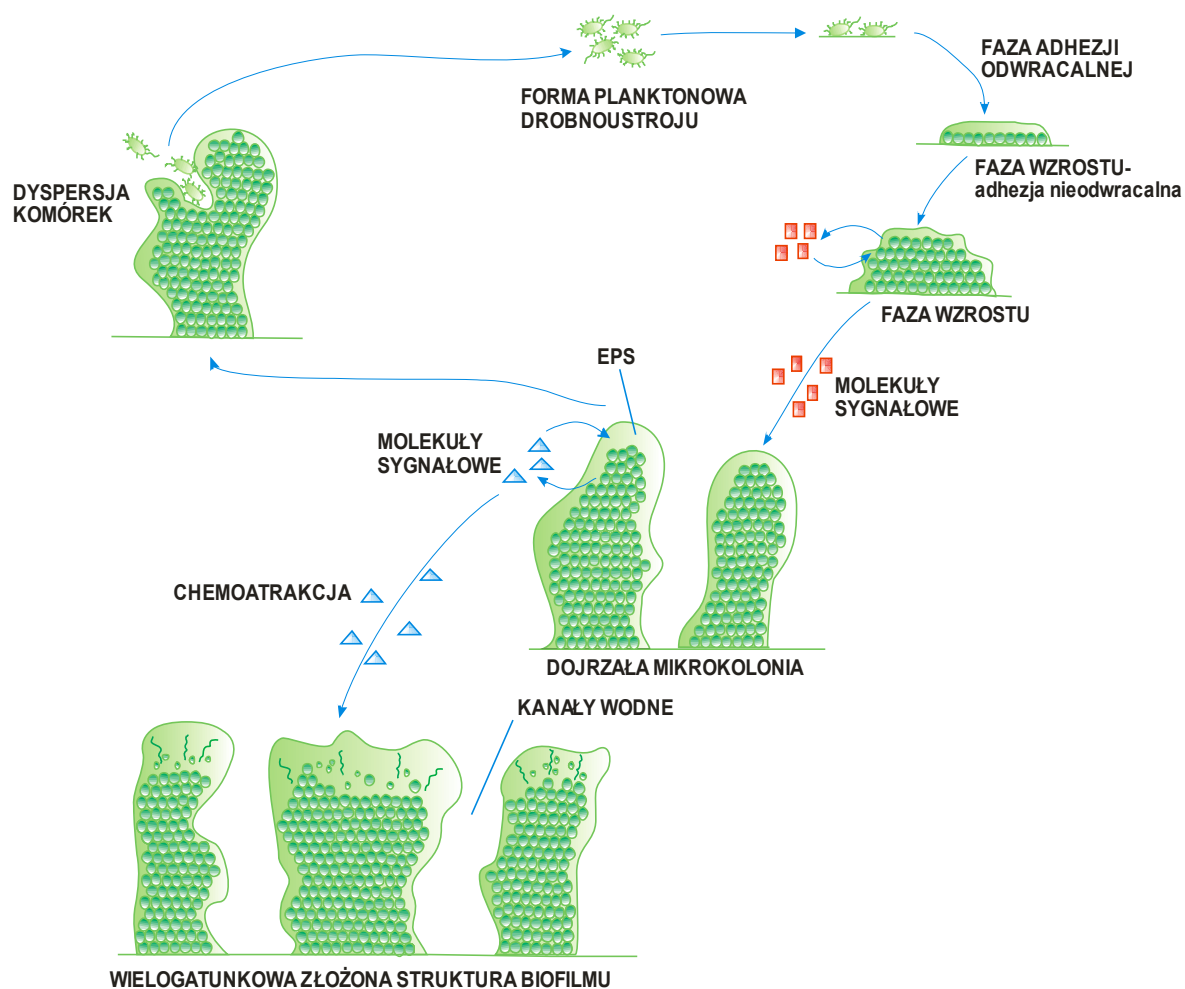
Proces formowania biofilmu jest wielostopniowy i zachodzi w kilku fazach. Etapem inicjującym jest odwracalna adhezja pojedynczych, wolnopływających komórek do powierzchni tkanek, ciał obcych lub tworzyw sztucznych wykorzystywanych do produkcji wyrobów medycznych. Przyleganie opiera się na niespecyficznych oddziaływaniach fizykochemicznych drobnoustroju z kolonizowaną powierzchnią.

Kolejny etap charakteryzuje się nieodwracalnym przytwierdzeniem mikroorganizmów do powierzchni przy udziale białek adhezyjnych. Rozpoczyna się produkcja EPS, który ułatwia przyczepność tworzących się mikrokolonii. Mikroorganizmy namnażają się, przyłączając kolejne komórki wolnopływające i tworzy się wielowarstwowa struktura otoczona EPS.

Podczas dojrzewania biofilmu następuje zmiana ekspresji genów oraz metabolizmu drobnoustrojów zlokalizowanych w głębszych warstwach populacji. Maleje tempo wzrostu i metabolizmu drobnoustrojów w wyniku ograniczonego dostępu do tlenu i substancji odżywczych. Następuje aktywacja genów kodujących enzymy rozkładające leki lub kodujących białka wypompowujące leki z komórek bakteryjnych (*drug efflux pumps*).

Formowanie biofilmu jest kontrolowane przez unikalny mechanizm oceny liczebności (*quorum sensing*, zmysł tłoku), system komunikacji międzykomórkowej, zwiększający zdolności adaptacyjne biofilmu poprzez wydzielanie cząsteczek sygnałowych.

W końcowym etapie dojrzewania biofilmu komórki drobnoustrojów odczepiają się od macierzy i rozpoczynają proces ekspansji kolejnych powierzchni. Komórki uwolnione z biofilmu wykazują obniżoną wrażliwość na stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe oraz inicjują kolonizację na innych podłożach. Dodatkowo nieprawidłowo przeprowadzona antybiotykoterapia sprzyja rozwojowi subpopulacji komórek przetrwałych (*persistor cells*), wykazujących tolerancję wobec wysokich stężeń terapeutycznych stosowanych leków. Po zakończeniu leczenia komórki przetrwałe umożliwiają rozwój biofilmu *de novo* będąc przyczyną uporczywych i chronicznych infekcji [87-89]. Na rycinie 6 przedstawiono uproszczony schemat powstawania biofilmu bakteryjnego.



Rycina 6. Schemat powstawania biofilmu [87-89].

### **3.2. Odporność biofilmu na związki przeciwdrobnoustrojowe. Infekcje okulistyczne związane z biofilmem.**

Mikroorganizmy rosnące w populacji biofilmu wykazują odmienne właściwości od form planktonowych tego samego szczepu. Rozwój biofilmu wiąże się z problemami terapeutycznymi, ponieważ mikroorganizmy w jego obrębie są mniej podatne na działanie antybiotyków i elementów komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej. W skrajnych przypadkach skuteczne wobec biofilmu stężenie antybiotyku nawet 1000-krotnie przekracza stężenie aktywne wobec komórek wolnożyjących tego samego szczepu [90]. Wzmoczona oporność biofilmu dotyczy także działania środków antyseptycznych i dezynfekcyjnych [91-93]. Pozakomórkowy EPS zbudowany jest z polisacharydów, białek powierzchniowych, kwasu teichojowego, lipoteichojowego, teichuronowego oraz kwasów nukleinowych. Stanowi bezpośrednią barierę ochronną przed niekorzystnymi warunkami otoczenia, utrudniając penetrację antybiotyków do wnętrza struktury. Działanie terapeutyków obejmuje najczęściej tylko powierzchniową warstwę struktury biofilmu, a jej likwidacja nie ma wpływu na pozostałe wewnętrzne warstwy mikroorganizmów [94]. Dodatkowo struktura EPS ułatwia bakteriom adhezję do podłoża.

Drobnoustroje tworzące biofilm różnią się pod względem metabolizmu, zdolnością proliferacji, wymagań tlenowych i odżywczych. Komórki umiejscowione w głębszych warstwach struktury biofilmu, ze względu na ograniczony dostęp do tlenu, wykazują zdolność aktywacji procesów beztlenowych. Jednocześnie prezentują znacznie obniżone zdolności proliferacyjne, w związku z czym wykazują oporność wobec antybiotyków aktywnych głównie wobec szybko różnicujących się komórek. Zdolność zmiany ekspresji genów w obrębie dojrzałego biofilmu prowadzi do wzmoczonej syntezy enzymów i białek dezaktywujących związki o charakterze przeciwdrobnoustrojowym. Następstwem tego zjawiska jest wielolekowa oporność biofilmu na niskie stężenia leku. Na zdolności biofilmu do przetrwania pomimo niekorzystnych warunków otoczenia istotny wpływ ma subpopulacja uspionych, przetrwałych komórek bakteryjnych (persister cells). Wykazują one zdolność do regeneracji struktury biofilmu po zakończonej antybiotykoterapii. Zaprzeszczenie terapii lub niewłaściwy dobór leków skutkuje nawrotem infekcji, a często jej nasileniem.

Szacuje się, że 65% wszystkich zakażeń szpitalnych jest związanych z tworzeniem się biofilmu na biomateriałach stosowanych w leczeniu, tj.: implantach

sercowych, ortopedycznych, cewnikach i soczewkach kontaktowych [95]. Niezależnie od złożoności implantów biomedycznych i struktur inżynierii tkankowej wszystkie urządzenia medyczne są podatne na kolonizację drobnoustrojów, co może być przyczyną infekcji.

Infekcje tego typu słabo odpowiadają na klasyczną antybiotykoterapię, mają najczęściej przewlekły przebieg i predysponują do nawrotów. Najnowsze dane epidemiologiczne wskazują, że ok. 80% przetrwałych i nawracających infekcji związanych jest z obecnością biofilmu [96]. Biofilm na urządzeniach medycznych jest niezwykle trudny do wyeliminowania, z kilkoma opcjami leczenia, takimi jak usunięcie zainfekowanego urządzenia lub stosowanie dużych dawek antybiotyków. Zwiększa to jednak koszty leczenia i może zwiększyć ryzyko rozwoju oporności na antybiotyki.

Narastająca lekooporność wyrażona tolerancją wobec wysokich stężeń antybiotyków stanowi poważny problem terapeutyczny infekcji oka związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych [97]. Dodatkowo stosowanie soczewek kontaktowych niesie ze sobą ryzyko urazów nabłonka rogówki. Proces fizjologicznego gojenia może zostać zaburzony przez nadkażenie bakteryjne. W przypadku upośledzenia funkcji odpornościowych aparatu ochronnego oka zakażenie prowadzi do powstania biofilmu, wykazującego zwiększoną oporność na działanie antybiotyków i antyseptyków [98]. Utrzymujący się stan zapalny, utrudnia proces gojenia się rany i prowadzi do przewlekłego zakażenia obejmującego w skrajnych przypadkach wnętrza gałki oka.

Stanami sprzyjającymi zakażeniom są: niedostateczna higiena rąk i twarzy, nieregularna wymiana płynu i pojemnika do pielęgnacji soczewek, nieprzestrzeganie czasu i trybu noszenia soczewek. Wynika to z faktu, iż przedłużone noszenie soczewek może powodować niedotlenienie rogówki oraz wzrost jej podatności na mikrourazy. Dodatkowo przedłużone noszenie soczewek kontaktowych powoduje odkładanie się depozytów białkowych na soczewkach, stanowiących pożywkę dla drobnoustrojów [99].

## **4. PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE JAKO ALTERNATYWA KONWENCJONALNEJ TERAPII I PROFILAKTYKI INFEKCJI ZWIĄZANYCH ZE STOSOWANIEM SOCZEWEK KONTAKTOWYCH**

Złożona struktura biofilmu i jego wysoka oporność wobec konwencjonalnych antybiotyków są głównymi przyczynami problemów w terapii infekcji okulistycznych związanych z tworzeniem się biofilmu na powierzchni soczewek kontaktowych [97]. Obecnie nie ma w pełni skutecznej metody leczenia tego typu infekcji. Liczne zespoły naukowe podejmują więc próby opracowania efektywnych związków do walki z biofilmem oraz zapobiegania jego formowania. Szczególny obszar badań w tym zakresie stanowią peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Związki te stanowią istotną część wrodzonej odporności zarówno roślin jak i zwierząt (kręgowce i bezkręgowce) [100, 101].

Szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego, niskie ryzyko odporności, zaangażowanie we wrodzone mechanizmy odpowiedzi immunologicznej oraz potwierdzona zdolność eliminacji oraz zapobiegania formowania się biofilmu zarówno w warunkach *in vitro* i *in vivo* czynią z nich idealną matrycę do poszukiwania potencjalnych środków terapeutycznych.

### **4.1. Klasyfikacja naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych**

W internetowej bazie Antimicrobial Peptides Database (APD) prowadzonej przez Wang i wsp., dotychczas opisanych zostało ponad 3200 peptydów przeciwdrobnoustrojowych [102].

Biorąc pod uwagę różnorodność budowy peptydów przeciwdrobnoustrojowych dokonano podstawowej kwalifikacji w oparciu o ich strukturę przestrzenną. Na podstawie szeregu podobieństw chemicznych wyróżnia się trzy główne grupy związków:

- peptydy liniowe o budowie  $\alpha$ -helikalnej, nie zawierające reszt cysteiny, wykazujące właściwości amfipatyczne (m.in. temporyny, aureiny, citropiny, magaininy cekropiny, melityna i katelicydyny),
- peptydy o strukturze  $\beta$ -kardki stabilizowane wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem dwusiarczkowym (m.in. defensyny, protegryny),

- peptydy o rozszerzonej strukturze, zawierające w swej budowie określone reszty aminokwasowe (m.in. histatyny, indolicydyna). Do tej grupy przynależą także bakteriocyny (np. nizyna) posiadające pierścieniową budowę dzięki wewnętrznym wiązaniom tioeterowym.

Wszystkie żywe organizmy, niezależnie od środowiska, w którym bytują, narażone są na kontakt z licznymi drobnoustrojami. Z tego względu muszą dysponować mechanizmami pozwalającymi kontrolować lub zwalczać zagrażające im patogeny. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe produkowane są zarówno przez komórki prokariotyczne (bakteriocyny), jak i eukariotyczne (endogenne antybiotyki peptydowe). Pochodzenie peptydów stanowi istotne kryterium ich klasyfikacji.

#### **4.1.1. Bakteriocyny – peptydy przeciwdrobnoustrojowe bakterii**

Bakteriocyny to związki o budowie peptydowej wytwarzane przez mikroorganizmy. Wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe w stosunku do gatunków blisko spokrewnionych. Ich aktywność biologiczna zapewnia mikroorganizmom selektywne oddziaływanie wobec konkurencyjnych populacji w środowisku. Za ich pośrednictwem oddziałują na organizmy konkurujące o składniki odżywcze. Peptydy ograniczają ich wzrost lub je eliminują. Tym samym wpływają pośrednio na utrzymanie różnorodności mikrobiologicznej [103]. Wiele związków należących do tej grupy znalazło zastosowanie w przemyśle spożywczym.

Pierwszym w pełni scharakteryzowanym związkiem tej grupy była kolicyna wytwarzana przez szczep *E. coli*. Związek wykazuje aktywność w stosunku do innych szczepów tego samego gatunku poprzez tworzenie kanałów jonowych w błonie cytoplazmatycznej lub poprzez rozkład peptydoglikanu [104]. W 2017 r. FDA i USDA w ramach procedury regulacyjnej GRAS (*Generally Recognized As Safe*), uznały kolicynę za bezpieczny środek przeciwdrobnoustrojowy do zwalczania *E. coli* w produktach spożywczych [105, 106]. Ze względu na swoje właściwości, kolicyna znalazła zastosowanie w testach aplikacyjnych z udziałem biomateriałów. Kolicyna prezentuje aktywność hamującą rozwój biofilmu uropatogennych izolatów na cewnikach moczowych [107].

*Bacillus subtilis* wytwarza związki zaliczane do grupy cyklicznych lipopeptydów (fengycyna, surfaktyna, mykosubtilina), silnie działających na pleśnie i drożdże zanieczyszczające żywność oraz powodujących ich psucie [108]. Innymi biokonserwantami są bakteriocyny syntetyzowane przez pałeczki kwasu mlekowego



(lantionina, laktacyny, laktokokcyny). Substancje te zapobiegają infekcjom jelitowym wywołanymi przez *S. aureus* i *C. albicans* [109]. Nizyna produkowana przez Gram-dodatnie bakterie *Lactococcus lactis* hamuje namnażanie bakterii tworzących przetrwalniki (m.in. *Clostridium*, *Listeria*). Dzięki wysokiej odporności termicznej nizyna ma zastosowanie w skali przemysłowej jako konserwant (E234) w produktach spożywczych [110, 111].

#### **4.1.2. Endogenne peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs, antimicrobial peptides)**

AMPs to antybiotyki peptydowe produkowane przez organizmy należące do taksonu eukariota [112, 113]. Wydzielane są przez tkanki i narządy narażone na kontakt ze środowiskiem zewnętrznym stanowiąc pierwszą linię wrodzonej odporności immunologicznej organizmów. AMPs zostały wyizolowane z roślin, owadów, ryb, płazów, gadów, ptaków oraz ssaków, w tym z organizmu człowieka. Niektóre peptydy AMPs są wydzielane w sposób ciągły pełniąc funkcje protekcyjne przed inwazją patogenów, podczas gdy inne są uwalniane na skutek bodźca – uszkodzenia tkanki lub w odpowiedzi na bezpośredni kontakt z czynnikami mikrobiologicznymi. Zwiększone wydzielanie naturalnych AMPs obserwuje się w obszarze stanu zapalenia, będącego następstwem zakażenia.

W przeciwieństwie do peptydów wydzielanych przez organizmy prokariotyczne, AMPs wykazują szerokie spektrum działania wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz grzybów [101, 114]. Oprócz bezpośredniego zaangażowania w mechanizmy odporności wrodzonej i typowej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, AMPs wykazują zdolność modulowania reakcji zapalnych w trakcie trwania infekcji oraz neutralizacji endotoksyn [115-117]. Wiążąc się z lipopolisacharydem obecnym w ścianie bakterii Gram-ujemnych zapobiegają wystąpieniu wstrząsu septycznego. Ponadto, część z nich posiada zdolność hamowania reakcji prozapalnych i procesów powstawania biofilmu oraz przyspiesza proces gojenia ran [118]. Niektóre związki z tej grupy wykazują aktywność przeciwwirusową i przeciwpasożytniczą [114, 119]. W wysokich stężeniach AMPs wykazują aktywność przeciwnowotworową, a w niższych dawkach wykazują działanie immunomodulujące wzmacniając odpowiedź układu immunologicznego na infekcję [120, 121].

AMPs pochodzenia zwierzęcego wykazują zróżnicowanie pod względem aktywności przeciwdrobnoustrojowej i spektrum działania. Natomiast w przypadku

peptydów wytwarzanych przez organizmy roślinne obserwuje się silniejsze działanie przeciwgrzybicze [121, 122]. AMPs produkowane przez różne części rośliny stanowią istotny element wrodzonej odporności, chroniąc roślinę przed inwazją mikroorganizmów. Przykładem tej klasy związków jest tionina prezentująca aktywność bakteriobójczą wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów. Wydzielane na zewnątrz ściany komórkowej roślinne defensyny wiążą się z lipidowymi składnikami błony cytoplazmatycznej grzybów, zwiększając przepuszczalność ich błony. Postępująca granulacja cytoplazmy prowadzi w następstwie do lizy komórki.

#### **4.1.2.1. Peptydy owadzie**

AMPs produkowane przez owady stanowią główny element ich układu odpornościowego. Wytwarzane są przez nabłonki oraz wydzielane do hemolimfy lub jadu w warunkach zagrożenia wzmacniając odpowiedź immunologiczną [123]. Ze względu na prostotę izolacji i powszechne występowanie owadów, peptydy produkowane przez nie stanowią jedną z najszerzej przebadanych klas AMPs. Zalicza do nich m.in. cekropiny, defensyny owadzie, lizozymy, peptydy bogate w glicynę lub prolinę [124]. W badaniach przeprowadzonych na muszce owocowej *Drosophila melanogaster* stwierdzono obecność 20 genów kodujących 8 rodzin AMPs: andropin, attacyn, cekropin, defensyn, dipterycyn, drosomycyn, drosocyn i mecznikowin [125]. Cekropiny A i B wykazują szerokie spektrum działania zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [126]. Podczas gdy aktywność defensyn skierowana jest głównie wobec bakterii Gram-dodatnich. Defensyna wyizolowana z ćmy *Galleria mellonella* – gallerimycyna wykazuje również aktywność przeciwgrzybiczą [127]. Do cekropin należy także melityna wyizolowana z jadu pszczoły miodnej *Apis mellifera*. Zastosowanie terapeutyczne melityny pomimo jej potwierdzonej silnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej zostało wykluczone ze względu na aktywność hemolityczną [128].

#### **4.1.2.2. Peptydy wydzielane przez płazy**

Skóra płazów okazała się bogatym źródłem naturalnych antybiotyków, a prosta izolacja miała istotny wpływ na intensywny rozwój badań tej klasy związków. Pierwszymi opisanymi związkami w tej grupie były magaininy wyizolowane ze skóry żaby afrykańskiej *Xenopus laevis* [129]. W odpowiedzi na zranienie lub bodziec stresowy, gruczoły skórne płazów są stymulowane do wydzielania związków

determinujących ich odporność na infekcję w bogatym w drobnoustroje środowisku wodnym [130]. Związki te wykazują szerokie spektrum aktywności wobec bakterii, grzybów i pierwotniaków [131]. Wyizolowana przez żabę trawną (*Rana temporaria*) temporyna A prezentuje właściwości przeciwgrzybicze i przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-dodatnich, w tym opornych na wankomycynę. Skuteczność związku została potwierdzona *in vivo* na modelu zainfekowanych ran przewlekłych [132, 133]. Citropina 1.1 wyizolowana z gruczołów rzekotki *Litoria citropa* prezentuje aktywność wobec *S. aureus*, a w terapii skojarzonej z zastosowaniem antybiotyku konwencjonalnego (rifamcyną oraz minocyliną) wykazuje efekt synergistyczny wobec struktury biofilmu *in vitro* na mysim modelu infekcji odcewnikowych [134]. Inne zidentyfikowane peptydy tej grupy to m.in. przeciwgrzybicza dermaseptyna oraz Aureina 1.2 wykazująca aktywność przeciwnowotworową [135].

#### **4.1.2.3. Peptydy wytwarzane przez ssaki**

Ssaki obok płazów stanowią drugą co wielkości gromadę zwierząt stanowiących bogate źródło AMPs. Grupa ta obejmuje defensyny, katelicydyny i obecne w ślinie histatyny. Związki te występują praktycznie u wszystkich kręgowców. Prezentują działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, przeciwwirusowe i immunomodulujące oraz regulują procesy nowotworzenia [136]. Stymulują proces angiogenezy i gojenia ran poprzez hamowanie fibrynolizy i zwiększoną chemotaksję fibroblastów [137]. Równocześnie hamują proces fibrynolizy poprzez tkankowy aktywator plazminogenu, a poprzez mechanizm inhibicji proteaz bakteryjnych, ograniczają ich destrukcyjny wpływ na tkanki w miejscu objętym zakażeniem. Wiele prac doświadczalnych potwierdza, że niektóre z peptydów AMPs o słabej aktywności bakteriobójczej wykazują silne właściwości immunomodulacyjne, umożliwiając zsynchronizowaną aktywację układu odpornościowego. Wzmagają aktywność makrofagów, regulują aktywację białek dopełniacza i degranulację komórek tucznych. Regulują stan zapalny i inicjują odporność nabytą [138]. W warunkach stanu zapalnego AMP inicjują proces lizy komórek bakteryjnych, uwalniają bakteryjne mediatory stanu zapalnego (lipopolisacharydy i kwas lioteichojoyowy), aktywują chemotaksję neutrofilów oraz wpływają na degradację komórek tucznych (uwalniają histaminę i powodują wazodylację). Wytwarzanie peptydów AMP w komórkach ssaków może być jest indukowane na skutek uwalniania bakteryjnych lipopolisacharydów (LPS) w odpowiedzi na antybiotykoterapię lub odpowiedź komórek gospodarza [139]. Poprzez

wiązanie LPS, peptydy AMP wpływają supresyjnie na reakcję zapalną poprzez blokowanie uwalniania kaskady prozapalnych cytokin (TNF- $\alpha$ , IL1 i IL6), przez stymulowane LPS makrofagi, dzięki czemu mogą zapobiegać wystąpieniu wstrząsu septycznego [140-143]. Peptydy regulują ekspresję genów. Wykazują działanie chemotaktyczne, zwiększając proliferację limfocytów T i komórek dendrytycznych. Innowacyjnym kierunkiem badań związanych z peptydami jest ich potencjalne zastosowanie w terapii zakażeń wirusowych, w tym opracowania szczepionki anty-HIV [144]. W organizmie człowieka, endogenne peptydy przeciwdrobnoustrojowe stanowią pierwszą linię obrony na skórze i błonach śluzowych. Produkowane są przez komórki naskórka, granulocyty obojętnochłonne, gruczoły potowe lub powstają jako produkty metabolizmu białek. Bogatym źródłem tych związków jest także płyn łzowy.

### Defensyny

Defensyny stanowią obszerną grupę kationowych AMPs izolowanych z organizmu ludzkiego i innych ssaków. Zbudowane są z 18-45 reszt aminokwasowych z dużą zawartością reszt cysteinowych. W większości mają strukturę  $\beta$ -harmonijki stabilizowaną trzema mostkami cysteinowymi. Defensyny sklasyfikowano w następujące grupy: defensyny kręgowców, do których należą defensyny ssaków ( $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\theta$ -), defensyny bezkręgowców i roślin [145].

U człowieka obecne są dwie grupy defensyn:  $\alpha$ - defensyny i  $\beta$ -defensyny [146]. Mogą być wytwarzane zarówno konstytutywnie jak i w wyniku indukcji LPS lub cytokinami zapalnymi [138, 146]. Produkowane są w postaci nieaktywnych propeptydów, ulegających aktywacji na drodze proteolizy. Wykazują szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, zarówno wobec bakterii, grzybów i pasożytów. Ludzkie  $\alpha$ - defensyny charakteryzują się obecnością mostków dwusiarczkowych pomiędzy cysteinami w pozycji 1 i 6, 2 i 4 oraz 3 i 5.

Produkowane są konstytutywnie i magazynowane w ziarnistościach neutrofilii (HNP-1,2,3,4 - *Human Neutrophil Peptides*) i w komórkach Paneth'a oraz komórkach nabłonkowych dróg rodnych kobiet (HD5, HD6 - *Human Defensins*). Wydzielane są również przez monocyty/makrofagi oraz komórki NK (ang. *Natural Killers*). Ludzkie  $\alpha$ -defensyny wykazują zróżnicowaną aktywność przeciwdrobnoustrojową. W grupie neutrofilowych defensyn, HNP-2 wykazuje najwyższą aktywność bakteriobójczą wobec *S. aureus*.  $\alpha$ - defensyny HNP 1-3 wykazują działanie przeciwwirusowe wobec adenowirusów, wirusa opryszczki i grypy. HNP-4 okazała się skuteczna wobec szczepów

*E.coli* i *Enterobacter aerogenes*, a także wykazała zdolność hamowania wirusa HIV *in vitro* [147].

W organizmie ludzkim oznaczono sześć  $\beta$ -defensyn, hBD-1-6 (human  $\beta$ -Defensins). W  $\beta$ -defensynach mostki dwusiarczkowe znajdują się pomiędzy cysteinami w pozycji 1-5, 2-4 i 3-6. Syntetyzowane są konstytutywnie lub w wyniku indukcji LPS bądź cytokinami zapalnymi (INF- $\gamma$ , TNF, IL- $\beta$ ) przez keratynocyty i komórki nabłonkowe rogówki, spojówki, układu oddechowego, pokarmowego i moczowo-płciowego [138, 146]. Defensyny hBD-1 i hBD-3 wytwarzane są konstytutywnie przez nabłonek rogówki i spojówki, podczas gdy ekspresja hBD-2 jest indukowana stanem zapalnym lub zakażeniem w obrębie tkanki [34, 148]. Synteza hBD-2 następuje w odpowiedzi na obecność bakteryjnego LPS lub prozapalnej cytokiny (IL)-1 $\beta$  [36, 149-151]. Obecność cytokin stymuluje uwalnianie dodatkowej ilości hBD-3 do filmu łożowego [33, 36, 149, 150].

### **Katelicydyny**

Katelicydyny składają się z 12-97 reszt aminokwasów. Wytwarzane są we wczesnych stadiach różnicowania neutrofilii. Występują w formie propeptydów, a następnie na skutek proteolizy przekształcane są do aktywnych związków. Katelicydyny posiadają właściwości przeciwwzapalne, immunomodulujące oraz szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego [152]. Wpływają na proces gojenia ran, angiogenezy oraz uwalnianie cytokin i histaminy. Dotychczas zidentyfikowane zostały w organizmach człowieka, krów, świń, królików, drobiu i myszy [145].

W neutrofilach świń zidentyfikowano aż 11 katelicydyn, w tym protegryny 1-5 oraz mieloidalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe świni PMAP (ang. pig myeloid antimicrobial peptide). Do tej grupy związków należą także baktencyny i indolicydyna, zidentyfikowane w neurofilach bydłowych oraz CATH-B1 i CATH 1-3 wyizolowane u kurcząt [153, 154].

LL-37 jest jedyną dotychczas opisaną i wyizolowaną z organizmu ludzkiego katelicydyną. Jest aktywnym kationowym peptydem o liniowej,  $\alpha$ -helikalnej strukturze, zbudowanym z 37 aminokwasów, bogatym w reszty lizyny i argininy. Powstaje w wyniku reakcji proteolitycznej z nieaktywnego białka prekursorowego hCAP18, kodowanego przez pojedynczy gen *cAMP*. Nieaktywny propeptyd hCAP18 pod wpływem proteiny 3 w neutrofilach ulega aktywacji do czynnego peptydu LL-37 [37, 155, 156]. Syntezę peptydu LL-37 obserwuje się w komórkach

nabłonkowych rogówki, spojówki (po indukcji), komórkach dendrytycznych, monocytach/makrofagach i limfocytach [157, 158]. W warunkach stanu zapalnego uwalniana jest dodatkowo z ziarnistości neutrofilii w miejscu infekcji [37]. Aktywny peptyd wykazuje aktywność bakteriobójczą w stosunku do bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes* i wankomycynoopornych enterokoków VRE - *Vancomycin-Resistant Enterococcus*) i Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli*) już w niskim zakresie stężeń [37, 159]. Jednakże wrażliwość peptydu na sól fizjologiczną i obecność dwuwartościowych jonów znacznie redukuje bakteriobójcze właściwości i w rezultacie ogranicza zastosowanie w monoterapii zakażeń [122, 160, 161].

Rola tego peptydu w układzie odpornościowym oka jest ściśle związana z właściwościami immunomodulującymi. LL-37 wykazuje zdolność przyciągania komórek immunologicznie kompetentnych (monocytów, neutrofilii, komórek T, komórek tucznych) do miejsca zapalenia oraz indukuje uwalnianie cytokin prozapalnych [138, 162, 163]. Istotną cechą peptydu jest zdolność wiązania i neutralizowania bakteryjnego LPS co zapobiega wystąpieniu zjawiska wstrząsu septycznego [164]. LL-37 wykazuje także aktywność wobec HSV-1 oraz adenowirusom [158].

### **Histatyny**

Histatyny składają się z różnych aminokwasów, z przewagą reszt histydyny. Obecne w ślinie, stanowią istotną część układu odpornościowego jamy ustnej, zapobiegając chorobom dziąseł i próchnicy. W badaniach *in vitro* udowodniono przeciwwgrzybicze właściwości histatyn wobec grzybów z rodzaju *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* oraz wobec bakterii *Streptococcus mutant* i *Porphyromonas gingivalis* [165-167]. Najszerszej przebadanym związkiem tej grupy jest histatyna 5, odznaczająca się najwyższą skutecznością wobec *Candida spp.* [168, 169]. Wykazano natomiast, że histatyna 1 o słabych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych ułatwia adhezję komórkową, poprawia integrację tytanowych implantów stomatologicznych i ortopedycznych z tkankami miękkimi [170].

## 4.2. Mechanizm działania endogennych peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Mechanizm działania większości AMP opiera się na interakcji z błoną komórkową bakterii, co powoduje jej dezintegrację. Niektóre związki działają również na zasadzie hamowania syntezy białek i składników ściany komórkowej. Innymi zidentyfikowanymi mechanizmami ich działania jest hamowanie aktywności enzymów oraz zaburzenia replikacji DNA lub RNA, co skutkuje blokowaniem funkcji komórkowych i prowadzi do śmierci komórki docelowej. Znane są także związki, których mechanizm działania opiera się na uwalnianiu ATP z komórek lub inhibicji ekspresji białek strukturalnych [171, 172].

Podstawowymi właściwościami AMPs warunkującymi ich aktywność przeciwdrobnoustrojową jest posiadanie dodatniego ładunku cząsteczki oraz właściwości amfipatycznych. Zdecydowana większość peptydów kationowych łączy się z ujemnie naładowanymi składnikami błon komórkowych drobnoustrojów. W przypadku bakterii Gram-ujemnych oddziałują z lipopolisacharydem, a w przypadku bakterii Gram-ujemnych z kwasem tejchojowym i peptydoglikanem. Z powodu oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych, dochodzi do przemieszczania się lipidów co prowadzi do dezintegracji dwuwarstwowej struktury. W wyniku powstałych naprężeń, następuje depolaryzacja i fragmentacja błony. W dalszej kolejności dochodzi do niekontrolowanego przemieszczania się jonów i związków organicznych oraz ucieczka ATP z komórki i napływ wody, co w efekcie prowadzi do lizy komórki docelowej [173].

Ze względu na rodzaj interakcji peptydów z błoną komórkową oraz mechanizmu jej niszczenia wyróżnia się kilka modeli błonowego działania peptydów.

Model dywanowy zakłada, że peptydy układając się równolegle do płaszczyzny błony ulegają absorpcji, a po osiągnięciu stężenia progowego wykazują właściwości podobne do detergentów. Przerwanie ciągłości błony i wyciek składników wewnątrzkomórkowych jest wynikiem zerwania wiązań lipidowych. Mechanizm tego modelu jest przykładem na to, że AMPs mogą niszczyć komórki bez formowania porów błonowych. Taki mechanizm potwierdzono dla peptydu LL-37 [174, 175].

Według modelu „klepek beczki” peptydy przenikają do dwuwarstwowej struktury prostopadle do jej płaszczyzny i formują w niej kanały. Peptydy w tym modelu układają się tak, aby ich hydrofilne regiony peptydów skierowane były do światła formowanego

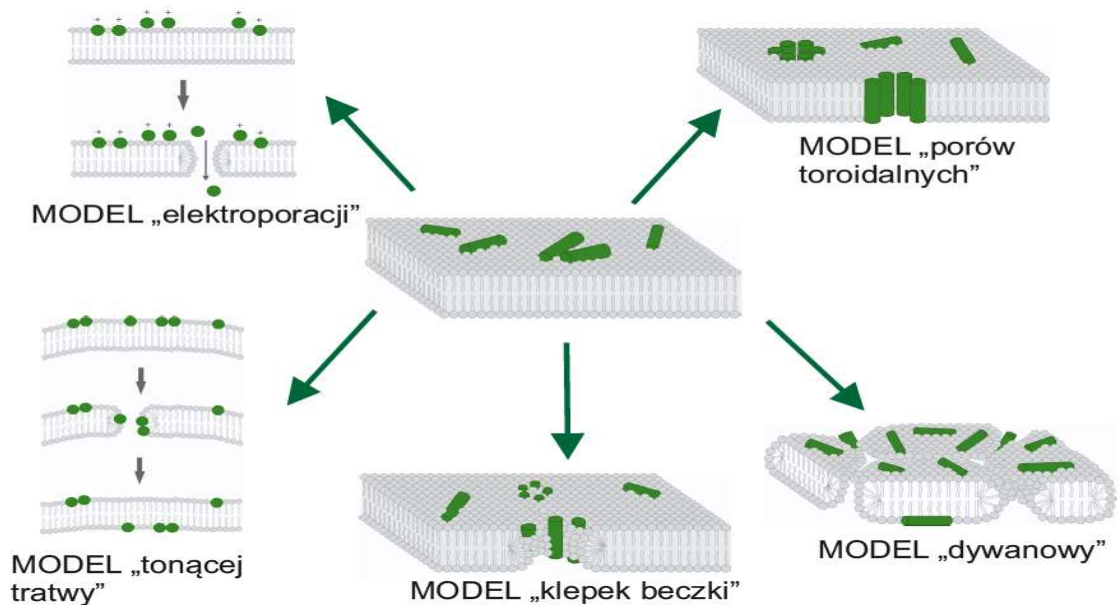
kanału, a regiony hydrofobowe peptydu układają się w kierunku acylowych łańcuchów dwuwarstwy lipidowej błony. Powstałe w błonie pory skutkują wyciekaniem elementów wewnątrzkomórkowych. Ułożenie peptydu przypomina beczkę złożoną z klepek (peptydów) i jest charakterystycznym modelem dla peptydów o strukturze  $\alpha$ -helisy lub  $\beta$ -kartki. Przykładem AMPs oddziałujących w ten sposób są proteogryny [173].

Zgodnie z modelem „porów toroidalnych” peptydy zakotwiczone są w błonie pod różnym kątem, a powstałe pory wyścielane są częściowo peptydami i głowami fosfolipidów. W odróżnieniu do modelu „klepek beczki” pory toroidalne powstają na skutek zaburzenia w oddziaływaniach błonowych [176]. Przykładem peptydów prezentujących ten mechanizm działania są magaininy.

Model „elektroporacji” zakłada, że w wyniku oddziaływania peptydów obdarzonych ładunkiem dodatnim z ujemnie naładowaną błoną, następuje wytworzenie się różnicy potencjału elektrycznego, prowadząc do powstania w jej obrębie porów.

Zgodnie z modelem „tonącej tratwy” peptydy powodują zaburzenie równowagi masy w obrębie dwóch warstw błony, a w wyniku przenikania w jej strukturę formowane są tymczasowe pory powodujące wzrost jej przepuszczalności [172, 177].

Na rycinie 7 przedstawiono modele błonowego mechanizmu działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych.



**Rycina 7.** Mechanizmy działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych [172-177].



Niespecyficzny mechanizm działania AMPs oparty na interakcjach z błoną komórkową pozwala spodziewać się niskiego ryzyka rozwoju oporności drobnoustrojów w odróżnieniu od antybiotyków konwencjonalnych, które wiążą się z określonymi celami w komórce [178]. Z drugiej strony nieswoisty model działania tych związków jest w farmakologii uznawany za niekorzystny ze względu na potencjalną toksyczność. Powszechne występowanie w organizmie ludzkim pozwala przypuszczać, że związki mogą być bezpieczne. Brak toksyczności w stosunku do komórek eukariotycznych może wynikać z obecności cholesterolu w błonie komórkowej oraz asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów [112]. Przypuszczenia te potwierdzają pozytywne wyniki otrzymane w licznych badaniach nad zastosowaniem AMPs w modelach zakażeń bakteryjnych *in vivo* [179].

#### **4.3. Aktywność peptydów w stosunku do biofilmu**

Liczne doniesienia naukowe potwierdziły aktywność AMPs wobec biofilmu *in vitro* oraz *in vivo* [180-183]. Działając poprzez różne mechanizmy działania, AMP mogą eliminować biofilm we wszystkich fazach rozwoju.

AMP wykazują zdolność eliminacji dojrzałego biofilmu, poprzez zakłócanie mechanizmu QS oraz zdolność penetracji macierzy EPS i niszczenia komórek umieszczonych w głębszych warstwach struktury biofilmu [184, 185].

Badania nad ludzką katelicydyną LL-37 oraz próby zastosowania innych peptydów takich jak citropina 1.1, temporyna A czy iseganan (IB-367) na zwierzęcych modelach infekcji związanych z biofilmem potwierdziły ich skuteczność w eradykacji biofilmu. W szczurzym modelu infekcji odcewnikowych citropina 1.1 okazała się skutecznym środkiem przeciwbakteryjnym wobec *S. aureus* wzrastających w formie biofilmu. Podanie peptydu z minocykliną i rifampicyną wzmacnia ich działanie wobec zakażeń związanych z biofilmem [134]. W mysim modelu przewlekłej zainfekowanej rany, temporyna A istotnie hamuje rozwój MRSA oraz wspomaga procesy gojenia. Iseganan (IB-367) jest aktywny wobec biofilmów formowanych przez bakterie Gram-dodatnie [132].

Poprzez oddziaływania elektrostatyczne z błoną komórkową drobnoustrojów AMPs, hamują adhezję do kolonizowanej powierzchni, zapobiegając formowaniu się biofilmu. Pierwszym zidentyfikowanym peptydem antybiofilmowym była ludzka katelicydyna LL-37, która wykazuje zdolność hamowania procesu formowania się

biofilmu i rozpraszania wstępnie utworzonych struktur *P. aeruginosa* już w stężeniu poniżej MIC (0,05 ug/mL) [160]. Mechanizm działania peptydu oparty jest na zakłócaniu początkowej fazy adhezji bakteryjnej zależnej od pilli typu IV oraz blokowania komunikacji QS. LL-37 hamuje również przyleganie i rozwój biofilmu *S. epidemidis* [160].

Powlekanie biomateriałów czynnikami aktywnymi stanowi obiecującą opcję profilaktyki zakażeń związanych z biofilmem. Unieruchomienie AMPs na powierzchni biomateriału lub zapewnienie kontrolowanego profilu ich uwalniania z wnętrza matrycy może zapobiegać przyleganiu patogenów oraz stanowić strategię dostarczania terapeutyków w miejscu infekcji. Przeciwbakteryjne powłoki na biomateriałach mogą ograniczyć rozwój uporczywych, często nawracających, trudnych do leczenia i kosztownych zakażeń towarzyszących stosowaniu materiałów medycznych. Badania przeprowadzone przez Dutta i wsp. potwierdziły biokompatybilność i skuteczność antybakteryjnej powłoki zawierającej meliminę, peptydu zbudowanego z fragmentów mellityny

i protaminy [186]. Peptyd unieruchomiony na soczewkach kontaktowych, skutecznie zapobiega adhezji *P.aeruginosa* i *S.aureus*, patogenów odpowiedzialnych za rozwój CLPU i CLARE [187]. W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na królikach i świnkach morskich, u których wywołano owrzodzenie i zapalenie spojówki, aplikacja soczewek kontaktowych z meliminą wpłynęła istotnie na redukcję objawów zakażenia [188]. Immobilizacja przeciwdrobnoustrojowego peptydu SESB2V (analog  $\beta$ -defensyny) na tytanowej powierzchni okazała się skuteczna w profilaktyce okołoperacyjnej infekcji rogówki na króliczym modelu zakażenia rogówki [189]. Dodatkowo powlekanie peptydem przeciwdrobnoustrojowym implantu rogówki, poprawiło integrację implantu z tkanką i proces gojenia się rany [190].

Kluczowym aspektem w opracowaniu skutecznych i bezpiecznych strategii prewencji i zwalczania oraz przeciwdziałania skutkom obecności tej formy życia drobnoustrojów jest poznanie mechanizmów formowania i funkcjonowania biofilmu wraz z identyfikacją specyficznych celów charakterystycznych dla tej struktury [183, 191]. Badania syntetycznych peptydów 1008 i DJK-5 wykazały, że podstawą ich aktywności antybiofilmowej jest bezpośrednia modulacja ostrej komórkowej odpowiedzi na stres. Bakterie w warunkach utrudnionego dostępu do składników odżywczych, ograniczają swój metabolizm, zwiększając wydzielanie drugorzędowych cząsteczek przekąźnikowych - czterofosoranu guanozyny (ppGpp). Aktywność przeciwbiofilmowa

niektórych peptydów wynika z wiązania i inaktywacji cząsteczek ppGpp lub blokowaniu ich syntezy [183]. Badania *in vivo* z użyciem mysiego modelu ropnia skórno wywołanego *P. aeruginosa* potwierdziły wpływ peptydów DJK-5 i 1018 na modulowanie odpowiedzi na stres poprzez zakłócanie wewnątrzkomórkowej homeostazy ppGpp [180]. W oparciu o badania przeprowadzone na peptydzie P1 i rybich analogach HDPs (piscydyna 1 i piscydyna 2) z wykorzystaniem błon mikrobiologicznych i modelowych, sugeruje się, że peptydy mogą działać wobec biofilmu również poprzez interferencję ze składnikami pozakomórkowej macierzy (polimery, eDNA) [183, 191].

Zróżnicowane mechanizmy działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych wobec biofilmu wskazują na szeroki potencjał do zastosowania klinicznego. Ukierunkowanie na szlaki regulacyjne zapewnia szerokie spektrum działania w tym wobec patogenom wieloopornym [118]. W przeciwieństwie do konwencjonalnych antybiotyków, peptydy mogą działać poprzez wiele mechanizmów. Sugeruje to obniżone ryzyko rozwoju oporności w terapiach zakażeń związanych z biofilmem.

#### **4.4. Peptydy syntetyczne projektowane na podstawie AMPs**

Pomimo szeregu zalet, zastosowanie AMPs w powszechnej terapii jest utrudnione ze względu na wysokie koszty otrzymywania peptydów oraz problemy wynikające z biologicznych oraz fizykochemicznych właściwości tych związków m.in. podatność na proteolizę, miejscową i/lub ustrojową potencjalną toksyczność, zmniejszoną aktywność w obecności soli fizjologicznej, wrażliwość na zmiany pH czy możliwość wywołania reakcji alergicznych [192]. W rezultacie obecnie kliniczne zastosowanie AMPs jest zasadniczo ograniczone do preparatów do stosowania miejscowego.

Warunki środowiskowe mogą mieć znaczący wpływ na drugorzędową strukturę peptydu i zależną od niej aktywność przeciwdrobnoustrojową [193, 194]. W związku z powyższym prowadzone są liczne badania, których celem jest otrzymywanie skutecznych, stabilnych związków o optymalnych właściwościach. Stosowane są modyfikacje chemiczne peptydów, takie jak delecja i/lub podstawienia reszt aminokwasowych, cyklizacja łańcucha lub projektowanie retro-analogów. Prowadzone są badania nad opracowaniem krótszych aktywnych analogów AMPs o niższych kosztach produkcji oraz projektowaniem nowych sekwencji na podstawie AMPs. W celu poprawy właściwości farmakologicznych stosuje się także modyfikacje sekwencji polegające na wprowadzeniu

reszt D-aminokwasów lub sprzęganie AMPs z kwasami tłuszczowymi. Dzięki takiemu podejściu związki mogą nie być podatne na działanie proteolityczne enzymów bakteryjnych lub wykazywać silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe [154, 195]. Natomiast projektowanie nowych sekwencji na podstawie AMPs lub tworzenie związków hybrydowych stanowi strategię optymalizacji właściwości biologicznych związków. Projektowanie analogów AMPs ma na celu zwiększenie ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej przy jednoczesnym wykluczeniu działań niepożądanych w stosunku do ludzkiego organizmu. Wiele uwagi poświęca się także optymalizacji metod otrzymywania związków peptydowych [196].

Obecnie najczęściej stosowane strategie optymalizacji peptydów obejmują zmianę składu aminokwasów, tworzenie peptydów hybrydowych oraz projektowanie związków strukturalnie i funkcjonalnie powiązanych, zwanych peptydomimetykami [181, 197-199].

#### **4.4.1. Analogi natywnych AMPs**

Projektowanie analogów natywnych AMPs opiera się głównie na skracaniu sekwencji na końcu łańcucha peptydowego oraz delecji, czego efektem są kongenery.

Do chwili obecnej zaprojektowano liczne aktywne kongenery defensyn, CAP18 i innych AMPs, pochodzących od różnych organizmów. Wiele spośród z nich zostało zakwalifikowanych do badań klinicznych [122].

Pierwszym związkiem poddanym testom klinicznym był pexiganan (MSI-78), analog magaininy. Przeciwdrobnoustrojowe właściwości natywnego peptydu zostały w tym przypadku wzmocnione poprzez delecję oraz substytucję poszczególnych reszt aminokwasowych resztami lizyny. Pomimo obiecujących wyników w leczeniu stopy cukrzycowej i szerokiego spektrum działania zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, FDA wycofała projekt badawczy w III fazie badań biorąc pod uwagę, że skuteczność analogu była porównywalna z terapią fluorochinolonową przy istotnie wyższych kosztach otrzymywania substancji aktywnej [122].

Analog indolicydyny - omiganan (MBI-226) wykazał potencjał w profilaktyce zakażeń odcewnikowych. Jednak ze względu na niedostateczną skuteczność związek nie został zakwalifikowany do fazy IIIb badań. Obecnie trwają badania kliniczne (II fazy) do miejscowego podania 1,75% żelu omigananu w leczeniu łojotokowego zapalenia skóry [200-202].

Inny analog indolicydyny - MX-594AN pomyślnie zakończył III fazę badań klinicznych dotyczących stosowania go w leczeniu trądziku. Związek prezentuje wysoką aktywność wobec bakterii *Propionibacterium acnes*, wykazującej oporność wobec konwencjonalnej terapii erytromycyną i klindamycyną [122, 203].

Peptyd demegen (P113) zaprojektowany w oparciu o właściwości przeciwdrobnoustrojowe naturalnie występującej histatyny, ukończył II fazę badań klinicznych w stosowaniu pod postacią płynu do płukania jamy ustnej w leczeniu kandydozy u pacjentów zarażonych wirusem HIV. Analog wykazuje zdolność zapobiegania zapaleniu dziąseł i chorób przyzębia o etiologii grzybiczej [204, 205].

Analog cekropiny, shivia 11 potwierdził aktywność wobec szerokiego spektrum izolatów pochodzących z infekcji ocznych, w tym bakterii gentamycynoopornych [202, 206].

Aktywna 13-aminokwasowa sekwencja peptydu LL-37 warunkująca jego właściwości przeciwdrobnoustrojowe stanowiła podstawę do zaprojektowania i syntezy związków FK-13-a-1. i FK-13-a7. Krótkie, heliakalne analogi wykazały silniejszą aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii opornych na antybiotyki (MRSA, MDRPA i VREF), niż peptyd macierzysty. W badaniu synergizmu z chloramfenikolem analogi okazały się również skutecznymi środkami w eradykacji biofilmu wytwarzanego przez MDRPA, VREF i MRSA. Ponadto FK-13-a1 i FK-13-a7 utrzymały swoją aktywność w obecności soli fizjologicznych i ludzkiej surowicy [207].

Inną strategią optymalizacji właściwości związków jest tworzenie peptydowych hybryd poprzez łączenie aktywnych fragmentów peptydów natywnych. Zasadniczo peptydy hybrydowe łączą domeny funkcjonalne wielu peptydów w celu zwiększenia aktywności i zmniejszenia cytotoksyczności [208]. Przykładem tego typu modyfikacji jest nietoksyczny, przeciwdrobnoustrojowy peptyd hybrydowy CEMA (*cecropin-melittin hybryd peptide*) złożony z cekropiny A i melityny prezentujący działanie immunomodulujące.

W odróżnieniu od melityny hybryda CEMA, nie wykazuje właściwości hemolitycznych wobec komórek eukariotycznych przy zachowaniu aktywności przeciwdrobnoustrojowej [209]. Innym przykładem związku hybrydowego jest melamina, złożona z melityny i protaminy wykazująca wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową i niską toksyczność. Kowalencyjne sprzężanie melaminy z powierzchnią soczewek kontaktowych umożliwiły redukcję objawów klinicznych CLARE na modelu infekcji *P. aeruginosa* u świnek morskich. Poprzez koniugację skróconej sekwencji katelicydyny z inhibitorem trypsyny

otrzymano stabilny w płynach ustrojowych hybrydowy peptyd TIH3F. Dwufunkcyjny związek znacząco hamował formowanie się biofilmu *C. albicans* w stężeniu poniżej MIC, prezentując jednocześnie niską cytotoksyczność wobec ludzkich erytrocytów [210].

#### 4.4.2. Peptydomimetyki

Definicja peptydomimetyku obejmuje zasadniczo każdą, dowolną sekwencję zaprojektowaną w celu naśladowania cech strukturalnych i/lub aktywności biologicznych natywnych AMPs [211]. Peptydomimetyki zawierają w swej budowie niepeptydowe elementy strukturalne, co umożliwia uzyskanie alternatywnej struktury o optymalnych właściwościach. Ze względu na szerokie możliwości projektowania i strategię syntezy, peptydomimetyki stanowią obszerną i różnorodną grupę związków, obejmującą zarówno półsyntetyczne analogi jak i w pełni syntetyczne cząsteczki. Projektowanie peptydomimetyków zakłada przede wszystkim rozwiązanie problemu degradacji enzymatycznej i cytotoksyczności [211-213]. Nieograniczone możliwości modyfikacji cząsteczek, a także wprowadzanie zupełnie odmiennych struktur chemicznych umożliwiają projektowanie związków o precyzyjnie dostosowanych właściwościach farmakologicznych.

W oparciu o te założenia Raman i współ. zaprojektowali peptyd  $\beta$  o działaniu przeciwgrzybiczym i biofilmowym wobec *C. albicans*, który pozostał strukturalnie stabilny i aktywny w modelowym układzie moczowym [212]. Innym przykładem zaprojektowanego peptydomimetyku jest ultrakrótka kationowa sekwencja związku UP-5, którą stanowią wyłącznie arginina i bifenyloalanina. Związek wykazywał aktywność przeciw biofilmowi bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich przy stosunkowo niskiej toksyczności wobec ludzkich erytrocytów i komórek nabłonka nerki małpy Vero. Sugeruje się, że właściwości te wynikają z niewielkiego rozmiaru i niskiej hydrofobowości związku [213].

#### 4.4.3. Krótkie lipopeptydy

Krótkie lipopeptydy stanowią grupę syntetycznych związków zaprojektowanych w oparciu o właściwości natywnych AMPs warunkujące ich aktywność przeciwdrobnoustrojową. Przeprowadzone dotychczas badania potwierdzają ich wysoką aktywność w stosunku do szerokiego spectrum mikroorganizmów [196, 214]. Związki tej grupy wykazują podobieństwo strukturalne do endogennych antybiotyków

peptydowych poprzez sumaryczny ładunek dodatni oraz amfipatyczność. Charakterystyczną cechą lipopeptydów jest krótka sekwencja aminokwasowa połączona z kwasem tłuszczowym. Zaletą, zaprojektowanych w ten sposób związków, jest istotnie krótszy czas syntezy i niższe koszty produkcji w porównaniu do peptydów AMPs o długich sekwencjach aminokwasowych [215].

Krótkie syntetyczne lipopeptydy zbudowane są z krótkiego łańcucha peptydowego (2 – 4 aminokwasów), zawierającego zasadowe aminokwasy takie jak arginina, lizyna, obdarzające cząsteczki ładunkiem dodatnim. Warunek amfipatyczności został osiągnięty poprzez wprowadzenie do sekwencji silnie hydrofobowych reszt kwasów tłuszczowych, np.: kwasu heksadekanowego (palmitynowego), tetradekanowego (mirystynowego), kwasu oktanowego (kaprylowego), dekanowego (kaprynowego) lub dodekanowego (laurynowego) [216-218].

Wyżej wymienione cechy determinują wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową poprzez niespecyficzny mechanizm działania oparty na permeabilizacji błony komórkowej drobnoustrojów [219]. Dodatkowo naładowane lipopeptydy wiążą się ze składnikami błony komórkowej drobnoustrojów powodując destabilizację dwuwarstwowej struktury lipidowej, tworząc w obrębie błony komórki docelowej micelle i kanały. Udowodniono, że charakterystyczne dla tej grupy związków właściwości hydrofobowe warunkują wysoką aktywność przeciwbakteryjną wobec komórek docelowych [120]. Hydrofobowość zwiększa przepuszczalność błony komórkowej umożliwiając dyfuzję substancji w głąb komórki docelowej, co determinuje aktywność wobec komórki drobnoustroju. Jednak wraz ze wzrostem hydrofobowości obserwuje się także wzrost właściwości hemolitycznych, co stanowi poważne ograniczenie dla zastosowania związków w terapii [112, 220]. Wykazano, że długość łańcucha alkilowego wzmacnia powinowactwo związku do błon docelowych [218, 221-223]. Poprzez wbudowywanie pomiędzy lipidy błonowe, łańcuch alkilowy zaburza hydrofobowy rdzeń dwuwarstwy lipidowej błony prowadząc do jej dysfunkcji, co skutkuje szybką lizą komórki [215, 222, 224]. Dodatkowo zmiana hydrofobowości związku wpływa na jego tendencję do oligomeryzacji, zwiększając stabilność związku i odporność na działanie proteaz [215, 225].

Usunięcie reszt kwasu tłuszczowego skutkuje niemal całkowitą utratą aktywności przeciwdrobnoustrojowej, natomiast zastąpienie nawet jednego aminokwasu z krótkiej sekwencji innym, otrzymaniem cząsteczek o odmiennych właściwości biologicznych [215, 221, 226].

Markovitzki i wsp. zsyntetyzowali grupę krótkich lipopeptydów zawierających cztery aminokwasy (jeden o konfiguracji D) w połączeniu z kwasami tłuszczowymi o łańcuchach zawierających 12, 14 lub 16 atomów węgla. W badaniach *in vitro* związki prezentowały szerokie spektrum działania wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów. Wyniki badań wykazały, że sekwencja aminokwasowa i długość łańcucha węglowego determinuje specyficzność związków wobec bakterii, grzybów i komórek ssaków, w oparciu o błonowy mechanizm działania, prowadząc do szybkiej lizy komórki [226]. W innym projekcie badawczym, wykazano, że wprowadzenie do struktury enancjomerów aminokwasów o konfiguracji D wzmacnia ich aktywność mikrobiologiczną i zmniejsza wrażliwość na działanie proteaz [227-229].

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi krótkie syntetyczne lipopeptydy prezentują silną aktywność także wobec klinicznych szczepów bakterii i grzybów w tym wobec szczepów opornych na konwencjonalne środki przeciwdrobnoustrojowe [230-233].

Krótkie lipopeptydy zawierające kwas heksadekanowy wykazują wysoką aktywność mikrobiologiczną. Peptyd C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub> jest jednym z najszerzej zbadanych lipopeptydów o silnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz szerokim spektrum działania, w tym wobec szczepów opornych na antybiotyki oraz związanych z biofilmem [231]. Jego aktywność wobec biofilmu formowanego przez kliniczne szczepy *S. aureus* jest porównywalna do działania wankomycyny. Ponadto w terapii skojarzonej z wankomycyną C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub> wzmacniał działanie antybiotyku, skutecznie zapobiegając zakażeniom na szczurzym modelu infekcji przeszczepów naczyńnych [234].

Badania lipopeptydów C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub> i C<sub>16</sub>-RR-NH<sub>2</sub> wykazały ich zdolność do zapobiegania formowania i eradykacji biofilmu *C. albicans* w stężeniach niższych od wartości MIC [235]. Pomimo wysokiego potencjału przeciwdrobnoustrojowego, peptyd C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub> nie kwalifikuje się do zastosowania w terapii ze względu na wysoką toksyczność wobec komórek ludzkich już przy niskich stężeniach [236].

Badania krótkich sekwencji peptydów zawierających kwas heksadekanowy z resztami alaniny, glicyny, leucyny i lizyny wykazały ich silną aktywność wobec szczepom zarówno MSSA jak i MRSA [237]. Związki zawierające reszty tryptofanu i ornityny w połączeniu z kwasem heksanowym, oktanowym, dekanowym, dodekanowym, tetradekanowym i heksadekanowym [224] oraz kombinacje kwasu dodekanowego z krótkimi sekwencjami złożonymi z ornityny i cysteiny wykazały podobne działanie [231].



Syntetyczny lipopeptyd LP16, powstały w wyniku koniugacji kwasu tetradekanowego (C<sub>14</sub>) z trzema resztami ornityny, okazał się skutecznym środkiem przeciwdrobnoustrojowym m.in. wobec *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* i MRSE (MIC w zakresie stężeń 1,5 - 6,25 µg/mL). Związek prezentował wysoką selektywność wobec bakterii - nie wywołał hemolizy w testach *in vitro* oraz okazał się stabilny i odporny na działanie trypsyny. Co więcej, lipopeptyd nie indukował oporności u *S. aureus*, poddawanych kolejnym pasażom. Wymienione właściwości wraz z stosunkową prostą syntezą wskazują na duży terapeutyczny potencjał tego związku [238].

Z uwagi na silną aktywność mikrobiologiczną oraz właściwości powierzchniowo czynne wynikające z ich budowy, krótkie lipopeptydy mogą znaleźć zastosowanie w przeciwdrobnoustrojowych preparatach dermatologicznych pełniąc jednocześnie funkcje biodegradowalnych surfaktantów i substancji aktywnej [236]. Wyniki badań nad lipopeptydami sprzężonymi z kwasem heksadekanowym, które wbudowano w biodegradowalne polimery, wykazały, że związki te mogą być potencjalnym kandydatem do stosowania w jamie ustnej jako skuteczne środki przeciwdrobnoustrojowe o przedłużonym działaniu. Najbardziej aktywne związki C<sub>16</sub>-KAAK-NH<sub>2</sub> i C<sub>16</sub>-KLLK-NH<sub>2</sub>, wykazały zdolność eradykacji biofilmu szczepów odpowiedzialnych za infekcje jamy ustnej [221].

Ze względu na potwierdzone właściwości przeciwdrobnoustrojowe i niższe koszty syntezy krótkich lipopeptydów zasadne jest kontynuowanie badań w kierunku potencjalnego zastosowania w profilaktyce lub terapii zakażeń związanych z biofilmem.

## II. CEL PRACY

Powszechne stosowanie soczewek kontaktowych wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia powikłań, w tym rozwoju infekcji bakteryjnych. Powierzchnia soczewek stanowi matrycę sprzyjającą adhezji drobnoustrojów, zwiększając ryzyko rozwoju zakażeń związanych z biofilmem. Charakterystyczną cechą tego typu infekcji są trudności w eliminacji oraz zdolność do nawracania po wycofaniu środków przeciwdrobnoustrojowych.

W związku z niską skutecznością konwencjonalnej antybiotykoterapii pojawia się potrzeba poszukiwania alternatywnych narzędzi do efektywnej walki z biofilmem bakteryjnym. Ze względu na potwierdzoną silną aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz niskie ryzyko rozwoju oporności mikrobiologicznej krótkie lipopeptydy stanowią obiecującą alternatywę dla standardowej antybiotykoterapii.

Celem pracy była ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych krótkich lipopeptydów w odniesieniu do ich potencjalnego zastosowania w eradykacji oraz zapobieganiu formowania biofilmu bakteryjnego na powierzchni soczewek kontaktowych. Na realizację powyższego celu składały się następujące cele cząstkowe:

- Synteza i oczyszczanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych o sekwencjach naturalnych oraz syntetycznych krótkich lipopeptydów, zaprojektowanych w oparciu o właściwości natywnych AMPs
- Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych otrzymanych związków wobec referencyjnych szczepów bakterii w formie wolnopływającej
- Ocena wpływu otrzymanych związków na formowanie biofilmu bakteryjnego na powierzchni polistyrenowej oraz soczewkach kontaktowych
- Ocena badanych związków w kierunku zdolności do eradykacji biofilmu bakteryjnego z powierzchni polistyrenowej oraz soczewek kontaktowych
- Wstępna ocena bezpieczeństwa zastosowania badanych związków w profilaktyce i terapii infekcji związanych z tworzeniem biofilmu na soczewkach kontaktowych

### III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

#### 1. MATERIAŁY I METODY

##### 1.1. Odczynniki i materiały

- 1,2-etanoditiol, EDT, Sigma-Aldrich, Niemcy
- Acetaldehyd, Sigma-Aldrich, Niemcy
- Acetonitryl, Scharlau, Hiszpania
- Bufor fosforanowy o pH 7,4 (PBS), AppliChem GmbH, Darmstadt, Niemcy
- Bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylo-1H-tetrazoliowy: Odczynnik MTT, Sigma-Aldrich, USA
- Chloramfenikol, Sigma-Aldrich, USA
- p-Chloranil, Sigma-Aldrich, Niemcy
- Ciekły Azot, AirProducts, Polska
- Cyprofloksacyna, Sigma-Aldrich, USA
- Dichlorometan (DCM), Chempur, Polska
- Dulbecco's Minimum Essential Medium, Sigma Aldrich, Niemcy
- Eter dietylowy, Chempur, Piekary Śląskie, Polska
- Ezy jednorazowe, Alchem, Polska
- L-aminokwasy z osłoną Fmoc, Orpegen, Niemcy
  - Fmoc-L-Ala-OH
  - Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH
  - Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH
  - Fmoc-L-Cys(Trt)-OH
  - Fmoc-Gly-OH
  - Fmoc-L-Ile-OH
  - Fmoc-L-Leu-OH
  - Fmoc-L-Lys(Boc)-OH
  - Fmoc-L-Ser(tBu)-OH
  - Fmoc-L-Phe-OH
  - Fmoc-L-Pro-OH
  - Fmoc-L-Val-OH
- Żywica polistyrenowa Fmoc-Rink Amide AM, osadzenie 1,0 mmol/g, 100-200 mesh, 1% DVB, Opregen Pharma, Niemcy
- Kriofiolki do przechowywania szczepów, Carl Roth, Niemcy

- Kwas askorbinowy, Sigma-Aldrich, USA
- Kwas dekanowy, Merck, Niemcy
- Kwas dodekanowy, Merck, Niemcy
- Kwas heksadekanowy, Merck, Niemcy
- Kwas tetradekanowy, Merck, Niemcy
- Kwas trifluorooctowy (TFA), Apollo Scientific, Wielka Brytania
- Line-Antybakteria 70 (Lineal Chemicals Sp. z o. o. Polska)
- Metanol, VWR, Polska
- *N,N'*-diizopropylkarbodiimid (DIC), Carbolution Chemicals GmbH, Niemcy
- *N,N*-dimetyloformamid (DMF), Honeywell, Niemcy
- Naczynia do hodowli komórkowych, VWR, Belgia
- OxymaPure, 2-cyjano-2-(hydroksyimino)octan etylu, Iris Biotech GmbH, Niemcy
- Pęsety jałowe
- Piperydyna, Iris Biotech GmbH, Niemcy
- Płytki polistyrenowe 24-dołkowe, Orange Scientific, Belgia
- Płytki polistyrenowe 96-dołkowe, Kartell, Włochy
- Podłoże Mueller Hinton Broth II (MBH II), Biocorp, Polska
- Probówki polistyrenowe sterylne, MedLab, Polska
- Resazuryna, Sigma-Aldrich, USA
- Sterylne szalki Petriego, MedLab, Polska
- Triizopropylsolan (TIS), Iris Biotech GmbH, Niemcy
- Triton X-100, Sigma-Aldrich, USA
- Trypsyna (0,25% roztwór EDTA), Sigma-Aldrich, USA
- Woda oczyszczona, < 4,3  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej

## 1.2 Aparatura

- Autoklaw niskociśnieniowy TAU CLAVE 3000, TAU STERIL, Włochy
- Demineralizator HLP5 Hydrolab, Polska
- Inkubator z wytrząsaniem KS 4000i control, IKA Werke GmbH, Niemcy

- Inkubator ESCO Culture CO<sub>2</sub>, Esco Technologies, USA
- Kolumna analityczna, Phenomenex, Luna C18(2) (4,6 × 150 mm, średnica ziaren wypełnienia 5,0 μm, wielkość porów 100 Å)
- Kolumna analityczna, Phenomenex, Luna C18(2) (3,0 × 100 mm, średnica ziaren wypełnienia 5,0 μm, wielkość porów 100 Å)
- Kolumna semipreparatywna, Phenomenex Gemini-NX C18 (21,20 × 100 mm, średnica ziaren wypełnienia 5,0 μm, wielkość porów 110 Å)
- Komora bezpieczeństwa klasy II ESCO, Esco Technologies, USA
- Komora laminarnym przepływem powietrza, Alpina, Polska
- Liofilizator Alpha 1-2 plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Niemcy
- Łaźnia ultradźwiękowa DEMA, Dema, Chiny
- Łaźnia ultradźwiękowa ULTRON, Ultron Zakład Urządzeń Elektrycznych, Polska
- Łaźnia wodna poliwęglanowa wykonana na zamówienie
- Mieszadło magnetyczne wielostanowiskowe Multistirrer 15, Velp Scientifica, Włochy
- Multimiernik do pomiaru pH i przewodności, Mettler Toledo, Inc. Columbus, USA
- Naczynko reakcyjne do SPPS – wykonane na zamówienie
- Pipety automatyczne Discovery Comfort, PZ HTL SA, Polska
- Soczewki kontaktowe, 1-Day Acuvue Moist zawierające Etafilcon A, Johnson&Johnson Vision Care, USA
- Spektrofotometr Thermo Genesis 10UV, Thermo Fisher Scientific, USA
- Spektrofotometryczny czytnik mikroplątek Epoch, Bio Tek, USA
- Spektrofotometryczny czytnik mikroplątek, Thermo Fisher Scientific, USA
- Spektrofotometr Thermo Genesis 10UV, thermo Fisher Scientific, USA
- Suszarka laboratoryjna SML, Zelmet, Polska
- Termometr Testo 925, Testo, Francja
- Waga analityczna AS 60/220/C/2, Radwag, Polska
- Waga analityczna WAS 160/X, Radwag, Polska
- Waga laboratoryjna WTB 200, Radwag, Polska

- Wirówka laboratoryjna, Hettich EBA 20
- Wyjaławiające filtry strzykawkowe Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Niemcy
- Wysokosprawny chromatograf cieczowy Kontron z detektorem UV-VIS z systemem do archiwizacji danych LP-Chrom, Kontron Instruments, Wielka Brytania
- Wysokosprawny chromatograf cieczowy Varian ProStar z detektorem UV-VIS z systemem do archiwizacji danych Galaxie, Varian, USA
- Wysokosprawny chromatograf cieczowy Waters Alliance e2695 z detektorem masowym ACQUITY QDa, Waters, USA
- Wytrząsarka LP-shaker, Lipopharm.pl, Polska

### 1.3 Szczepy referencyjne i warunki hodowli komórkowej

Badania przeprowadzono na bakteryjnych szczepach referencyjnych kojarzonych z zakażeniami okulistycznymi związanymi ze stosowaniem soczewek kontaktowych. Do badań wybrano trzy referencyjne szczepy bakterii Gram-dodatnich i trzy szczepy Gram-ujemnych, które zostały pozyskane z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (Polska Akademia Nauk, Wrocław).

**Tabela 1.** Referencyjne szczepy bakteryjne wytypowane do badań

Gram-dodatnie	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
Gram-ujemne	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
	<i>Proteus mirabilis</i>	PCM 543

Przed wykonaniem oznaczeń mikrobiologicznych bakterie hodowano w pożywce Mueller Hinton Broth II (MHB) przez 24 godziny, w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C. Po zakończonej inkubacji płynne zawiesiny drobnoustrojów odwirowywano (2500 obr./min, 10 minut), trzykrotnie płukano buforem fosforanowym (PBS) i ponownie zawieszano w świeżej pożywce MHB II tak by wartość końcowa ich zagęszczenia wynosiła  $5 \times 10^5$  CFU/ml. Tak sporządzone płynne hodowle drobnoustrojów wykorzystywane były do testów mikrobiologicznych.

## 1.4 Referencyjne związki przeciwdrobnoustrojowe

Do badań wykorzystano dwa związki przeciwdrobnoustrojowe - cyprofloksacynę i chloramfenikol, stosowane w konwencjonalnej terapii infekcji ocznych związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych.

## 1.5 Soczewki kontaktowe i płyny do soczewek

W pracach eksperymentalnych wykorzystywano dostępne na rynku jednodniowe, jałowe soczewki kontaktowe 1-Day Acuvue Moist zawierające Etafilcon A.

W badaniu skuteczności płynów do soczewek wykorzystano komercyjnie dostępne płyny o składzie przedstawionym w tabeli 2.

**Tabela 2.** Płyny do soczewek użyte w badaniu i ich skład

Płyn do soczewek	Skład
A	Cytrynian, Tetronic® 1304, aminometylopropanol, chlorek sodu, kwas borowy, Sorbitol, sól sodowa EDTA, Polyquad® (chlorek polidronium) 0,001%, Aldox® (miristoamidopropylo dimetyloamina) 0,0005%.
B	Kwas borowy, sól dwusodowa kwasu etylenodwuaminoczerooctowego, boran sodu, chlorek sodu, DYMED® (poliaminopropylo-biguanid) 0,0001%, HYDRANAT (hydroksyalkilofosfonian) 0,03%, Poloksamina 1%.

## 2. SYNTEZA I OCZYSZCZANIE PEPTYDÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH

W ramach prezentowanej pracy otrzymano 9 syntetycznych krótkich lipopeptydów oraz dwa peptydy naturalnie występujące w organizmach płazów (Tabela 4). Citropina 1.1 oraz temporyna A zostały użyte w badaniu jako związki odniesienia należące do grupy endogennych peptydów przeciwdrobnoustrojowych.

Syntezę i oczyszczanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Lipopeptyd  $(C_{10})_2$ -K<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> otrzymano w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Peptydy syntezowano manualnie na stałym nośniku polimerowym. Grupy  $\alpha$ -aminowe aminokwasów chronione były osłoną 9-fluorenylometoksykarbonylową (Fmoc). Do syntezy związków jako nośnika stałego użyto żywicy Fmoc-Rink Amide (1,0 mmol/g, 100-200 mesh). Syntezę prowadzono w naczynkach reakcyjnych zaopatrzonych w spieki, w temperaturze pokojowej.

Syntezę każdego związku prowadzono w skali 1 mmol (1 g żywicy). Żywicę umieszczano w dichlorometanie (DCM) na 30 minut celem spęcznienia.

Synteza przebiegała zgodnie z następującymi etapami:

- 1) Deprotekcja – usunięcie osłony Fmoc aminokwasu lub żywicy za pomocą 20% (v/v) roztworu piperydyny w dimetyloformamidzie (DMF).
  - 1 × 2 min
  - 1 × 20 min
- 2) Przemycanie nośnika stałego odpowiednimi rozpuszczalnikami według następującej kolejności:
  - DMF, 2 × 2 min
  - DCM/DMF (1:1, v/v), 2 × 2 min
  - DCM, 2 × 2 min
- 3) Potwierdzenie obecności wolnych grup aminowych wykonano testem chloranilowym. Test pozwala stwierdzić, czy *N*-końcowa grupa aminowa łańcucha peptydowego została odblokowana poprzez usunięcie ugrupowania Fmoc. W celu przeprowadzenia testu ok. 2 mg żywicy przenoszono do ampułki szklanej i dawano kolejno 100  $\mu$ l 2% roztworu *p*-chloranilu w DMF oraz 100  $\mu$ l



2% roztworu aldehydu octowego w DMF. Zabarwienie ziaren żywicy na niebiesko-zielony kolor wskazywało na obecność wolnych grup aminowych.

- 4) Acylowanie – tworzenie wiązania peptydowego. Do naczynia reakcyjnego z żywicą dodawano równomolowe ilości chronionego aminokwasu (lub kwasu), DIC oraz OxymaPure, rozpuszczone w mieszaninie DMF/DCM (1:1, v/v). Naczynko reakcyjne umieszczano na wytrząsarce. Proces sprzęgania prowadzono przez 1,5h przy trzykrotnym molowym nadmiarze substratów w stosunku do żywicy (3 mmol).
- 5) Przemycanie nośnika stałego odpowiednimi rozpuszczalnikami według następującej kolejności:
  - DMF,  $2 \times 2$  min
  - DCM/DMF (1:1 v/v),  $2 \times 2$  min
  - DCM,  $2 \times 2$  min
- 6) Kontrola przeprowadzonego acylowania testem chloranilowym. Brak zabarwienia ziaren żywicy, czyli negatywny wynik testu, świadczył o braku wolnych grup aminowych, a więc pomyślnym przebiegu procesu acylowania.

Po przyłączeniu ostatniego aminokwasu (lub kwasu), nośnik stały przemycano eterem dietylowym i suszono w eksykatorze próżniowym w temperaturze pokojowej przez 48h. Odszczepienie zsyntetyzowanego peptydu od żywicy z jednoczesnym usunięciem grup ochronnych w łańcuchach bocznych aminokwasów przeprowadzono z zastosowaniem mieszaniny kwasu trifluorooctowego i odpowiednich zmiataczy jonowych. W przypadku peptydów zawierających resztę cysteiny stosowano mieszaninę o składzie TFA:EDT:TIS:woda dejonizowana, w stosunku objętościowym 92,5:2,5:2,5:2,5, v/v. W przypadku pozostałych peptydów stosowano mieszaninę zawierającą TFA, TIS i wodę dejonizowaną (95:2,5:2,5, v/v). W celu odszczepienia peptydu od nośnika, do żywicy dodawano mieszaninę kwasu (1,5 ml na 100 mg) i całość mieszało przez 1,5 h w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę odsączano i dodawano schłodzonego eteru dietylowego w celu wytrącenia peptydu. Osad odwirowywano przy użyciu wirówki laboratoryjnej. Surowy peptyd rozpuszczano w kwasie octowym, zamrażano w ciekłym azocie i liofilizowano.

W celu utworzenia wiązania disulfidowego liofilizaty peptydów zawierających w swoim składzie aminokwasowym resztę cysteiny ( $C_{12}$ -KKC-NH<sub>2</sub>,  $C_{14}$ -KKC-NH<sub>2</sub>,  $C_{16}$ -KKC-NH<sub>2</sub>) rozpuszczano

w 20% roztworze kwasu octowego w wodzie uzyskując stężenie ok. 1 mg/mL. Następnie do otrzymanych mieszanin dodawano 0,1 M roztwór jodu w metanolu aż do uzyskania słomkowego zabarwienia. Następnie reakcje utleniania zakańczano dodając 0,25 M roztwór kwasu L-askorbinowego aż do odbarwienia roztworu. Mieszaniny utlenionych peptydów ponownie liofilizowano.

Każdy z otrzymanych związków analizowano z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC - Reversed-Phase High-Performance), za pomocą systemu analitycznego Varian, przy użyciu kolumny analitycznej Phenomenex Luna C18(2) ( $4,6 \times 150$  mm,  $5,0 \mu\text{m}$ ,  $100 \text{ \AA}$ ). Fazę ruchomą stanowiły – faza A (0,1 % TFA w wodzie) oraz faza B (0,1 % TFA w ACN). Analizę przeprowadzono w liniowym gradiencie 2-98% fazy B, przy szybkości przepływu fazy ruchomej 2 mL/min, w czasie 15 min i jednoczesnym pomiarze absorbancji eluatu przy długości fali  $\lambda = 214$  nm. Po wstępnej analizie, dobrano optymalne warunki oczyszczania dla uzyskanych związków.

Surowe peptydy oczyszczano za pomocą RP-HPLC, przy użyciu systemu Kontron z kolumną semipreparatywną Phenomenex Gemini-NX C18 ( $21,20 \times 100$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ,  $100 \text{ \AA}$ ). Jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaniny acetonitrylu i wody dejonizowanej, zawierające 0,1% TFA (Faza A, faza B). Rozdzielanie prowadzono w liniowym gradiencie 20-80% acetonitrylu w wodzie (Faza B) dejonizowanej w ciągu 60 minut. Natężenie przepływu wynosiło 10,0 mL/min. Detekcję prowadzono mierząc absorbancję eluatu przy długości fali  $\lambda = 214$  nm.

Czystość i tożsamość otrzymanych związków potwierdzano przy wykorzystaniu RP-HPLC sprzężonego ze spektrometrem mas z zastosowaniem jonizacji poprzez elektrorozpylenie w trybie jonizacji dodatniej (LC-MS Waters Alliance e2695 z detektorami Waters 2998 PDA oraz Acquity QDa). Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem kolumny Phenomenex, Luna C18 (2) ( $3,0 \times 100$  mm,  $5,0 \mu\text{m}$ ,  $100 \text{ \AA}$ ) w liniowym gradiencie 20–80% acetonitrylu w wodzie dejonizowanej przy natężeniu przepływu 0,5 ml/min w czasie 10 minut z detekcją UV przy 214 nm. Oba elenty zawierały 0,1% (v/v) kwas mrówkowy. Frakcje zawierające związki o czystości powyżej 95% liofilizowano i wykorzystano w kolejnych etapach pracy badawczej.

Przed wykonaniem badań mikrobiologicznych oczyszczone peptydy po liofilizacji poddano ponownie analizie za pomocą RP-HPLC systemu Varian w warunkach opisanych powyżej dla tego systemu. Peptydy zawierające resztę kwasu heksadekanowego analizowano w liniowym gradiencie 40-100% ACN w wodzie

dejonizowanej. Dla pozostałych związków zastosowano metodę liniowego gradientu 30-100% ACN w wodzie dejonizowanej. Natężenie przepływu wynosiło 2,0 ml/min w czasie 10 minut z detekcją UV przy 214 nm. Oba eluenty zawierały 0,1% (v/v) kwas mrówkowy. Tożsamość lipopeptydu 9 została potwierdzona z wykorzystaniem metody z desorpcją laserową z udziałem matrycy i analizatorem czasu przelotu (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – MALDI-TOF*).

W tabeli 3 przedstawiono sekwencje aminokwasowe oraz masy cząsteczkowe i ładunek otrzymanych związków peptydowych.

**Tabela 3.** Sekwencje aminokwasowe, masy cząsteczkowe [Da] i ładunki otrzymanych peptydów

Związek	Sekwencja aminokwasowa	Masa cząsteczkowa (Da)	Ładunek
<b>Lipopeptyd</b>			
1	C <sub>12</sub> -KKC-NH <sub>2</sub> *	1115,64	+4
2	C <sub>12</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	483,70	+2
3	C <sub>14</sub> -KKC-NH <sub>2</sub> *	1171,75	+4
4	C <sub>14</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	511,75	+2
5	C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	568,84	+2
6	C <sub>16</sub> -KKC-NH <sub>2</sub> *	1227,86	+4
7	C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	639,97	+3
8	C <sub>16</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	539,81	+2
9	(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	837,67	+3
<b>Temporyna A</b>	FLPLIGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>	1396,74	+2
<b>Citropina 1.1</b>	GLFDVIKKVASVIGGL-NH <sub>2</sub>	1614,95	+2

\* - dimer (międzycząsteczkowe wiązanie disulfidowe)

### **3. OCENA AKTYWNOŚCI KRÓTKICH LIPOPEPTYDÓW ORAZ ZWIĄZKÓW ODNIESIENIA WOBEC SZCZEPÓW ODPOWIEDZIALNYCH ZA INFEKCJE OKA**

Prace badawcze związane z oznaczeniem aktywności mikrobiologicznej związków przeprowadzono w warunkach aseptycznych, w komorze z laminarnym przepływem powietrza (Alpina K-1000) uprzednio dezynfekowanej promieniami UV (20 minut) oraz roztworem alkoholowym zawierającym 70% alkoholu etylowego oraz 2-propanol i 1-propanol (Line-Antibacteria 70). W badaniach wykorzystano jałowe materiały jednorazowego użytku. Pożywki mikrobiologiczne, odczynniki oraz końcówki do pipet poddawane były sterylizacji w autoklawie (Tau Clave 3000) w temperaturze 121°C, przy nadciśnieniu 1 atmosfery przez 15 minut.

Oznaczenia mikrobiologiczne z użyciem szczepów referencyjnych wykonano dla otrzymanych lipopeptydów, temporyny A i citropiny 1.1 oraz chloramfenikolu i cyprofloksacyny. Związki rozpuszczano w DMSO i rozcieńczano za pomocą PBS do odpowiedniego stężenia. Stężenie końcowe DMSO w próbce zawierającej drobnoustroje nie przekraczało 10% - ustalono doświadczalnie, że takie stężenie DMSO nie wywiera wpływu na wzrost drobnoustrojów. Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

#### **3.1. Aktywność wobec komórek wolnopływających - minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC)**

Minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC) szczepów referencyjnych bakterii oznaczano metodą seryjnych rozcieńczeń w pożywce płynnej Mueller-Hinton II Broth (MHBII). Do badań wykorzystano 96-dołkowe płytki polistyrenowe, na które nanoszono roztwory związków przeciwdrobnoustrojowych w zakresie stężeń 1-512 µg/mL. Dodawano do nich zawiesiny bakterii w pożywce MHB II przygotowane z 24-godzinnej hodowli płynnej (inokulum początkowe ok.  $5 \times 10^5$  CFU/mL). Na każdej płytce przeprowadzono kontrolę dodatnią (kontrola żywności podłoża – zawiesina drobnoustrojów w pożywce bez dodatku związków) oraz kontrolę ujemną (kontrolę jałowości – czysta pożywka MHB II).

Próbki poddano 18-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, w warunkach tlenowych, po której dokonywano wizualnego odczytu wyników. Za wartość MIC uznawano najniższe stężenie związku, przy którym nie obserwowano wzrostu drobnoustrojów.

W tabeli 4 zamieszczono otrzymane wartości MIC dla badanych związków przeciwdrobnoustrojowych.

**Tabela 4.** MIC dla badanych związków w stosunku do hodowli planktonowych szczepów odpowiedzialnych za infekcje oka [ $\mu\text{g/mL}$ ]

Szczep		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>
Związek							
1-	C <sub>12</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	8	2	4	16	32	>512
2-	C <sub>12</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	64	32	64	512	512	>512
3-	C <sub>14</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	32	4	16	64	128	512
4-	C <sub>14</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	32	4	32	32	128	512
5-	C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	64	32	32	16	256	512
6-	C <sub>16</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	256	128	256	256	256	>512
7-	C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	64	16	16	32	64	256
8-	C <sub>16</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	32	8	64	64	128	512
9-	(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	8	2	16	16	16	512
	Temporyna A	8	4	32	256	512	>512
	Citropina 1.1	16	8	32	32	32	256
	Cyprofloksacyna	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
	Chloramfenikol	8	4	8	4	64	16

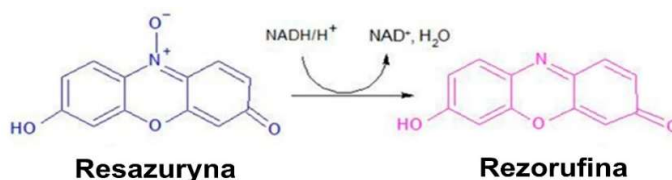
>512 - nie zaobserwowano zahamowania wzrostu drobnoustrojów w badanym zakresie stężeń

≤1 - wzrost drobnoustrojów zahamowany w całym badanym zakresie stężeń

## 3.2. Aktywność wobec biofilmu bakteryjnego - minimalne stężenie eliminujące biofilm (MBEC)

### 3.2.1. MBEC związków wobec biofilmu wytworzonego na płytkach polistyrenowych

Drobnoustroje zawieszono w płynnej pożywce wzrostowej MHB II, w inokulum początkowym  $5 \times 10^5$  CFU/mL, nanoszono na 96-dołkowe płytki polistyrenowe o płaskim dnie, a następnie inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po upływie tego czasu, trzykrotnie płukano zawartość dołków roztworem PBS i uzupełniano świeżą pożywką MBH II. Powstały biofilm poddawano działaniu analizowanych związków we wrastających stężeniach (1-512 µg/mL). Po upływie 24-godzinnej ekspozycji biofilmu na związki w temperaturze 37°C dodawano wskaźnika żywności - roztworu resazuryny (stężenie finalne w próbce 0,005%). W kontakcie z żywymi komórkami barwnik jest metabolizowany przez bakteryjne dehydrogenazy, co prowadzi do redukcji niebieskiej resazuryny do różowej rezorufiny. Po 1 godzinnej inkubacji dokonywano wizualnego odczytu wyników. Za minimalne stężenie eliminujące biofilm (MBEC) uznawano stężenie, przy którym zabarwienie resazuryny odpowiadało zabarwieniu obserwowanemu dla kontroli ujemnej. Oznaczenia dla wszystkich związków wykonano w trzech powtórzeniach. W tabeli 5 zestawiono otrzymane wartości MBEC dla testowanych związków.



**Rycina 8.** Schemat przedstawiający redukcję enzymatyczną resazuryny do rezorufiny pod wpływem mitochondrialnej dehydrogenazy.

**Tabela 5.** MBEC badanych związków w stosunku do biofilmu formowanego przez szczepy referencyjne na PS [ $\mu\text{g/mL}$ ]

Związek \ Szczep	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>
1- C <sub>12</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	32	16	32	256	>512	>512
2- C <sub>12</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	64	16	256	256	>512	>512
3- C <sub>14</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	128	128	256	512	256	512
4- C <sub>14</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	16	4	64	128	>512	>512
5- C <sub>16</sub> -K GK-NH <sub>2</sub>	32	8	64	128	>512	>512
6- C <sub>16</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	256	256	512	512	>512	>512
7- C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	32	8	64	64	512	512
8- C <sub>16</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	32	16	64	256	>512	256
9- (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	64	16	32	64	512	>512
Temporyna A	16	32	256	512	>512	>512
Citropina 1.1	16	32	128	128	128	512
Cyprofloksacyna	≤1	≤1	>512	≤1	1	≤1
Chloramfenikol	32	64	>512	8	128	64

>512 - nie zaobserwowano zahamowania wzrostu drobnoustrojów w badanym zakresie stężeń  
 ≤1 - wzrost drobnoustrojów zahamowany w całym badanym zakresie stężeń

### 3.2.2. MBEC związków wobec biofilmu wytworzonego na powierzchni soczewek kontaktowych

Zawiesinę drobnoustrojów o inokulum początkowym  $5 \times 10^5$  CFU/mL w pożywce MHB II nanoszono do 24-dołkowych płytek polistyrenowych. Następnie w zawiesinach bakterii umieszczano jałowe, jednodniowe soczewki kontaktowe. Płytki inkubowano w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C przez 24 godziny, a następnie trzykrotnie płukano zawartość dołków roztworem PBS. Soczewki z wytworzonym na ich powierzchni biofilmem przenoszono za pomocą jałowych pęset do nowych dołków zawierających świeżą pożywkę i związki we wzrastających stężeniach (1-512  $\mu\text{g/mL}$ ). Po inkubacji w temperaturze 37°C przez 24 godziny dodawano odczynnika wywołującego – resazuryny. Po godzinnej inkubacji z odczynnikiem żywotności w tych samych warunkach dokonywano odczytu wizualnego. Każdorazowo przeprowadzono kontrolę dodatnią zawierającą soczewkę wraz z inokulum bakteryjnym oraz kontrolę

ujemną z soczewką umieszczoną w czystej pożywce MHB II. Oznaczenia wykonano trzykrotnie. Otrzymane wartości MBEC przedstawiono w tabeli 6.

**Tabela 6.** MBEC badanych związków w stosunku do biofilmów formowanych przez szczepy referencyjne na soczewkach kontaktowych [ $\mu\text{g/mL}$ ]

Szczep Związek	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>
1- C <sub>12</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	256	128	128	256	256	>512
2- C <sub>12</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	>512	256	128	512	>512	>512
3- C <sub>14</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	128	512	256	512	>512	>512
4- C <sub>14</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	512	32	256	256	>512	>512
5- C <sub>16</sub> -K GK-NH <sub>2</sub>	512	128	32	64	256	>512
6- C <sub>16</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	512	256	512	512	>512	>512
7- C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	256	64	16	128	>512	>512
8- C <sub>16</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	128	32	64	128	32	>512
9- (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	128	64	128	128	256	>512
Temporyna A	64	256	>512	512	64	>512
Citropina 1.1	64	64	256	256	16	>512
Cyprofloksacyna	1	1	512	1	1	1
Chloramfenikol	32	256	512	4	64	64

>512 - nie zaobserwowano zahamowania wzrostu drobnoustrojów w badanym zakresie stężeń

≤1 - wzrost drobnoustrojów zahamowany w całym badanym zakresie stężeń

### 3.3. Wpływ związków na proces formowania się biofilmu bakteryjnego - minimalne stężenie hamujące rozwój biofilmu (MBFIC)

#### 3.3.1. MBFIC oznaczone na powierzchni polistyrenowej

W celu określenia hamującego wpływu środków przeciwdrobnoustrojowych na powstawanie biofilmu na powierzchniach hydrofobowych, do 96-dółkowej płytki polistyrenowej o płaskim dnie nanoszono jednakową objętość zawiesiny bakteryjnej w płynnej pożywce MHB II o inokulum początkowym  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Do zawiesiny bakterii wprowadzano analizowane związki (1-512  $\mu\text{g/mL}$ ) z pominięciem dołków zawierających kontrolę pozytywną i negatywną. Po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych, zawartość dołków płukano trzykrotnie



sterylnym PBS. Następnie dodawano resazuryny w stężeniu 0,005% na dołek i inkubowano (37°C, 1h) i dokonywano odczytu wizualnego. Wszystkie analizy zostały przeprowadzone w trzech powtórzeniach i obejmowały kontrole dodatnie (zawiesiny bakteryjne bez środków przeciwdrobnoustrojowych) oraz kontrole ujemne (jałowe podłoże MBH II). Po 1h inkubacji dokonano wizualnego odczytu wyników. Za stężenie zapobiegające formowaniu się biofilmu uznawano to stężenie, przy którym barwa resazuryny odpowiadała kontroli ujemnej.

W tabeli 7 zaprezentowano wyniki MBFIC dla biofilmu bakteryjnego hodowanego na powierzchni polistyrenowej.

**Tabela 7.** MBFIC badanych związków oznaczone na powierzchni polistyrenowej [ $\mu\text{g/mL}$ ]

Szczep Związek	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>
1- C <sub>12</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	32	8	16	128	512	>512
2- C <sub>12</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	64	16	512	512	512	>512
3- C <sub>14</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	64	64	256	256	512	512
4- C <sub>14</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	16	32	128	128	256	512
5- C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	32	32	64	64	512	>512
6- C <sub>16</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	256	256	256	512	512	>512
7- C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	32	8	64	64	512	512
8- C <sub>16</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	8	16	64	64	512	512
9- (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	8	8	64	128	64	512
Temporyna A	16	32	256	512	>512	>512
Citropina 1.1	16	32	128	128	128	512
Cyprofloksacyna	4	≤1	>512	≤1	≤1	≤1
Chloramfenikol	32	32	>512	8	256	16

>512 - nie zaobserwowano zahamowania wzrostu drobnoustrojów w badanym zakresie stężeń

≤1 - wzrost drobnoustrojów zahamowany w całym badanym zakresie stężeń

### 3.3.2. MBFIC oznaczone na powierzchni soczewek kontaktowych

Do dołków polistyrenowej płytki 24-dołkowej o płaskim dnie dodawano jednakową objętość zawiesiny bakteryjnej w płynnej pożywce MHB II o inokulum początkowym  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Następnie wprowadzano związki w zakresie stężeń 1–512  $\mu\text{g/mL}$  i za pomocą jałowych pęset umieszczano w nich soczewki kontaktowe. Podobnie jak w przypadku pozostałych oznaczeń przeprowadzono kontrolę dodatnią (soczewki w zawieszynie bakteryjnej) i kontrolę ujemną (soczewka umieszczona w czystej pożywce MHB II). Płytki inkubowano w warunkach tlenowych, temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przez 24 godziny, a następnie trzykrotnie płukano za pomocą PBS i przenoszono do nowych dołków z jałową pożywką MBH II. Do każdego dołka z soczewką dodawano roztwór resazuryny tak aby jej finalne stężenie wynosiło 0,005%. Po godzinnej inkubacji dokonywano odczytu wizualnego. Za stężenie zapobiegające formowaniu się biofilmu uznawano to stężenie, przy którym barwa resazuryny odpowiadała kontroli ujemnej. Wszystkie oznaczenia przeprowadzono trzykrotnie.

W tabeli 8 przedstawiono wartości MBFIC dla biofilmu hodowanego na powierzchni soczewek kontaktowych.

**Tabela 8.** MBFIC dla badanych związków oznaczone wobec biofilmu hodowanego na powierzchni soczewek kontaktowych [ $\mu\text{g/mL}$ ]

Szczep Związek	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>
1- C <sub>12</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	32	16	64	128	128	>512
2- C <sub>12</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	128	32	512	128	512	512
3- C <sub>14</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	32	32	64	64	512	512
4- C <sub>14</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	2	32	64	128	128	>512
5- C <sub>16</sub> -KGG-NH <sub>2</sub>	32	64	64	128	256	512
6- C <sub>16</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	64	64	256	128	256	512
7- C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	32	32	64	32	512	256
8- C <sub>16</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	16	32	64	64	128	512
9- (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	16	16	64	64	64	512
Temporyna A	32	32	512	512	512	>512
Citropina 1.1	16	16	128	256	128	512
Cyprofloksacyna	4	4	>512	≤1	16	≤1
Chloramfenikol	16	16	>512	4	512	16

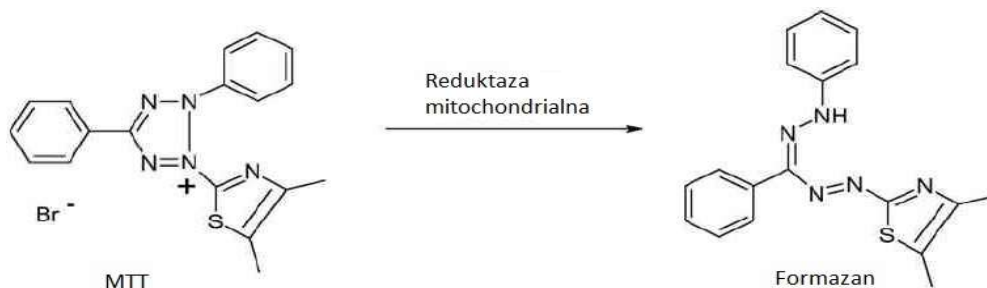
>512 - nie zaobserwowano zahamowania wzrostu drobnoustrojów w badanym zakresie stężeń

≤1 - wzrost drobnoustrojów zahamowany w całym badanym zakresie stężeń

#### 4. OCENA AKTYWNOŚCI CYTOTOKSYCZNEJ BADANYCH ZWIĄZKÓW WOBEC LUDZKICH KERATYNOCYTÓW

Oznaczenie cytotoksyczności przeprowadzono dla związków peptydowych, które wykazały się obiecującą, wyższą aktywnością mikrobiologiczną w przeprowadzonych oznaczeniach (Tabela 9, str. 69) oraz dla związków odniesienia użytych w badaniach mikrobiologicznych.

Analiza cytotoksyczności została przeprowadzona względem linii komórkowej ludzkich keratynocytów HaCaT. Oceny działania cytotoksycznego badanych związków dokonano za pomocą testu MTT. Test opiera się na pomiarze liczby żywych komórek w hodowli *in vitro* poprzez pomiar ich aktywności metabolicznej. W oznaczeniu wykorzystuje się enzymatyczną zdolność redukcji soli tetrazolowej (MTT – formazanu błękitu tiazolowego) do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu o zabarwieniu fioletowym (Rycina 9). Proces redukcji barwnika odbywa się przy udziale dehydrogenazy bursztynianowej, która jest enzymem aktywnym w komórkach o nienaruszonym metabolizmie i łańcuchu oddechowym. Ilość zredukowanego odczynnika MTT w sposób proporcjonalny określa liczbę aktywnych metabolicznie komórek.



**Rycina 9.** Redukcja MTT do nierozpuszczalnego formazanu.

Pierwszym etapem oznaczenia toksyczności badanych związków była hodowla linii komórkowej HaCaT. Zamrożoną w próbkach kriogenicznych zawiesinę komórek rozmrożono w temperaturze 37°C. Komórki przeniesiono do pojemników przeznaczonych do hodowli komórek adherentnych i inkubowano w temperaturze 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. W hodowli stosowano podstawową pożywkę DMEM (Dubelco's Minimum Essential Medium) suplementowaną dodatkiem surowicy bydlęcej (10% v/v) i antybiotyków: penicyliny (100 j./ml) i streptomycyną (0,1 mg/mL). Komórki w fazie logarytmicznego wzrostu wysiano na płytkę 96-studzienkową w ilości 2000 komórek/200

μl pożywki na studzienkę, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C, 5% CO<sub>2</sub> przez 24 godziny. Po upływie wyznaczonego czasu usunięto pożywkę hodowlaną i zastąpiono świeżą zawierającą związek. Linie komórkową traktowano związkami przeciwdrobnoustrojowymi we wzrastających stężeniach 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 100 i 500 mg/L. Tak przygotowane płytki ponownie inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C, 5% wysycenia atmosfery CO<sub>2</sub>. Po 24 godzinnej inkubacji ponownie zmieniono pożywkę na świeżą a następnie dodano odczynnik MTT o stężeniu 5 mg/ml, tak aby uzyskać końcowe stężenie MTT w każdym dołku równe 0,5 mg/mL.

Próby poddano 3 godzinnej inkubacji. Po tym czasie pożywkę wraz z odczynnikiem usunięto, a w celu rozpuszczenia powstałych kryształów formazanu dodano po 100 μl DMSO na studzienkę i wytrząsano przez 10 minut. Metodą spektrofotometryczną dokonano pomiaru absorbancji roztworu przy dwóch długościach fali 570 nm (maksimum absorpcji medium) i 650 nm (maksimum absorpcji formazanu). Na podstawie otrzymanych wartości pomiarowych obliczono wartości stężeń związków powodujących śmierć 50% komórek poddawanych działaniu danego związku – IC<sub>50</sub>. Do analizy wyników użyto programu Graphit 7. Dla każdego stężenia danego związku wykonano po 6 powtórzeń. Otrzymane wyniki zostały zaprezentowane w tabeli 9.

**Tabela 9.** Wartości stężeń IC<sub>50</sub> wybranych związków po 24 godzinnej inkubacji keratynocytów linii HaCaT

	Związek	IC <sub>50</sub>	SD	Literatura
1.	C <sub>12</sub> -KKC-NH <sub>2</sub>	1,96	1,16	-
4.	C <sub>14</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	1,17	0,28	-
5.	C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	0,26	0,19	-
7.	C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	3,2	±0,1	[239]
8.	C <sub>16</sub> -KR-NH <sub>2</sub>	1,10	0,48	-
9.	(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	49,4	±9,1	[239]
	Temporyna A	0,14	0,0435	-
	Citropina 1.1	0,04	0,05	-
	Cyprofloksacyna	211,53	66,89	-
	Chloramfenikol	301,40	55,26	-

## 5. OCENA AKTYWNOŚCI METABOLICZNEJ BIOFILMU WYTWORZONEGO NA POWIERZCHNI POLISTYRENOWEJ PO EKSPOZYCJI NA (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>, CHLORAMFENIKOL I CYPROFLOKSACYNĘ

Celem bardziej precyzyjnej oceny wpływu wybranych środków przeciwdrobnoustrojowych na biofilm bakteryjny oznaczono aktywność metaboliczną bakterii po ekspozycji na te związki.

Na podstawie wyników badań aktywności mikrobiologicznej oraz oceny cytotoksyczności do dalszych badań wybrano lipopeptyd 9 - (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>, wykazujący silne działanie przeciwbiofilmowe i najniższą toksyczność spośród badanych związków peptydowych wobec ludzkich komórek *in vitro*.

Zawiesiny bakteryjne w inokulum początkowym 5x10<sup>5</sup> CFU/mL dodawano do 96-dółkowych płytek i inkubowano w warunkach tlenowych z wytrząsaniem (120 obr./min) w temperaturze 37 °C przez 24 godziny. Po tym czasie dołki płukano trzykrotnie PBS, po czym dodawano świeże podłoże uzupełnione lipopeptydem i konwencjonalnymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi we wzrastających stężeniach (1-256 µg/mL). Tak przygotowane próby inkubowano przez kolejne 24 h (warunki tlenowe, wytrząsanie 120 rpm, temperatura 37°C). Po ekspozycji, dołki płukano trzykrotnie za pomocą PBS i dodawano roztwór resazury w MHB II (0,01%). Po 1,5 godzinnej inkubacji, za pomocą czytnika mikropłytek mierzono absorbancję przy długości fali: 570 nm i 600 nm. Wyniki przedstawiono jako % aktywności metabolicznej bakterii w porównaniu z kontrolą dodatnią (próbka z bakteriami zawieszonymi w pożywce MHB II) i kontrolą ujemną (jałowy MHB II), które zostały uznane odpowiednio jako 100% i 0%.

Aktywność metaboliczną bakterii w próbkach mierzono na podstawie następującego wzoru:

$$\text{Aktywność metaboliczna (\%)} = \frac{\Delta\text{Abs próbki} - \Delta\text{Abs kontroli ujemnej}}{\Delta\text{Abs kontroli dodatniej} - \Delta\text{Abs kontroli ujemnej}}$$

$\Delta\text{Abs}$  = absorbancja przy 570 nm - absorbancja przy 600 nm;

Przedstawione wyniki stanowią średnią z dziewięciu wyników uzyskanych w ciągu trzech różnych dni. Wyniki odczytywano po 24h ekspozycji na związki i oznaczono jako procent aktywności metabolicznej w porównaniu do kontroli pozytywnych (100%) i negatywnych (0%) (Ryc. 10-14, str. 74-78).

W tabeli 10 zaprezentowano otrzymane wyniki jako MBEC 50 i MBEC 90, gdzie:

- MBEC 50 – wskazuje najniższe stężenie, które pozwoliło zmniejszyć aktywność metaboliczną o co najmniej  $50 \pm 5\%$ ;
- MBEC 90 – wskazuje najniższe stężenie, które pozwoliło zredukować aktywność metaboliczną bakterii o co najmniej  $90 \pm 5\%$ .

**Tabela 10.** MBEC 50 i MBEC 90 lipopeptydu  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> i konwencjonalnych związków przeciwdrobnoustrojowych w stosunku do biofilmu formowanego przez szczepy referencyjne na powierzchni polistyrenowej (RSD $\leq$ 15%)

		Cyprofloksacyna	Chloramfenikol	$(C_{10})_2$ -KKKK-NH <sub>2</sub>
<i>S. epidermidis</i>	<b>MBEC 50</b>	$\leq 1$	32	16
	<b>MBEC 90</b>	16	256	16
<i>S. aureus</i>	<b>MBEC 50</b>	16	128	8
	<b>MBEC 90</b>	>256	>256	32
<i>E. faecalis</i>	<b>MBEC 50</b>	64	32	16
	<b>MBEC 90</b>	>256	>256	32
<i>E. coli</i>	<b>MBEC 50</b>	$\leq 1$	8	64
	<b>MBEC 90</b>	32	16	64
<i>P. aeruginosa</i>	<b>MBEC 50</b>	$\leq 1$	4	64
	<b>MBEC 90</b>	$\leq 1$	128	256

>256 - nie zaobserwowano wystarczającej redukcji aktywności metabolicznej bakterii w całym badanym zakresie stężeń

## **6. OCENA AKTYWNOŚCI METABOLICZNEJ BIOFILMU WYTWORZONEGO NA POWIERZCHNI POLISTYRENOWEJ PO EKSPOZYCJI NA (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>, CHLORAMFENIKOL I CYPROFLOKSACYNĘ ORAZ ICH USUNIĘCIU Z POŻYWKI**

Badanie to było kontynuacją testu numer 5 i zostało przeprowadzone w celu oceny trwałości efektu przeciwdrobnoustrojowego. Oznaczenie przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie numer 5 z tą różnicą, że po ekspozycji na środki przeciwdrobnoustrojowe dołki płytki płukano trzykrotnie PBS i uzupełniano świeżą pożywką MHB II. Płytki inkubowano przez kolejne 24 godziny (warunki tlenowe, wstrząsanie 120 obr/min, temperatura 37°C). Następnie zmieniono podłoże, dodając do każdego dołka roztwór resazuryiny w świeżym MHB II (0.01%). Absorbancję mierzono przy tych samych długościach fali, a aktywność metaboliczną obliczano według wzoru podanego w punkcie 5. Przedstawione wyniki są średnią z dziewięciu wyników uzyskanych w trzech różnych dniach. Wyniki zostały odczytane po usunięciu związków oraz po dodatkowej 24 h inkubacji w pożywce MHB II i zostały oznaczone jako procent aktywności metabolicznej w porównaniu do kontroli pozytywnych (100%) i negatywnych (0%) (Ryc. 10-14, str. 74-78).

Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 11 jako MBEC II 50 i MBEC II 90, gdzie:

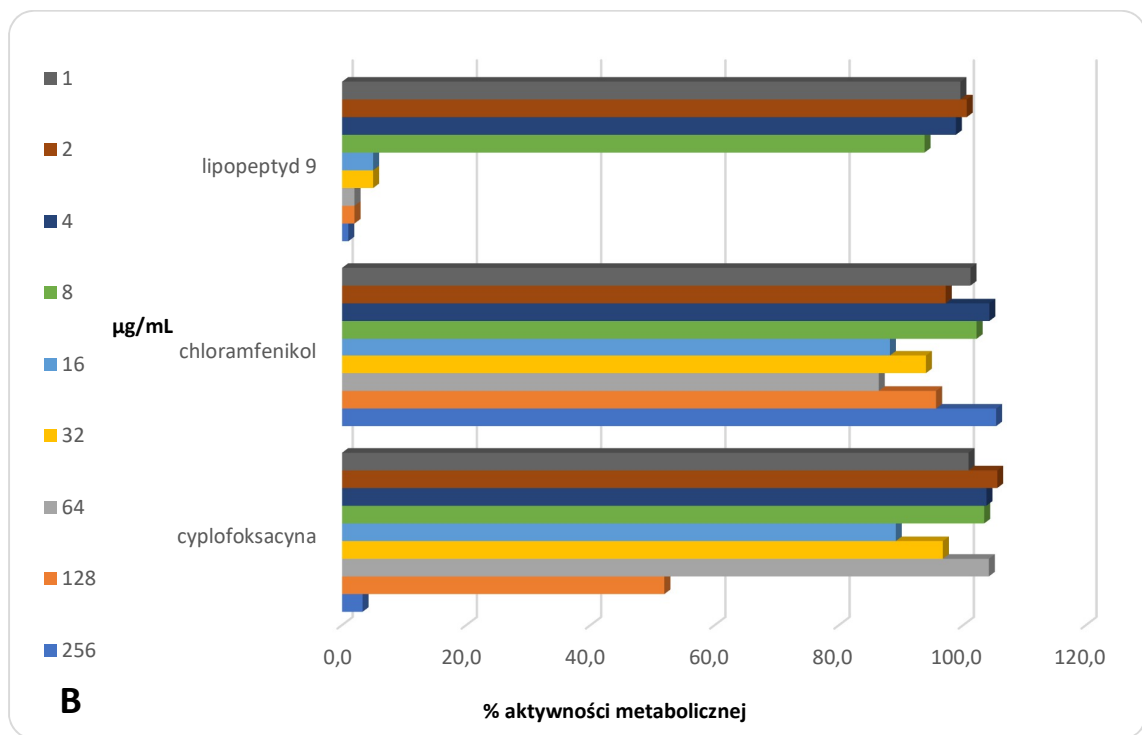
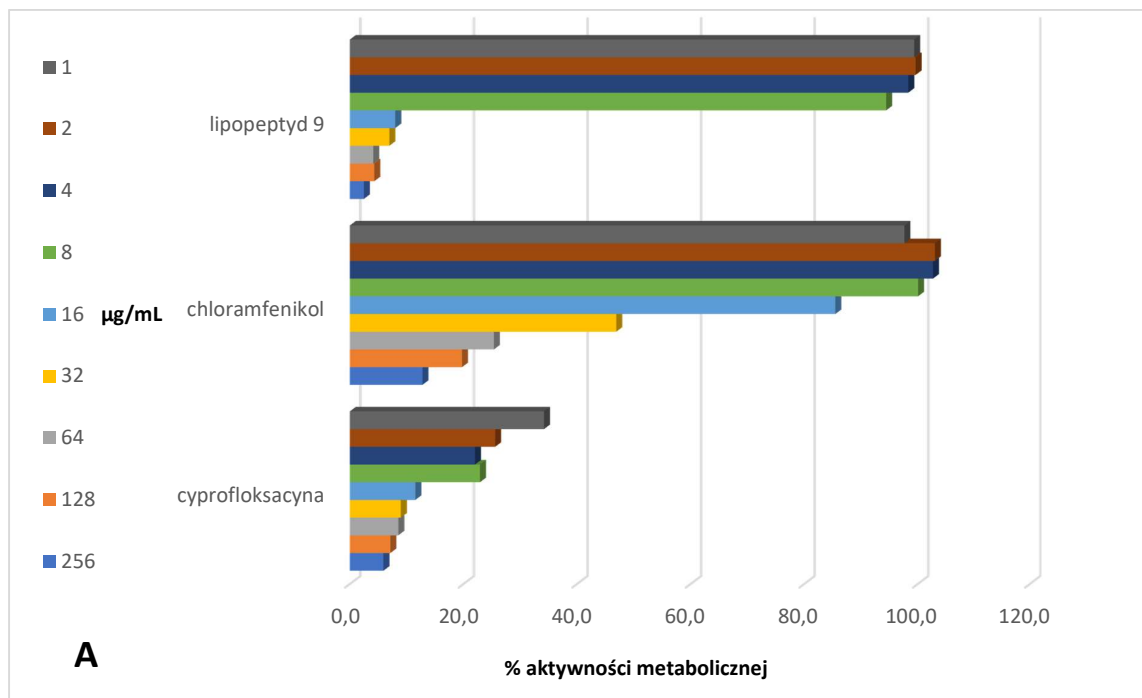
- MBEC II 50 – wskazuje najniższe stężenie, które spowodowało trwałe zmniejszenie aktywności metabolicznej o co najmniej  $50 \pm 5\%$ ;
- MBEC II 90 – wskazuje najniższe stężenie, które spowodowało trwałe zmniejszenie aktywności metabolicznej o co najmniej  $90 \pm 5\%$ .

**Tabela 11.** MBEC II 50 i MBEC II 90 lipopeptydu (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> i konwencjonalnych związków przeciwdrobnoustrojowych w stosunku do biofilmu formowanego przez szczepy referencyjne na powierzchni polistyrenowej (RSD≤15%)

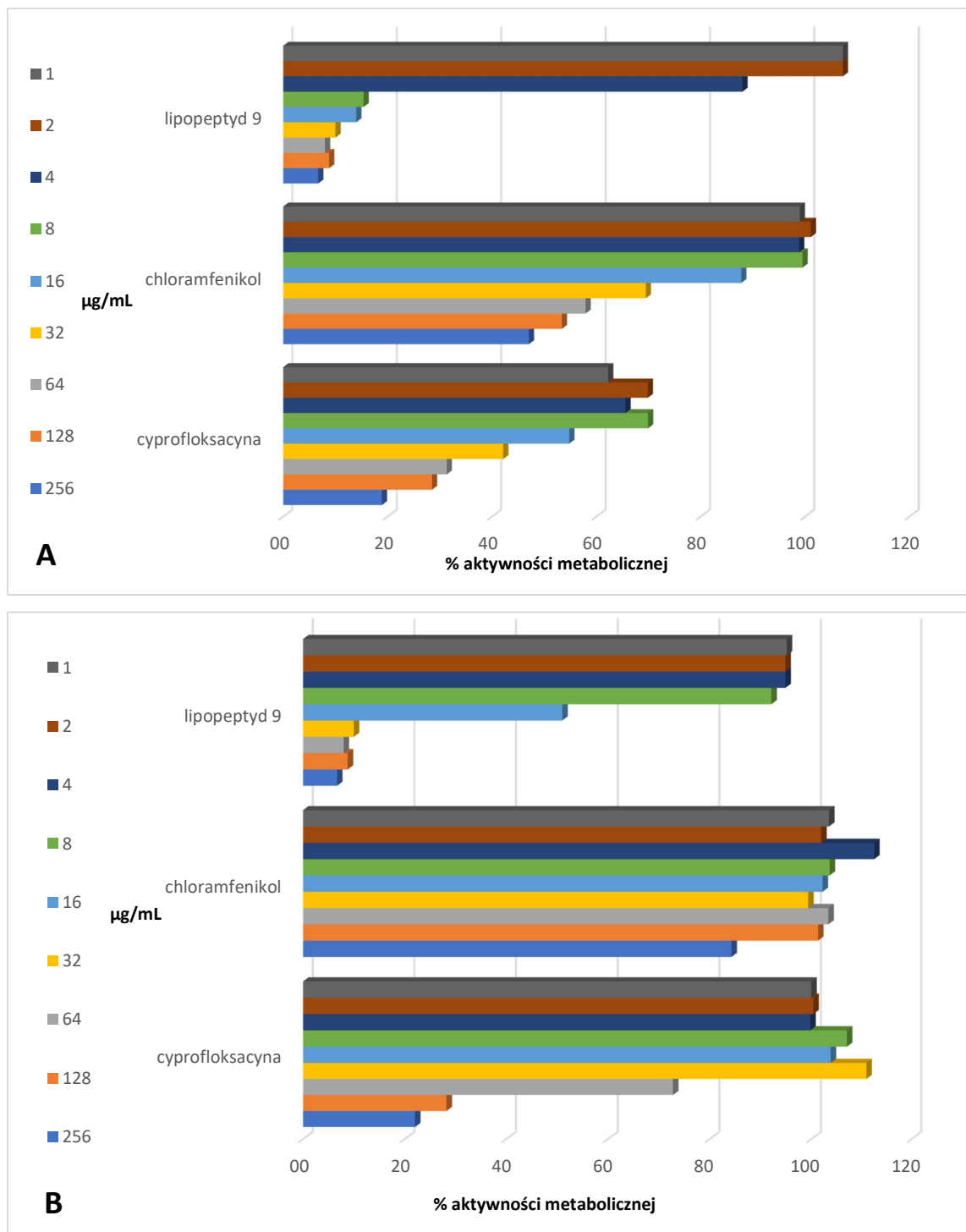
		Cyprofloksacyna	Chloramfenikol	(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>
<i>S. epidermidis</i>	<b>MBEC II 50</b>	128	>256	16
	<b>MBEC II 90</b>	256	>256	16
<i>S. aureus</i>	<b>MBEC II 50</b>	128	>256	16
	<b>MBEC II 90</b>	>256	>256	32
<i>E. faecalis</i>	<b>MBEC II 50</b>	256	>256	32
	<b>MBEC II 90</b>	>256	>256	32
<i>E. coli</i>	<b>MBEC II 50</b>	≤1	>256	64
	<b>MBEC II 90</b>	32	>256	64
<i>P. aeruginosa</i>	<b>MBEC II 50</b>	16	256	64
	<b>MBEC II 90</b>	32	>256	>256

>256 - nie zaobserwowano wystarczającej redukcji aktywności metabolicznej bakterii w całym badanym zakresie stężeń

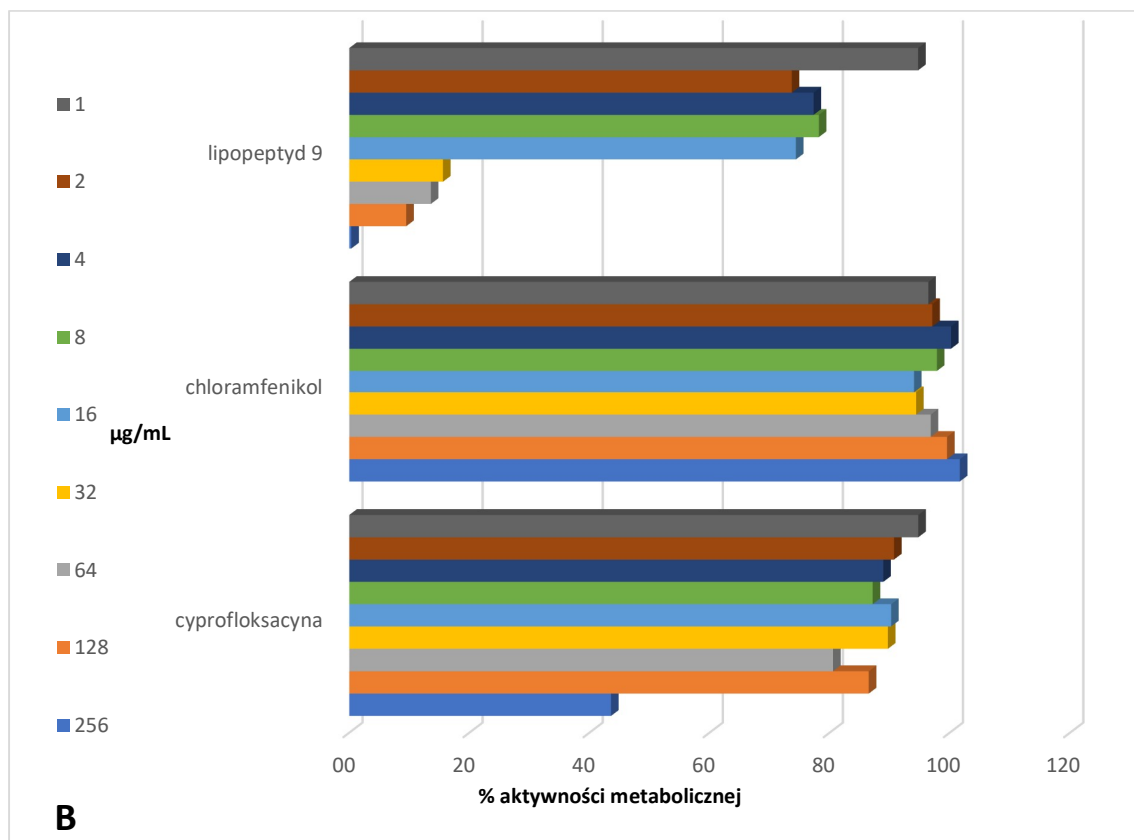
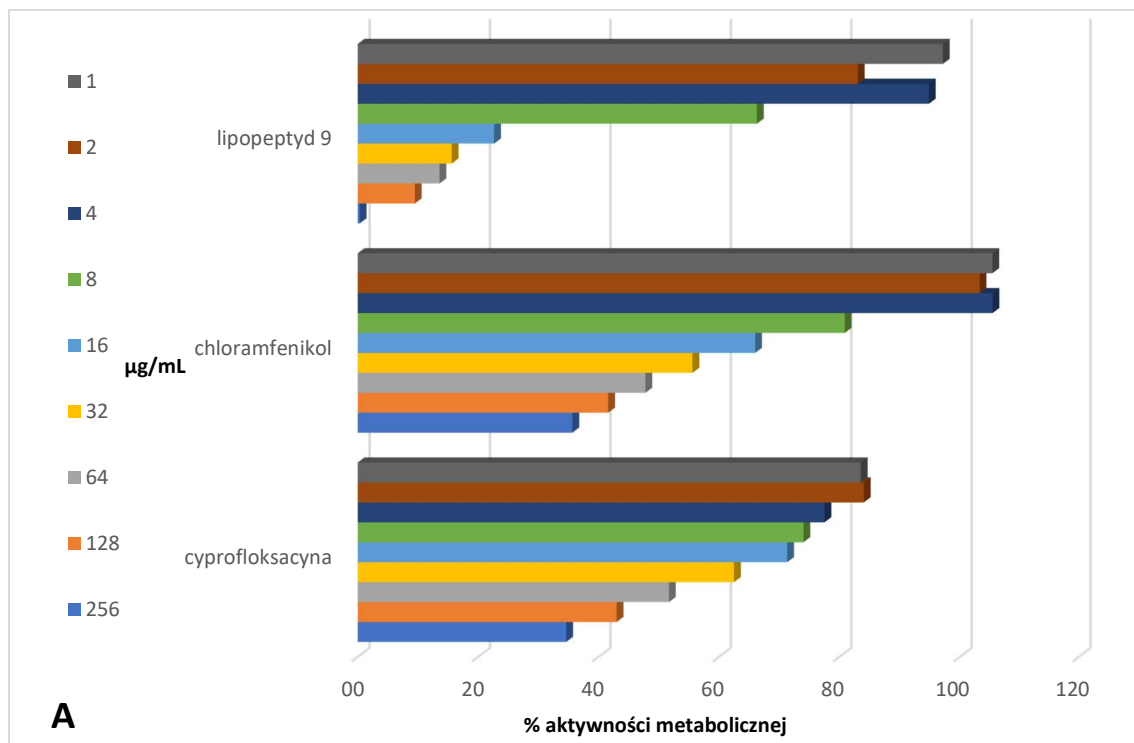




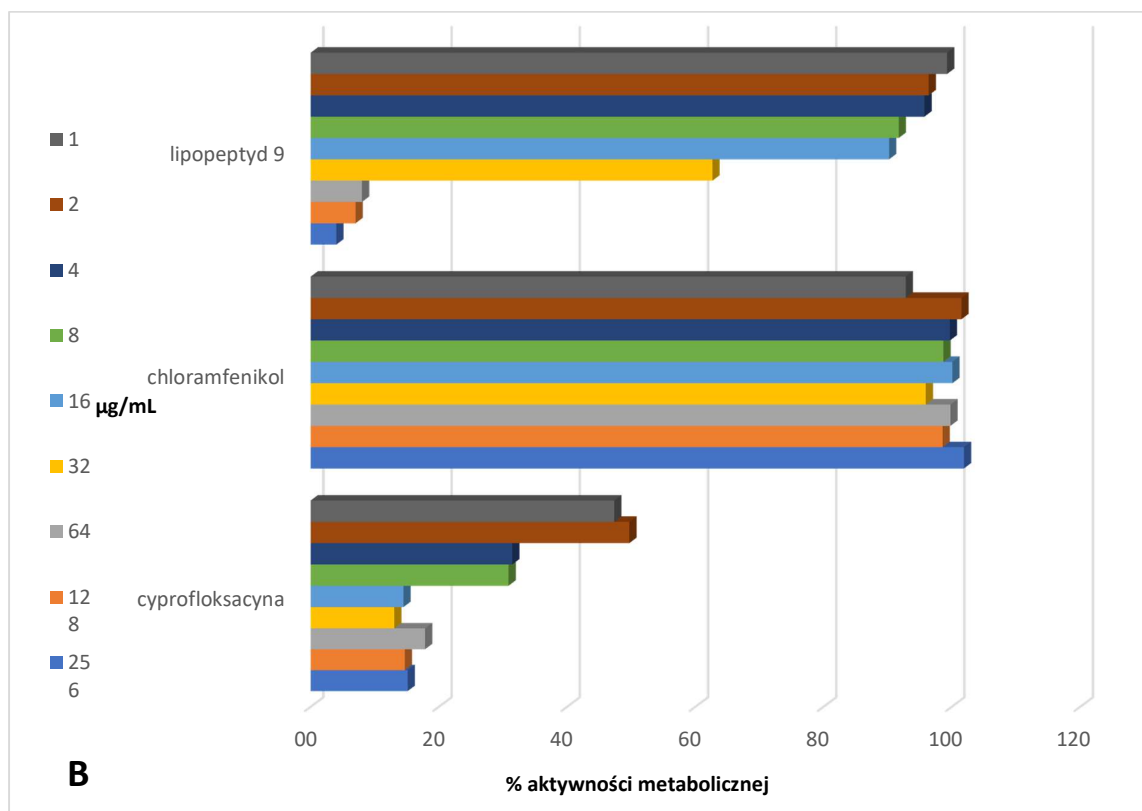
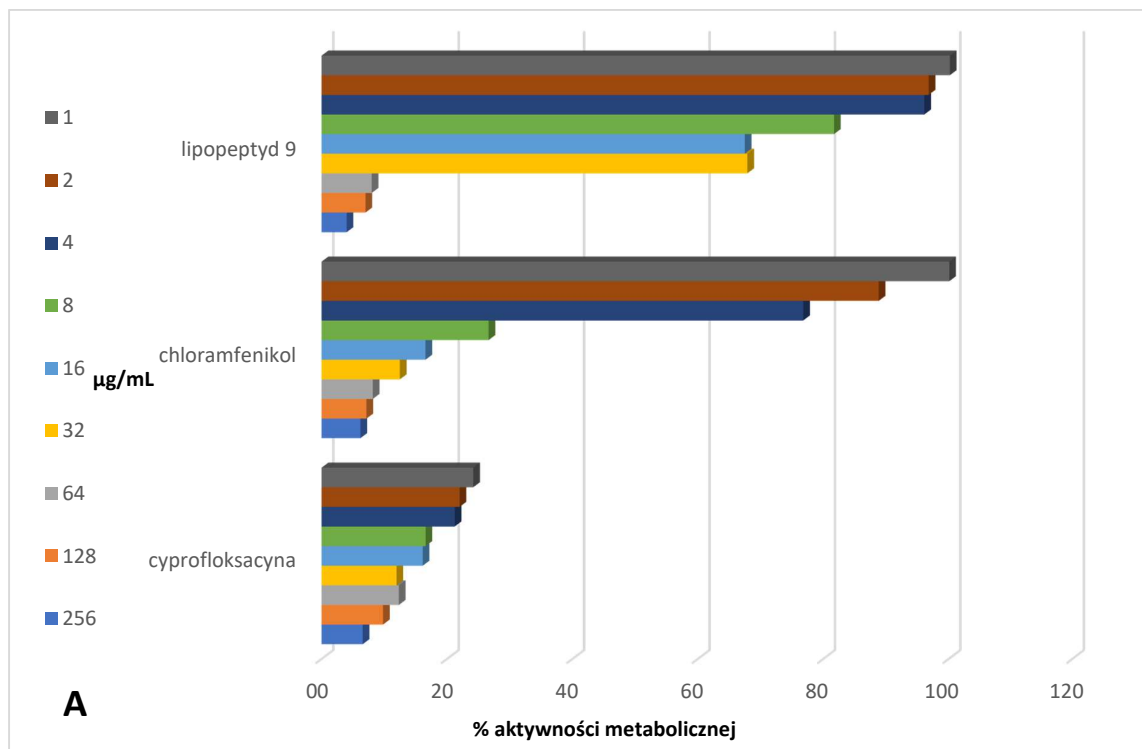
**Rycina 10.** Aktywność lipopeptydu  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> i referencyjnych związków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w stężeniach 1-256 µg/mL wobec biofilmu SE utworzonych na PS. (A) - wyniki odczytane 24 h po ekspozycji na związki; (B) – wyniki odczytane po wycofaniu związków i dodatkowych 24 h inkubacji w MHB II.



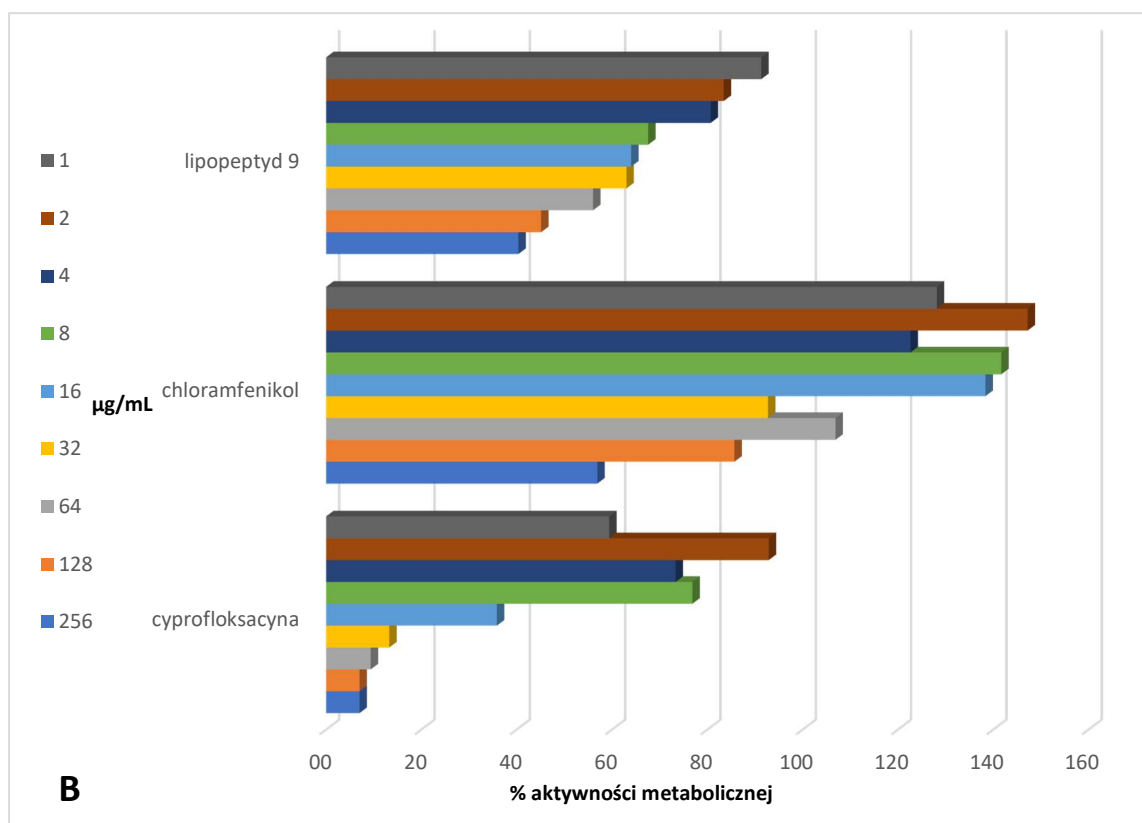
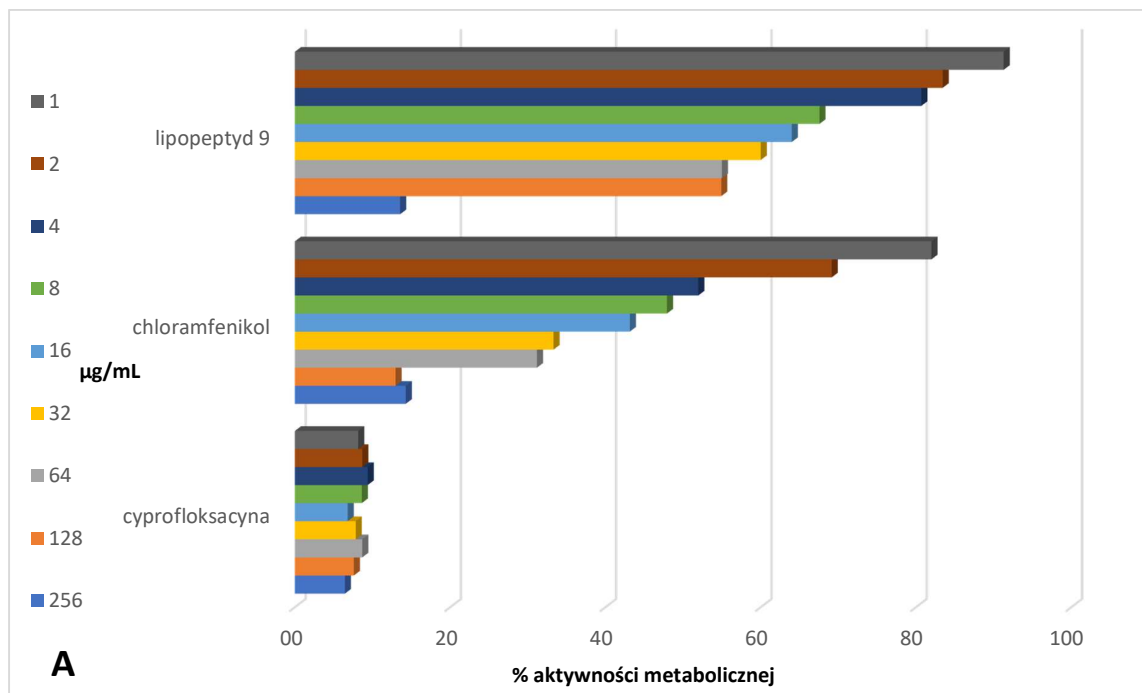
**Rycina 11.** Aktywność lipopeptydu  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> i referencyjnych związków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w stężeniach 1-256 µg/mL wobec biofilmu SA utworzonych na PS. (A) - wyniki odczytane 24 h po ekspozycji na związki; (B) – wyniki odczytane po wycofaniu związków i dodatkowych 24 h inkubacji w MHB II.



**Rycina 12.** Aktywność lipopeptydu ( $C_{10}$ )<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> i referencyjnych związków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w stężeniach 1-256 µg/mL wobec biofilmu EF utworzonych na PS. (A) - wyniki odczytane 24 h po ekspozycji na związki; (B) – wyniki odczytane po wycofaniu związków i dodatkowych 24 h inkubacji w MHB II.



**Rycina 13.** Aktywność lipopeptydu  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> i referencyjnych związków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w stężeniach 1-256 µg/mL wobec biofilmu EC utworzonych na PS. (A) - wyniki odczytane 24 h po ekspozycji na związki; (B) – wyniki odczytane po wycofaniu związków i dodatkowych 24 h inkubacji w MHB II.



**Rycina 14.** Aktywność lipopeptydu  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> i referencyjnych związków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w stężeniach 1-256 µg/mL wobec biofilmu PA utworzonych na PS. (A) - wyniki odczytane 24 h po ekspozycji na związki; (B) – wyniki odczytane po wycofaniu związków i dodatkowych 24 h inkubacji w MHB II.

## 7. OCENA AKTYWNOŚCI METABOLICZNEJ BIOFILMU WYTWORZONEGO NA SOCZEWKACH KONTAKTOWYCH PODDANEGO EKSPOZYCJI NA $(C_{10})_2$ -K K K K-NH<sub>2</sub>

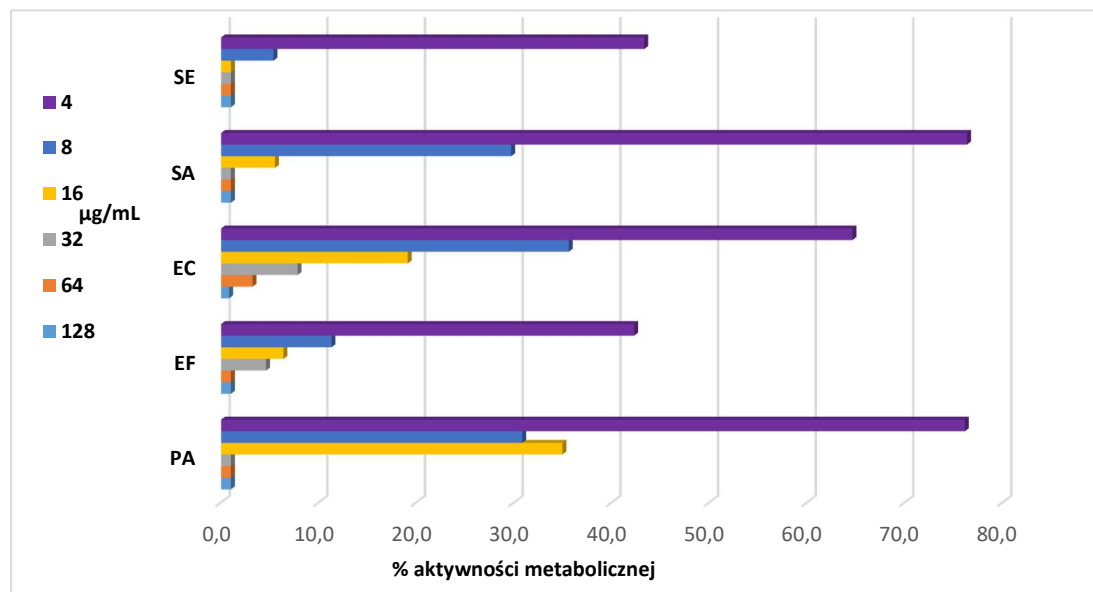
Soczewki kontaktowe umieszczono w 24-dołkowych polistyrenowych płytkach z zawiesinami szczepów referencyjnych w MHB II przy początkowym inokulum  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Po 24 godzinach inkubacji (warunki tlenowe, wytrząsanie 120 obr/min, temperatura 37°C) wszystkie soczewki zostały trzykrotnie przepłukane za pomocą PBS. Następnie soczewki kontaktowe z utworzonym biofilmem zostały przeniesione do nowych dołków z roztworami lipopeptydu w PBS we wzrastających stężeniach (4-128  $\mu$ g/mL), a następnie ponownie inkubowane przez 24 godziny w temperaturze 37°C.

Po inkubacji dodawano roztworu rezazuryny (0,01%) i mierzono absorbancję analogicznie jak w testach opisanych w punkcie 5 i 6.

Kontrolę dodatnią stanowiły soczewki kontaktowe z wyhodowanymi biofilmami gdzie MHB II został zastąpiony PBS. Kontrolę ujemną stanowiły sterylne soczewki inkubowane w jałowym podłożu MHB II, również zastąpionym PBS.

Eksperymenty przeprowadzono w trzech różnych dniach w trzech powtórzeniach.

Otrzymane wyniki badań przedstawiono na rycinie 15.



**Rycina 15.** Aktywność lipopeptydu  $(C_{10})_2$ -K K K K-NH<sub>2</sub> stosowanego w stężeniach 4-128  $\mu$ g/mL wobec biofilmów tworzonych na soczewkach kontaktowych. Wyniki przedstawiono jako procent aktywności metabolicznej w porównaniu do kontroli pozytywnej (100%) i negatywnej (0%); RSD  $\leq$  20%.

## **8. OZNACZENIE ANTYBIOFILMOWEJ AKTYWNOŚCI (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-K<sub>4</sub>NH<sub>2</sub> STOSOWANEGO W POŁĄCZENIU Z DOSTĘPNYMI NA RYNKU PŁYNAMI DO SOCZEWEK**

### **8.1. Aktywność płynów do soczewek suplementowanych (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>- K<sub>4</sub>NH<sub>2</sub> wobec biofilmu na powierzchni polistyrenowej**

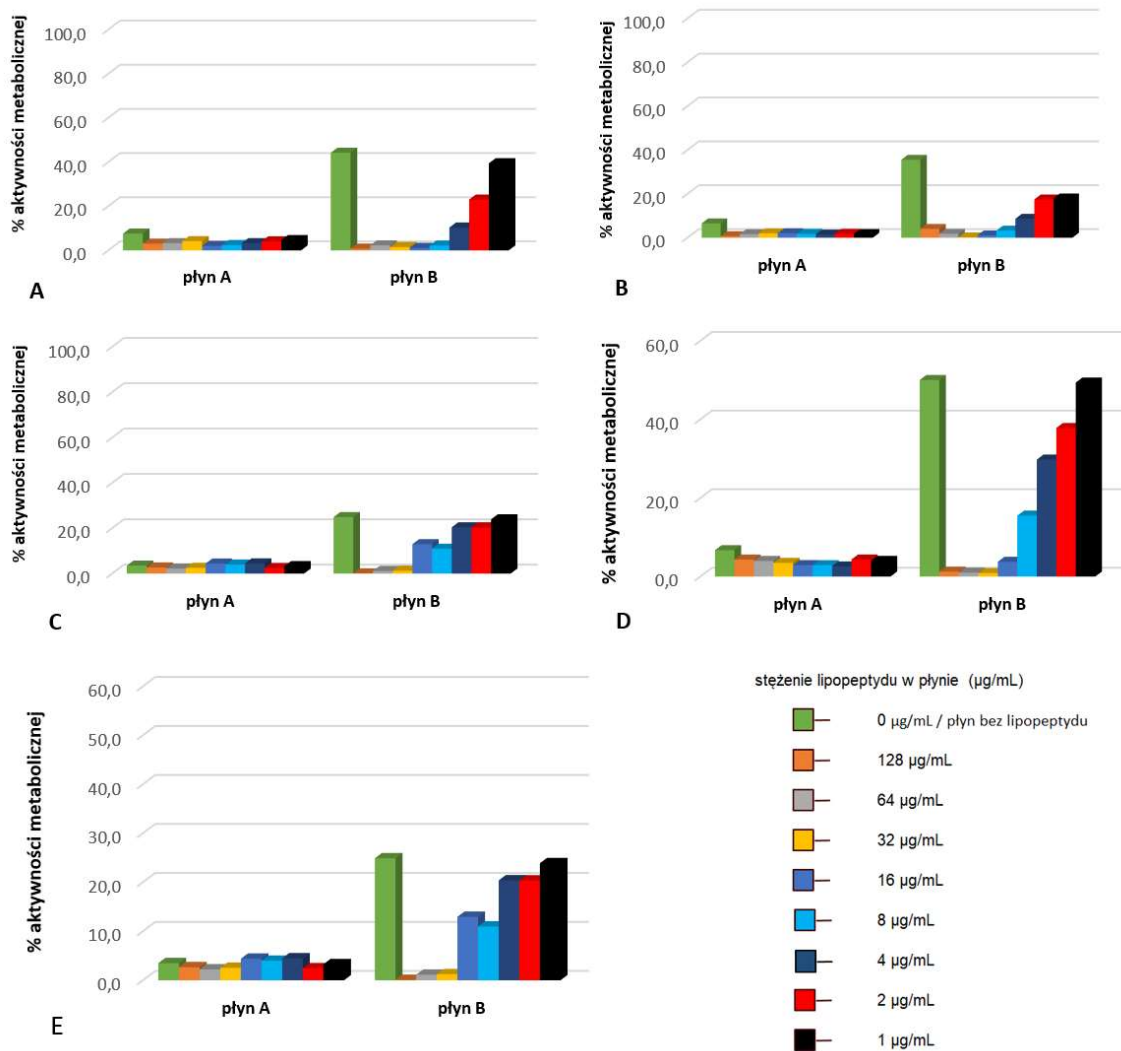
Bakterie w inokulum początkowym  $5 \times 10^5$  CFU/mL w płynnym podłożu MHB II nanoszono na 96-dółkowe płytki polistyrenowe o płaskim dnie i inkubowano w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (120 obr/min). Po upływie 24 h zawartość dołków płukano trzykrotnie za pomocą PBS, a następnie poddawano działaniu wzrastających stężeń (1-128µg/mL) lipopeptydu rozpuszczonego w płynach do soczewek. Po 24 h inkubacji w temperaturze 37°C (warunki tlenowe, wytrząsanie 120 rpm) dołki trzykrotnie płukano za pomocą PBS i dodawano odczynnika żywotności (resazuryna w MHB II – 0,01%). Po 1,5 h inkubacji mierzono absorbancję przy długościach fal 570 i 600 nm. Wyniki przedstawiono jako % aktywności metabolicznej bakterii. Kontrolę dodatnią (100%) stanowiły dołki z wstępnie wyhodowanymi biofilmami, gdzie MHB II zastąpiono czystym PBS, natomiast kontrolę ujemną (0%) stanowiły dołki z jałowym MHB II (również zastąpionym PBS).

Aktywność metaboliczną bakterii w próbkach mierzono na podstawie wzoru (przedstawionego w punkcie 5):

$$\text{Aktywność metaboliczna (\%)} = \frac{\Delta\text{Abs próbki} - \Delta\text{Abs kontroli ujemnej}}{\Delta\text{Abs kontroli dodatniej} - \Delta\text{Abs kontroli ujemnej}}$$

$$\Delta\text{Abs} = \text{absorbancja przy 570 nm} - \text{absorbancja przy 600 nm.}$$

Otrzymane wyniki zaprezentowano na Rycinie 16.



**Rycina 16.** Aktywność płynów do soczewek stosowanych bez dodatku i z dodatkiem lipopeptydu aplikowanym w stężeniu 1-128 µg/mL w stosunku do biofilmu utworzonego na płytkach polistyrenowych przez: (A) SE; (B) SA; (C) EF; (D) EC; oraz (E) PA. Wyniki przedstawiono jako procent aktywności metabolicznej w porównaniu do kontroli pozytywnych (100%) i negatywnych (0%); RSD ≤ 15%.

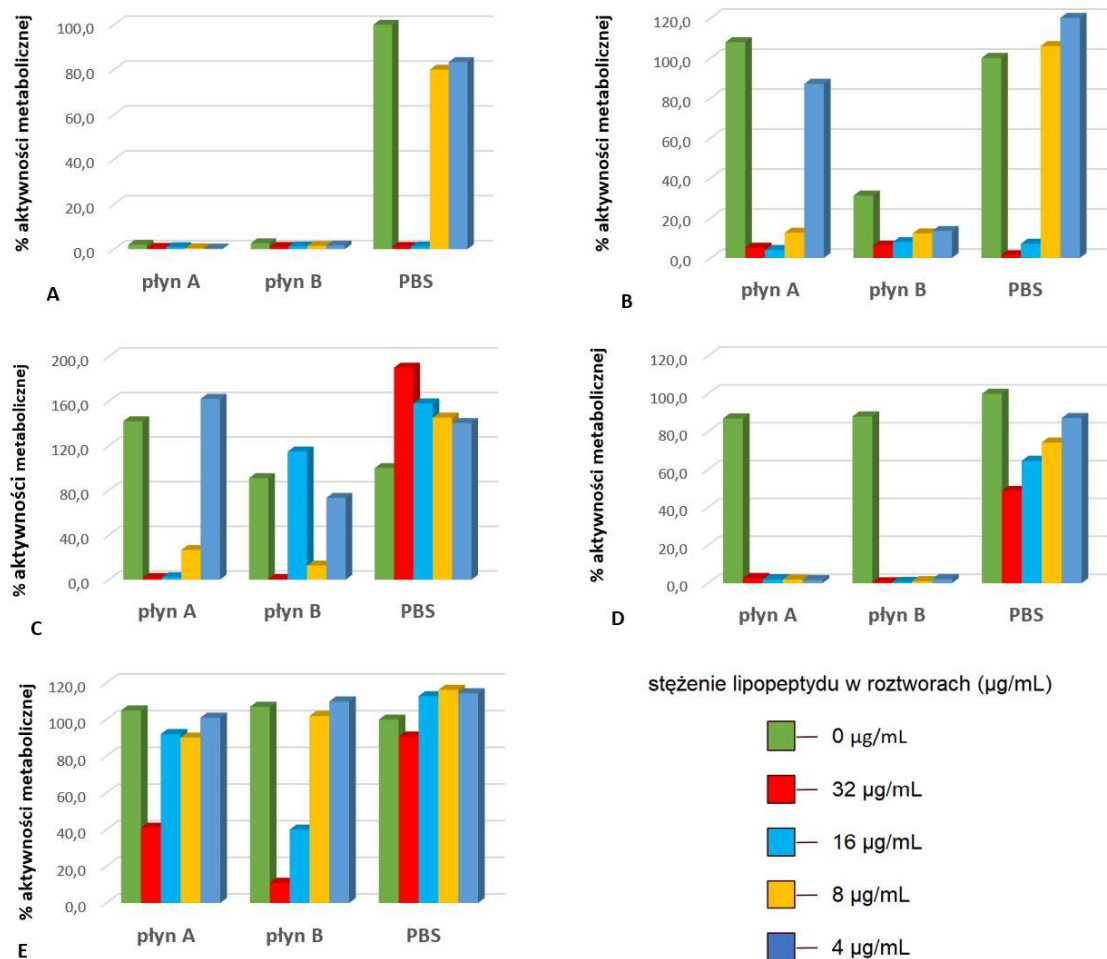


## **8.2. Aktywność (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>, płynów do soczewek oraz ich kombinacji wobec biofilmu utworzonego na soczewkach kontaktowych**

Soczewki kontaktowe umieszczono w 24-dółkowych polistyrenowych płytkach z zawiesinami bakteryjnymi w MHB II przy początkowym inokulum  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Próby inkubowano w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych z jednoczesnym wytrząsaniem (120 rpm). Po 24 godzinach soczewki trzykrotnie płukano za pomocą PBS. Następnie soczewki przenoszono do nowych dołków i eksponowano na działanie wzrastających stężeń lipopeptydu rozpuszczonego w roztworach płynów do soczewek. Równolegle przeprowadzono badanie dla próbek, w których biofilm na soczewkach kontaktowych był narażony na działanie czystych roztworów płynów do soczewek. Kontrole dodatnie (100%) stanowiły soczewki kontaktowe z biofilmem (MHB II zastąpiono PBS), natomiast kontrole ujemne stanowiły soczewki kontaktowe inkubowane

w czystym MHB II i zastępowane na czas ekspozycji z PBS. Po 24 godzinach ekspozycji (warunki tlenowe, wytrząsanie 120 obr/min, 37 °C) wszystkie roztwory zostały usunięte i zastąpione świeżym podłożem MHB II. Próby inkubowano przez kolejne 24 godziny. Po tym czasie dokonywano wizualizacji wyników z wykorzystaniem roztworu resazuryny. Wyniki zostały odczytane, obliczone i przedstawione w sposób opisany w punkcie 8.1.

Otrzymane wyniki zaprezentowano na Rycinie 17.



**Rycina 17.** Aktywność płynów do soczewek bez dodatku i z dodatkiem lipopeptydu zastosowanym w stężeniach 4-32 µg/mL w stosunku do biofilmów utworzonych na soczewkach kontaktowych przez: (A) SE; (B) SA; (C) EF; (D) EC; oraz (E) PA. Wyniki przedstawiono jako procent aktywności metabolicznej w porównaniu do kontroli pozytywnych (100%) i negatywnych (0%); RSD ≤ 20%.

## 9. OCENA POTENCJAŁU DRAŻNIĄCEGO OKA

Ostatnim etapem pracy badawczej było oszacowanie potencjału drażniącego oka najbardziej obiecującego związku –  $(C_{10})_2$ -K<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>. Przeprowadzono ją za pomocą ogólnie dostępnego oprogramowania Toxtree 2.6.13 (<http://toxtree.sourceforge.net/>) w oparciu o algorytm „Oszacowanie podrażnienia oczu i potencjału korozyjnego przez zakresy właściwości fizykochemicznych i zasady strukturalne” zaimplementowany w drzewie decyzji [240].

Wykorzystanie aplikacji Toxtree do określenia profilu bezpieczeństwa substancji chemicznych jest rekomendowane przez Europejskie Biuro Chemiczne (ang. European Chemicals Bureau, ECB). Analiza z wykorzystaniem oprogramowania Toxtree bazuje na koncepcji tzw. progu zagrożenia toksykologicznego (ang. threshold of toxicological concern, TTC), co umożliwia przewidywanie poziomu bezpieczeństwa ekspozycji ludzkich tkanek na określoną substancję chemiczną w oparciu o jej wzór strukturalny [241].

Analiza metodą obliczeniową za pomocą aplikacji Toxtree wykazała brak potencjału drażniącego związku  $(C_{10})_2$ -K<sub>4</sub>NH<sub>2</sub> w stosunku do ludzkiego oka.

## IV OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

### 1. AKTYWNOŚĆ PEPTYDÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH ORAZ ZWIĄZKÓW KONWENCJONALNYCH WOBEC KOMÓREK WOLNOPLYWAJĄCYCH SZCZEPÓW ODPOWIEDZIALNYCH ZA INFEKCJE OKA

Wyniki otrzymane dla badanych szczepów hodowanych w formie kultur płynnych są zgodne z dotychczas opublikowanymi doniesieniami na temat aktywności przeciwdrobnoustrojowej peptydów natywnych i ich analogów [228, 242, 243]. W zależności od szczepu bakteryjnego związki peptydowe wykazały zróżnicowane działanie przeciwdrobnoustrojowe. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 4, str. 61. Zaobserwowano silniejszą aktywność związków wobec szczepów Gram-dodatnich w porównaniu do szczepów Gram-ujemnych.

Spośród badanych szczepów, *P. mirabilis* (PM) wykazywał najwyższą oporność wobec wszystkich związków peptydowych. Jego wzrost został zahamowany po zastosowaniu większości peptydów w bardzo wysokich stężeniach (256–512 µg/mL) lub wcale nie został zahamowany (lipopeptydy 1- C<sub>12</sub>-KKC-NH<sub>2</sub>, 2 - C<sub>12</sub>-KR-NH<sub>2</sub>, 6 - C<sub>16</sub>-KKC-NH<sub>2</sub> i temporyna A). Szczep był podatny na działanie środków konwencjonalnych. Cyprofloksacyna wykazała najwyższą efektywność wobec PM (MIC ≤ 1 µg/mL). Natomiast chloramfenikol hamował wzrost PM po zastosowaniu w stężeniu 16 µg/mL. Wyniki badań dla szczepu PM są zgodne z dotychczas opublikowanymi pracami dotyczącymi wrażliwości tego szczepu na związki peptydowe i antybiotyki [244–249]. PM jest głównym czynnikiem etiologicznym szpitalnych zakażeń dróg moczowych, związanych ze stosowaniem cewników [250]. Lekami skutecznymi w terapii zakażeń PM są przede wszystkim fluorochinolony o szerokim spektrum działania i cefalosporyny, jednak w ostatnich latach zaobserwowano wyraźny wzrost oporności wobec tych substancji leczniczych [246].

Wobec pozostałych szczepów bakterii najbardziej obiecujące wyniki uzyskano dla dwóch lipopeptydów, zawierających krótsze kwasy tłuszczowe: lipopeptyd 1 - C<sub>12</sub>-KKC-NH<sub>2</sub> i lipopeptyd 9 - (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>. Wzrost bakterii Gram-dodatnich był hamowany po ekspozycji na związki użyte w stężeniach odpowiednio 2-8 µg/mL i 2-16 µg/mL. Szczep SE okazał się najbardziej wrażliwy na działanie tych związków (MIC 2 µg/mL). Zastosowanie lipopeptydu 9 w stężeniu 16 µg/mL skutecznie hamowało wzrost szczepów EC i PA. Lipopeptyd 1 (C<sub>12</sub>-KKC-NH<sub>2</sub>) wykazał podobną aktywność wobec

szczepu EC, a w stężeniu 32  $\mu\text{g/mL}$  hamował także wzrost szczepu PA. Spośród badanych związków peptydowych, związek ten, prezentował najwyższą aktywność wobec szczepu EF (MIC  $\mu\text{g/mL}$ )

W przypadku lipopeptydu 3 ( $\text{C}_{14}\text{-KKC-NH}_2$ ) i 4 ( $\text{C}_{14}\text{-KR-NH}_2$ ) najwyższą aktywność zaobserwowano wobec szczepu SE (4  $\mu\text{g/mL}$ ). Zahamowanie wzrostu szczepu SA wymagało zastosowanie wyższego stężenia (32  $\mu\text{g/mL}$ ), podczas gdy PA i PM okazały się najmniej wrażliwe na działanie tych związków (MIC odpowiednio 128 i 512  $\mu\text{g/mL}$ ).

Spośród badanych lipopeptydów stosunkową niską aktywność przeciwdrobnoustrojową zaobserwowano dla lipopeptydu 6 -  $\text{C}_{16}\text{-KKC-NH}_2$ . Z wyjątkiem PM, wzrost badanych szczepów był hamowany po zastosowaniu lipopeptydu 6 w stężeniu 128 – 256  $\mu\text{g/mL}$ . Zahamowanie wzrostu PM było obserwowane jedynie po aplikacji związku w najwyższym testowanym stężeniu (512  $\mu\text{g/mL}$ ).

Połączenie sekwencji aminokwasowej KKC z kwasem heksadekanowym wpłynęło na istotne obniżenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej w porównaniu do lipopeptydu zawierającego kwas dodekanowy. Natomiast dla związków zawierających dwie reszty aminokwasowe – lizynę i argininę zaobserwowano wyższą aktywność mikrobiologiczną w przypadku połączenia z kwasem heksadekanowym w porównaniu z lipopeptydami zawierającymi kwasy o krótszych łańcuchach ( $\text{C}_{12}\text{-KR-NH}_2$  i  $\text{C}_{14}\text{-KR-NH}_2$ ). Może to wynikać z obecności argininy, która wykazuje zdolność tworzenia rozległych, stabilnych wiązań wodorowych pomiędzy grupą guanidynową, a resztami fosforanowymi lipidów, prowadząc do deformacji błony komórkowej [251, 252].

Badania przeprowadzone przez Mitchell i wsp. wykazały, że polimery zawierające reszty argininy penetrują błony komórkowe znacznie efektywniej niż analogi o równej długości zawierające reszty pozostałych aminokwasów zasadowych: lizyny, ornityny czy histydyny. Wyniki eksperymentu wykazały, że grupa guanidynowa argininy była krytycznym składnikiem strukturalnym odpowiedzialnym za aktywność biologiczną badanych związków jako efekt silnych oddziaływań błonowych [253].

Na tej podstawie przeprowadzono liczne badania projektowania analogów o różnych sekwencjach aminokwasowych. Sikorska i wsp. zaprojektowali krótkie lipopeptydy o jednakowej sekwencji bogatej w argininę (tetrapeptyd - RRRR) połączonej z resztami kwasu dodekanowego ( $\text{C}_{12}$ ), tetradekanowego ( $\text{C}_{14}$ ) i heksadekanowego ( $\text{C}_{16}$ ).

Uzyskane związki wykazały silną aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów Gram-dodatnich. Na szczególną uwagę zasługuje porównanie wyników uzyskanych dla peptydu  $C_{16}$ -RRRR-NH<sub>2</sub> i  $C_{16}$ -KKKK-NH<sub>2</sub>. Oba lipopeptydy wykazały porównywalną aktywność przeciwdrobnoustrojową, ale stwierdzono, znaczące różnice w interakcji z dwuwarstwową błoną lipidową [254, 255].

Wpływ na aktywność związku ma specyfika i chiralność aminokwasów w sekwencji oraz długość łańcucha hydrofobowego. Modulacja tych czynników może istotnie wpływać na siłę oddziaływania lipopeptydu z błoną drobnoustroju. Wykazano, że zmiana konfiguracji aminokwasów na D-izomery zwiększa odporność związku na działanie proteaz [256].

Zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi skrócenie łańcucha kwasu tłuszczowego z jednoczesną modyfikacją sekwencji aminokwasowej (dodanie reszt aminokwasów hydrofobowych lub/i D-aminokwasów) pozwoliło pozyskać związki o ulepszonej aktywności i selektywności przeciwdrobnoustrojowej [257]. Serrano i wsp. wykazali, że ultrakrótkie peptydy zawierające alaninę, glicynę, leucynę i lizynę w połączeniu z kwasem palmitynowym cechują się silną aktywnością przeciwko szczepom SA, zarówno MSSA, jak i MRSA [237]. Podobną aktywność wykazywały lipopeptydy złożone z reszt tryptofanu i ornityny w połączeniu z kwasem heksanowym, oktanowym, dekanowym, dodekanowym, tetradekanowym i heksandekanowym [224]. Kombinacja kwasu dodekanowego z krótkimi sekwencjami złożonymi z ornityny i cysteiny spowodowała wysoką aktywność przeciwrzybiczą wobec szczepów klinicznych [231]. Zastosowanie innego lipopeptydu opartego na kwasie dodekanowym,  $C_{12}$ -CKK-NH<sub>2</sub>, w połączeniu z daptomycyną, zmniejszyło rozwój opornych szczepów EF na antybiotyki [258]. Krótkie syntetyczne lipopeptydy zawierające kwas heksadekanowy oraz reszty lizyny i argininy:  $C_{16}$ -KK-NH<sub>2</sub> i  $C_{16}$ -RR-NH<sub>2</sub> nie indukowały rozwoju oporności przez szczepy SA izolowane od pacjentów z atopowym zapaleniem skóry [259]. W innym badaniu potwierdzono ich stosunkowo wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową i umiarkowaną aktywność przeciwrzybiczą [239].

Otrzymane wartości MIC dla temporyny A i citropiny 1.1 również wskazują na ich silniejszą aktywność w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. Wartość MIC wobec tych szczepów dla obu antybiotyków peptydowych nie przekraczała 32 µg/mL. Citropina 1.1 jest także aktywna wobec bakterii Gram-ujemnych. Wzrost szczepów PA i EC był hamowany po zastosowaniu peptydu w stężeniu 32 µg/mL. Jedynie szczep PM odznaczał się zmniejszoną wrażliwością na związek (MIC 256 µg/mL). Uzyskane wyniki badań dla

antybiotyków peptydowych korespondują z danymi literaturowymi oraz wynikami wcześniejszych badań zrealizowanych z użyciem szczepów odpowiedzialnych za infekcje oka [244]. Liczne badania potwierdzają aktywność temporyny A i citropiny 1.1 w stosunku do bakterii Gram-dodatnich [132-134]. Badania prowadzone przez Ciandrini i wsp. potwierdziły ich aktywność przeciwdrobnoustrojową także wobec klinicznych szczepów MRSA [260].

Jak można się było spodziewać szczepy referencyjne w formie wolnopływakowej były podatne na działanie związków konwencjonalnych (MIC od  $\leq 1$  do 64  $\mu\text{g/mL}$  – tabela 4). Jednakże wśród szczepów klinicznych obserwuje się oporność na tę grupę związków [261-263]. Zasadniczo konwencjonalne środki przeciwdrobnoustrojowe wykazały silniejsze działanie przeciwbakteryjne w porównaniu do wykorzystanych związków peptydowych. Cyprofloksacyna wykazała najwyższą skuteczność w stosunku do wszystkich badanych szczepów. Wartość MIC zarówno dla drobnoustrojów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wynosiła  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$ . Cyprofloksacyna zajmuje ważne miejsce w terapii zakażeń narządu wzroku ze względu na korzystne przenikanie do wnętrza oka po podaniu ogólnym i osiągnięcie stężeń terapeutycznych w płynie łzowym. Poza tym fluorochinolony stanowią najczęściej stosowaną klasę miejscowych terapeutyków w leczeniu infekcji oka [228, 242, 249, 264]. W postaci 0,3% kropli ocznych cyprofloksacyna jest stosowana w infekcjach okulistycznych związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych. Jest wysoce aktywna zarówno wobec szczepów Gram-ujemnych jak i niektórych Gram-dodatnich m.in. opornych na aminoglikozydy, szczepów *Pseudomonas* oraz opornych na metycylinę szczepów *Staphylococcus*. Mechanizm działania cyprofloksacyny polega na hamowaniu syntezy DNA w komórkach bakteryjnych poprzez blokowanie topoisomerazy typu II (gyrazy DNA) i topizomerazy IV. Zahamowanie aktywności tych enzymów prowadzi do uszkodzenia materiału genetycznego i zablokowania licznych procesów komórkowych. Szerokie spektrum aktywności cyprofloksacyny, dobre przenikanie do większości tkanek i osiągnięcie w nich wysokich stężeń terapeutycznych oraz relatywnie niska toksyczność sprawia, że jest rutynowo stosowana w terapii wielu zakażeń. Następstwem powszechnego stosowania jest jednak rozwój oporności i obniżenie aktywności antybiotyku [99, 265]. W ostatnich latach obserwuje się powolny rozwój oporności szczepów *Pseudomonas*, *Staphylococcus* i *Streptococcus* na cyprofloksacynę [164]. Pomimo stosowania wyższych stężeń leku w podaniu miejscowym, rośnie liczba doniesień o niepowodzeniach klinicznych w terapii infekcji

okulistycznych [228, 242, 266]. Oporność na cyprofloksacynę często jest skutkiem mutacji genów kodujących bakteryjne topoizomery i zwykle rozwija się powoli i stopniowo, przy współdziałaniu mechanizmów lekooporności polegających na zmianie przepuszczalności ściany komórkowej bakterii lub czynnym usuwaniu substancji czynnej z wnętrza komórki bakteryjnej. Narastanie oporności jest skutkiem wielokrotnego narażenia drobnoustrojów na niskie dawki leku szczególnie w terapii stanów przewlekłych lub wcześniejszego przerwania leczenia [267]. Trudności w leczeniu zakażeń układu moczowego (ZUM) w ostatnich latach wynikają z nabywaniem mechanizmów oporności na klasyczną terapię, w tym wobec fluorochinolonów. Zjawisko to dotyczy nie tylko szczepów szpitalnych, ale w mniejszym stopniu również szczepów pozaszpitalnych [268]. W badaniu przeprowadzonym na szczepach EC izolowanych ze szpitalnych ZUM wykazano wysoki procent szczepów opornych na antybiotyki, w tym wobec cyprofloksacyny (19,4%) [269]. Wykazano, że związek referencyjny okazał się najaktywniejszą substancją przeciwbakteryjną wykorzystaną w badaniu.

Natomiast dla chloramfenikolu, drugiego związku odniesienia zaobserwowano niższą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Związek hamował wzrost badanych szczepów w zakresie stężeń od 4 do 64 µg/mL. Wzrost bakterii Gram-dodatnich był hamowany po zastosowaniu chloramfenikolu w stężeniu 4-8 µg/mL. Związek wykazał podobną aktywność wobec szczepu EC (MIC 4 µg/mL), a aplikowany w stężeniu 16 µg/mL hamował wzrost szczepu PM. Zahamowanie wzrostu PA wymagało zastosowania wyższego stężenia (64 µg/mL).

Chloramfenikol jest antybiotykiem o szerokim spektrum działania. Stosowanie chloramfenikolu w ostatnich latach zostało ograniczone do zastosowania miejscowego ze względu na wysokie ryzyko wystąpienia działań niepożądanych. Podawanie ogólnoustrojowe chloramfenikolu łączono z przypadkami śmiertelnej niedokrwistości plastycznej [270, 271]. Utrzymujący się problem występowania szczepów wieloopornych doprowadził do ponownego zainteresowania chloramfenikolem w aspekcie zastosowania miejscowego w infekcjach okulistycznych [272]. W postaci maści do oczu lub kropli do oczu (0,5%), chloramfenikol stosowany jest w leczeniu bakteryjnego zapalenia spojówek. Zewnętrznie w postaci maści na skórę (1% lub 2%) jest też stosowany w leczeniu ropnych zmian skórnych związanych z obecnością bakterii opornych na leczenie innymi preparatami przeciwdrobnoustrojowymi. Obecnie chloramfenikol jest szeroko wykorzystywany w leczeniu i zapobieganiu powierzchownym infekcjom oka, a także w ciężkich zakażeniach tkanek ze względu na szerokie spektrum



działania i właściwości antybakteryjne. Chloramfenikol jest antybiotykiem bakteriostatycznym, którego mechanizm działania polega na hamowaniu aktywności peptydotransferazy podjednostki 50S rybosomu bakterii, uniemożliwiając przenoszenie aktywowanych aminokwasów z RNA do rybosomów. Oporność na chloramfenikol jest najczęściej spowodowana syntezą acetylotransferazy chloramfenikolowej, która powoduje jego inaktywację. Oporność może wynikać także z aktywnego wypompowywania leku z komórki. Geny kodujące oba wyżej wymienione mechanizmy związane są z elementami mobilnymi takimi jak plazmidy lub transpozony. Ponadto, występowanie oporności może być związane z mutacją lub modyfikacją miejsca docelowego dla leku, powodując zmniejszenie przepuszczalności błon zewnętrznych [273].

## **2. AKTYWNOŚĆ PEPTYDÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH ORAZ ZWIĄZKÓW KONWENCJONALNYCH WOBEC BIOFILMU BAKTERYJNEGO**

### **2.1. MBEC związków wobec biofilmu wytworzonego na płytkach polistyrenowych**

Wykazano, że lipopetydy prezentują skuteczne działanie antybiofilmowe wobec bakterii Gram-dodatnich oraz znacząco słabsze lub nieskuteczne działanie wobec bakterii Gram-ujemnych hodowanych na powierzchni PS. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 5, str. 63.

Większość badanych lipopetydów prezentowała silne działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec biofilmu utworzonego przez SA i SE na powierzchni polistyrenowej. Najbardziej podatnym szczepem był SE. Efekt eradykacji biofilmu uzyskano po zastosowaniu większości lipopeptydów w stężeniu 4-16  $\mu\text{g/mL}$ . Aby weliminować biofilm utworzony przez szczep SA na powierzchni polistyrenowej potrzebne były wyższe stężenia tych związków (MBEC = 16-64  $\mu\text{g/mL}$ ).

Obiecujące wyniki dla aktywności przeciwgronkowcowej uzyskano dla krótkich lipopeptydów 4, 5 i 7. Zastosowanie lipopeptydu 4 w stężeniu MIC (4  $\mu\text{g/mL}$ ) skutecznie eliminowało biofilm SE, a zaaplikowanie związku w stężeniu 16  $\mu\text{g/mL}$  było wystarczające do eradykacji biofilmu SA. Zarówno lipopetyd 5 jak i 7 wykazał aktywność wobec biofilmu gronkowców w tych samych stężeniach. Eliminacja struktur formowanych przez SE i SA była obserwowana po ekspozycji na związki odpowiednio w stężeniu 8  $\mu\text{g/mL}$  i 32  $\mu\text{g/mL}$ .

Najmniej skutecznymi lipopetydami względem wszystkich szczepów były związki 3 i 6. Eradykacja najbardziej wrażliwego na ich działanie szczepu SE wymagała zastosowania wysokich stężeń (128 - 256  $\mu\text{g/mL}$ ).

W warunkach fizjologicznych bakterie SE są mikroorganizmami komensalnymi, wchodzącymi w skład flory bakteryjnej skóry, błon śluzowych oraz powierzchni oka u człowieka. W sytuacji wprowadzania biomateriału te pozornie niegroźne bakterie mogą kolonizować jego powierzchnię, namnażać się i prowadzić do infekcji. SE jest jednym z głównych czynników etiologicznych zakażeń związanych z obecnością biomateriałów w organizmie pacjenta. Zdolność szczepu do przylegania i tworzenia biofilmu na powierzchni biomateriałów oraz oporność wobec standardowej terapii i stanowi główny czynnik ryzyka rozwoju przewlekłych infekcji [274].

Szacuje się, że szczepy SE oraz SA są odpowiedzialne za ok 40-50% infekcji sercowo-naczyniowych związanych z biofilmem oraz za ok 50-70% infekcji związanych z tworzeniem się biofilmu na cewnikach [275-277].

Infekcje związane z formowaniem biofilmu stanowią 80% zakażeń szpitalnych, a SA jest najczęściej izolowanym szczepem [95, 278, 279]. Zakażenia tego typu oraz częściej są wywoływane są przez szczepy wielolekooporne [280, 281]. Dlatego ze względu na powszechne występowanie, narastającą wielooporność oraz znaczący udział w zakażeniach szpitalnych, SA, a dokładniej MRSA został wpisany przez Światową Organizację Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) na listę patogenów, wobec których pilnie poszukiwane są nowe terapeutyki [282]. Według dostępnych danych SA

i CoNS (szczególnie SE) są uznawane za główne czynniki etiologicznymi zakażeń oka, ale ich częstość występowania jest różna w zapaleniu rogówki (SA > 25%) i zapaleniu wnętrza gałki ocznej (SE > 30%). Ponadto SA i PA uznane zostały za główną przyczynę bakteryjnego zapalenia rogówki związanego z soczewkami kontaktowymi [283-287]. W związku z powyższym wyniki uzyskane dla krótkich lipopeptydów są bardzo obiecujące.

Aktywności przeciwgronkowcowe wielu lipopeptydów zostały także potwierdzone wobec klinicznych szczepów SA [122, 212, 231, 288]. W dodatku stężenia aktywne wobec biofilmów gronkowcowych były zwykle tylko kilka razy wyższe niż MIC, podczas gdy w przypadku konwencjonalnych środków przeciwdrobnoustrojowych stężenia co najmniej 50–100 razy wyższe niż MIC są potrzebne do wyeliminowania struktury biofilmów [231, 244]. W badaniach nad pochodnymi kwasu heksadekanowego wykazały, że ich skuteczność wobec biofilmu tworzonego przez kliniczne szczepy SA jest, porównywalna z wankomycyną [234, 289]. Ponadto peptyd C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub> wzmógł aktywność antybiotyku stosowanego w profilaktyce naczyniowej infekcji SA w modelu szczurzym [289].

W porównaniu do związków konwencjonalnych badane krótkie lipopeptydy wykazały znacznie silniejszą aktywność wobec biofilmu utworzonego przez szczep EF. Stężenia potrzebne do eradykacji biofilmu przez lipopeptydy były kilka razy wyższe niż ich wyznaczone wartości MIC. Wyjątek stanowi lipopeptyd 8, dla którego wartość MBEC (64 µg/mL) odpowiadała wartości MIC. Tą samą wartość MBEC oznaczono dla lipopeptydów 4, 5 i 7. Najsilniejszą aktywność wobec biofilmu EF wykazały lipopeptydy 1 i 9 (MBEC= 32 µg/mL). W stosunku do tego samego szczepu wartość MBEC lipopeptydów 2 i 3 wynosiła 256 µg/mL. Użycie najwyższego stężenia było niezbędne,

aby skutecznie usunąć biofilm EF za pomocą lipopetydu 6, który tym samym okazał się najslabiej działającym związkiem peptydowym w tym oznaczeniu. W warunkach fizjologicznych EF kolonizuje ludzki przewód pokarmowy. Enterokoki są także częstymi czynnikami etiologicznymi szpitalnych zakażeń związanych ze stosowaniem cewników. Istotnym problemem jest obserwowany wzrost oporności szczepu EF na wiele antybiotyków, w tym klindamycynę, cefalosporyny i aminoglikozydy [290]. Z związku z powyższym wyniki uzyskane dla krótkich lipopeptydów wobec biofilmu EF są obiecujące.

Biofilmy utworzone przez PA były niewrażliwe na działanie większości badanych krótkich lipopetydów. Aktywność wobec struktur PA zaobserwowano dla lipopetydu 3 (MBEC = 245  $\mu\text{g/mL}$ ) oraz lipopetydów 7 i 9 (MBEC = 512  $\mu\text{g/mL}$ ). Pozostałe lipopeptydy nie wykazały zdolności do eradykacji biofilmów PA w najwyższych zastosowanych stężeniach.

Stosunkowo niższą aktywność zaobserwowano także wobec szczepu EC. Dla większości krótkich lipopeptydów efekt eliminacji biofilmu EC był obserwowany w zakresie wysokich stężeń (128-512  $\mu\text{g/mL}$ ). Najniższe stężenie aktywne wobec biofilmu EC wynosiło 64  $\mu\text{g/mL}$  (lipopeptyd 7, 9). Wyznaczone wartości MBEC dla lipopetydów 1 i 2 oraz 4 i 5 wynosiły odpowiednio 256  $\mu\text{g/mL}$  oraz 128  $\mu\text{g/mL}$ . Pozostałe związki (lipopeptyd 3 i 6) prezentowały aktywność wobec biofilmów EC w stężeniu 512  $\mu\text{g/mL}$ . Stosunkowo niska aktywność krótkich lipopeptydów wobec biofilmu EC i PA koresponduje z wcześniejszymi wynikami prac [244]. Dotychczas krótkie lipopeptydy zawierające w budowie kwas heksadekanowy były przedmiotem licznych badań. Wyniki przeprowadzonych testów przeciwdrobnoustrojowych były również bardzo obiecujące i potwierdziły silne działanie antybiofilmowe [231, 244]. Ye z wsp. zaprojektowali związek przeciwdrobnoustrojowy L-GL13K będący pochodną peptydu ludzkiego białka śliny BPIFA2. Analog okazał się skuteczny w eliminacji biofilmu szczepu PA, który uważany jest za główny czynnik etiologiczny bakteryjnego zapalenia rogówki [291].

Podobnie jak w przypadku biofilmów formowanych przez PA, struktury formowane przez szczep PM były niewrażliwe na działanie większości badanych krótkich lipopetydów. Eliminacja struktur formowanych przez szczep PM była obserwowana po ekspozycji na lipopeptyd 8 oraz lipopetydy 3 i 7 w najwyższych stosowanych stężeniach (odpowiednio 256 oraz 512  $\mu\text{g/mL}$ ). Aplikacja pozostałych lipopeptydów w najwyższym stosowanym stężeniu okazała się niewystarczająca do

eradykacji utworzonych biofilmów PM. Większość zakażeń PM jest związana ze zdolnością bakterii tego gatunku do przylegania i kolonizacji biomateriałów prowadząc do formowania się struktury biofilmu, co znacznie utrudnia terapię [245]. Wcześniejsze badania nad dojrzałym biofilmem PM potwierdziły trudności w jego eliminacji za pomocą zarówno innych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (omniganan, pexiganan i C<sub>16</sub>-RR-NH<sub>2</sub>) i związków konwencjonalnych (cyprofloksacyna, gentamycyna, neomycyna). Jedynie zastosowanie polimyksyny B i lipopeptydu C<sub>16</sub>-RR-NH<sub>2</sub> w najwyższym stosowanym stężeniu (512 µg/mL) umożliwiło eradykację biofilmu PM [244].

Citropina 1.1 i temporyna A podobnie jak krótkie lipopeptydy wykazały wyższą skuteczność w stosunku do biofilmu formowanych przez bakterie Gram-dodatnie (Tabela nr 5, str. 63). Zastosowanie związków w stężeniu 16 - 32 µg/mL okazało się wystarczające do eliminacji biomów SA i SE. Niższą aktywność peptydów zaobserwowano wobec struktur formowanych przez EF. Wartość MBEC wobec EF dla citropiny 1.1 i temporyny A wynosiły odpowiednio 128 µg/mL i 256 µg/mL. Spośród wszystkich badanych szczepów tylko PA i PM wykazały zdolność formowania biofilmu opornego na działanie temporyny A. Eradykację biofilmu PA i PM zaobserwowano po aplikacji roztworu citropiny 1.1 w stężeniu 128 µg/mL oraz 512 µg/mL.

Citropina 1.1 i temporyna A były przedmiotem badań pod kątem potencjalnego zastosowania w terapii infekcji związanych ze stosowaniem biomateriałów [235, 244]. W badaniach aktywności peptydów wobec dojrzałych struktur utworzonych przez referencyjne szczepy odpowiedzialne za infekcje okulistyczne uzyskano obiecujące wyniki [244]. Aktywność związków peptydowych została potwierdzona także w badaniach *in vivo*. Skuteczność citropiny 1.1 i temporyny A potwierdzono również na zwierzęcych modelach infekcji SA związanych z biofilmem [134, 292].

Cyprofloksacyna okazała się najbardziej skutecznym związkiem w eliminacji biofilmu utworzonego przez wszystkie szczepy (MBEC ≤ 1 µg/mL) z wyjątkiem EF (MBEC > 512 µg/mL). Biofilm utworzony przez EF okazał się oporny na działanie wykorzystanych w badaniu związków konwencjonalnych. Niska aktywność cyprofloksacyny wobec biofilmu EF była już wcześniej obserwowana. W przypadku biofilmu EF korzystniejsze okazało się zastosowanie kombinacji cyprofloksacyny z rifampicyną. W badaniach *in vitro* potwierdzono zdolność do eradykacji struktur EF oraz wykazano zmniejszony rozwój oporności tego szczepu wobec zastosowanej kombinacji [293].

W przypadku chloramfenikolu zaobserwowano aktywność po ekspozycji biofilmów większości szczepów Gram-dodatnich na stężenia kilkakrotnie przewyższające MIC (Tabela 5, str. 63). Podobnie do cyprofloksacyny, chloramfenikol nie wykazał zdolności do całkowitej eliminacji biofilmu EF nawet w najwyższych zastosowanych stężeniach. Oporność biofilmu EF wobec chloramfenikolu może wynikać z utrudnionej penetracji związku przez bakteryjny EPS i działanie pomp usuwających związek z komórki drobnoustroju [294].

Cyprofloksacyna wykazała najwyższą aktywność wobec biofilmu SA hodowlanego na PS (Tabela 5, str. 63). Związek skutecznie eliminował struktury tworzone przez SA i SE w stężeniu odpowiadającym jego wartości MIC ( $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ). W przypadku chloramfenikolu efekt eradykacji SA i SE zaobserwowano po ekspozycji biofilmu na stężenia odpowiednio  $32 \mu\text{g/mL}$  i  $64 \mu\text{g/mL}$ .

Najbardziej skutecznym środkiem eliminującym biofilm bakterii Gram-ujemnych (MBEC  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ) także była cyprofloksacyna. Chloramfenikol wykazał stosunkowo słabszą aktywność. Stężenie skuteczne wobec biofilmu formowanych przez EC, PM i PA wynosiło odpowiednio  $8 \mu\text{g/mL}$ ,  $64 \mu\text{g/mL}$  i  $128 \mu\text{g/mL}$ .

W poprzednich badaniach cyprofloksacyna i gentamycyna stosowane odpowiednio w stężeniach 4 i  $16 \mu\text{g/mL}$ , skutecznie usuwały 3-dniowe dojrzałe struktury biofilmu PA, podczas gdy chloramfenikol i neomycyna prezentowały słabą aktywność antybiofilmową również wobec biofilmu EC [244]. Skuteczność cyprofloksacyny wobec biofilmu wynika z jej dobrych właściwości penetracyjnych. Wykazano, że związek jest obecny w głębszych warstwach struktury nawet do 14 dni po zakończonej terapii [295, 296]. Cyprofloksacyna stanowi lek pierwszego rzutu w ZUM, a spektrum działania obejmuje większość szczepów uropatogennych w tym *E. coli* oraz *P. aeruginosa*. Jednak w innym badaniu wykazano, że w warunkach *in vitro* 24-godzinne traktowanie cyprofloksacyną i fosfomicyną jest nieskuteczne w eliminacji biofilmów PA i EC [297].

## 2.2. MBEC związków wobec biofilmu wytworzonego na soczewkach kontaktowych

Podobnie jak w przypadku hodowli bakteryjnych na PS w przypadku szczepów Gram-dodatnich zaobserwowano wyższą aktywność związków peptydowych w porównaniu z aktywnością wobec bakterii Gram-ujemnych (Tabela nr 6, str. 64). Jednak biofilm referencyjnych szczepów gronkowców utworzony na powierzchni SK był mniej podatny na działanie peptydów w porównaniu do struktur utworzonych na powierzchni PS. Najniższą wartość MBEC (32  $\mu\text{g/mL}$ ) wobec szczepu SE prezentowały lipopeptydy 4 i 8. Eradykacja biofilmów SE na SK wymagała zastosowania co najmniej 2-krotnie wyższego stężenia lipopeptydów w porównaniu do aktywności wobec biofilmu na PS, które były zbliżone do oznaczonych wartości MIC. W przypadku lipopeptydu 6 oznaczona wartość MBEC (256  $\mu\text{g/mL}$ ) wobec SE była jednakowa dla obu testowanych powierzchni.

Wartości MBEC uzyskane dla lipopeptydu 5 i 4 wobec szczepu SA na SK były 16 lub 32 razy wyższe w stosunku do wartości określonych dla PS, które odpowiadały wartościom MIC. Krótkie lipopeptydy prezentowały aktywność wobec biofilmu SA w zakresie wysokich wartości stężeń (128 - 512  $\mu\text{g/mL}$ ), ale nie przekroczyły wartości 512  $\mu\text{g/mL}$ . Wyjątek stanowi lipopeptyd 2, który nie wykazał aktywności w badanym zakresie stężeń. Lipopeptydy 2, 3 i 6 okazały się najmniej aktywnymi związkami wobec struktur formowanych przez gronkowce.

Eliminacja struktur formowanych przez szczepy EF zarówno z powierzchni SK i PS była obserwowana po ekspozycji na związki zaaplikowane w wyższych stężeniach, ale zbliżonych do wartości MIC. W przypadku tego szczepu różnice pomiędzy opornością struktur hodowlanych na PS i SK nie były tak znaczące. Dla lipopeptydów 3, 6 i 8 MBEC określone dla obu powierzchni były równe i wynosiły odpowiednio 256  $\mu\text{g/mL}$ , 512  $\mu\text{g/mL}$  i 64  $\mu\text{g/mL}$ . W przypadku lipopeptydów 2 (MBEC= 128  $\mu\text{g/mL}$ ), 5 (MBEC= 32  $\mu\text{g/mL}$ ) i 7 (MBEC= 16  $\mu\text{g/mL}$ ) zaobserwowano nieco wyższą aktywność wobec bakterii hodowanych na SK, podczas gdy dla pozostałych związków MBEC na SK były czterokrotnie wyższe niż te określone dla powierzchni PS.

Selektywność działania lipopeptydów względem powierzchni jest widoczna w odniesieniu do wyników otrzymanych wobec biofilmów PA na PS. Spośród dziewięciu badanych lipopeptydów, sześć okazało się nieskutecznych w eliminacji biofilmu PA na

PS, a pozostałe związki (lipopeptyd 3, 7 i 9) wykazały aktywność antybiofilmową tylko w stężeniu 256  $\mu\text{g/mL}$ . Lipopeptyd 8 podobnie jak temporyna A i citropina 1.1 prezentował wyższą aktywność wobec struktur PA formowanych na powierzchni SK w porównaniu do PS. Oznaczona wartość MBEC dla SK wynosiła tylko 32  $\mu\text{g/mL}$ , podczas gdy lipopeptyd 8 nie wykazywał aktywności wobec biofilmu PA na utworzonego na PS w zakresie badanych stężeń. Zaobserwowana aktywność lipopeptydu 8 wobec referencyjnego szczepu PA, zachęca do kontynuacji badań w kierunku potencjalnego zastosowania tego związku w leczeniu infekcji bakteryjnego zapalenia rogówki związanego z soczewkami kontaktowymi [298]. Biofilm utworzony przez referencyjny szczep PA na SK okazał się mało wrażliwy na działanie pozostałych lipopetydów. Spośród dziewięciu badanych lipopetydów, pięć związków (lipopeptyd 2, 3, 4, 6 i 7) okazało się nieskutecznych w eliminacji biofilmu z powierzchni SK (Tabela nr 6, str. 64). Pozostałe związki (lipopeptyd 1, 5 i 9) wykazały aktywność antybiofilmową przy zastosowaniu wysokich stężeń (256  $\mu\text{g/mL}$ ).

Podobnie jak w poprzednich testach, biofilmy PM utworzone na SK były niepodatne na wszystkie użyte w badaniu związki peptydowe. Spośród badanych szczepów PM wykazał zdolność formowania biofilmu opornego na działanie wszystkich związków peptydowych użytych w badaniu. Eliminacja struktury biofilmu PM na PS była możliwa jedynie po zastosowaniu wysokich dawek związków, odpowiednio 512  $\mu\text{g/mL}$  (lipopeptydy 3 i 7, citropina 1.1) oraz 256  $\mu\text{g/mL}$  (lipopeptyd 8). Stężenia te okazały się jednak nieskuteczne w celu eradykacji biofilmu PM formowanego na SK.

W przeprowadzonym badaniu MBEC wykazano stosunkową niską efektywność temporyny A w eliminacji biofilmów formowanych na SK. Najniższe aktywne stężenie wynosiło 64  $\mu\text{g/mL}$  i było skuteczne wobec biofilmom SA i PA (Tabela nr 6, str. 64). Należy jednak zwrócić uwagę, że w przypadku biofilmów formowanych przez referencyjny szczep PA na PS, nie zaobserwowano aktywności temporyny A w całym zakresie stężeń. Zastosowanie najwyższych stężeń tego peptydu okazało się jednak nieskuteczne w eliminacji biofilmów formowanych na powierzchniach SK przez PM i EF.

Podobną aktywność prezentowała citropina 1.1. Struktury utworzone przez bakterie Gram-dodatnie na SK były mniej podatne na działanie peptydu w porównaniu do struktur utworzonych na PS. Uzyskane wartości MBEC citropiny 1.1 na SK były dwukrotnie wyższe wobec SE (64  $\mu\text{g/mL}$ ) i EF (256  $\mu\text{g/mL}$ ) oraz czterokrotnie wyższe wobec SA (64  $\mu\text{g/mL}$ ) w porównaniu do wartości MBEC otrzymanych na PS. Eliminacja



struktur utworzonych przez bakterie Gram-dodatnie na SK wymagała zastosowania citropiny 1.1 w MBEC dwukrotnie lub czterokrotnie wyższych niż w przypadku MBEC dla PS. Podobnie jak w przypadku temporyny A, zastosowanie citropiny 1.1 w stężeniu 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  okazało się niewystarczające do eliminacji biofilmów formowanych przez PM. Oba związki peptydowe prezentowały także niską skuteczność wobec biofilmów formowanych przez EC. Eradykację biofilmów EC z powierzchni SK obserwowano po aplikacji citropiny 1.1 i temporyny A, odpowiednio w stężeniach 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Podobnie jak w przypadku temporyny zaobserwowano wyższą skuteczność citropiny 1.1 wobec struktur PA formowanych na powierzchni SK w porównaniu do PS. Zastosowanie citropiny 1.1 w stężeniu 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  skutecznie eliminowało biofilm PA z powierzchni SK. Otrzymane wyniki są bardzo obiecujące ze względu na fakt, że szczep został uznany za najczęstszy czynnik etiologiczny zapaleń będących powikłaniem noszenia soczewek kontaktowych [299]. W odniesieniu do biofilmu PA na powierzchni PS, wartość MBEC citropiny 1.1 była kilkukrotnie wyższa i wynosiła 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . We wcześniejszym badaniu temporyny A i citropiny 1.1 wobec biofilmów utworzonych przez kliniczne szczepy MRSA na powierzchni polistyrenowej i centralnym cewniku żylnym zaobserwowano, że wymagała użycia wysokich dawek i została osiągnięta dopiero po 24 godzinach od ekspozycji. Natomiast kombinacja obu związków z hybrydowym peptydem cekropiny A- mellityny wpłynęła na poprawę skuteczności związków w usuwaniu biofilmu na biomateriałach [300].

Podobnie jak w przypadku biofilmów hodowanych na PS najwyższą aktywność zaobserwowano dla cyprofloksacyny (Tabela nr 6, str. 64). Aplikacja związku w stężeniu 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  skutecznie eliminowała biofilm utworzony na SK wszystkich badanych szczepów z wyjątkiem EF do eliminacji którego niezbędne było zastosowanie związku w stężeniu 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Taką samą wartość MBEC wobec EF oznaczono dla chloramfenikolu. Wobec pozostałych szczepów antybiotyk prezentował znacznie słabsze działanie eliminujące biofilm w porównaniu z cyprofloksacyną (Tabela 6, str. 64). Aby skutecznie usunąć biofilm SA na powierzchni SK konieczne było zastosowanie chloramfenikolu w stężeniu 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Takie samo stężenie związku umożliwiło eliminację biofilmu SA formowanego na PS (Tabela 5, str. 63). Struktury SE tworzone na SK wykazywały znaczną oporność wobec chloramfenikolu w porównaniu do powierzchni PS. Eliminacja biofilmu SE z powierzchni SK wymagała użycia czterokrotnie wyższego stężenia chloramfeniklu (256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) w porównaniu do wartości MBEC na PS. Korzystniejsze działanie chloramfenikolu zaobserwowano wobec bakterii Gram-

ujemnych. Związek eliminował biofilm bakterii EC i PA z powierzchni SK w stężeniu odpowiadającym ich wartościom MIC (4  $\mu\text{g/mL}$  i 64  $\mu\text{g/mL}$ ). W odniesieniu do poprzednich wyników, dwukrotnie wyższe stężenia chloramfenikolu były niezbędne, aby skutecznie usunąć struktury tych samych szczepów z powierzchni PS. W stosunku do szczepu PM, wartość MBEC chloramfenikolu wynosiła 64  $\mu\text{g/mL}$  (4xMIC) i była równa dla obu powierzchni.

Z uwagi na trudności eliminacji biofilmu EF za pomocą konwencjonalnej antybiotykoterapii oraz korzystne wyniki badania aktywności względem szczepów SA, SE i PA dla niektórych badanych związków peptydowych wyniki pracy można uznać za obiecujące.

Otrzymane wyniki są zgodne z dotychczas przeprowadzonymi badaniami aktywności związków peptydowych wobec biofilmów hodowanych na różnych powierzchniach. Wcześniejsze badania *in vivo* przeprowadzone na królikach i świnkach morskich, u których wywołano owrzodzenie oka i zapalenie spojówek, potwierdziły skuteczność soczewek kontaktowych impregnowanych melaminą. Powłoka istotnie zredukowała obawy zakażenia w obu modelach badawczych [188]. Peptydy GL13K i DGL13K zostały użyte w stomatologii do bezpośredniego pokrywania zębiny przed zabiegami rekonstrukcyjnym. Zmodyfikowane kompozyty zębiny były odporne na hydrolityczne, mechaniczne i enzymatyczne sposoby degradacji *in vitro* oraz wykazały aktywność wobec wielogatunkowych biofilmów szczepów odpowiedzialnych za rozwój próchnicy [301]. Syntetyczne D-enancjomery: DJK-5 i DJK-6 wykazały silną aktywność antybiofilmową o szerokim spektrum działania oraz zdolność do eliminacji biofilmów *P.aeruginosa*. W badaniach *in vitro* i *in vivo* potwierdzono ich silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, a także odporność wobec proteaz [228]. Peptyd P10, zaprojektowany w oparciu o LL-37 wykazał zdolność eliminacji biofilmu MRSA, w tym również opornego na muropicynę MRSA w modelu ludzkiej rany skóry [302]. Anunthawan i współ. zaprezentowali dwa syntetyczne bogate w tryptofan kationowe peptydy KT2 i RT2, które prezentują wysoką aktywność wobec biofilmom wieloopornych *E. coli* przy zastosowaniu w stężeniach poniżej MIC. Oba peptydy skutecznie hamują rozwój oraz eliminują dojrzałe struktury biofilmu [303].

### **3. OZNACZENIA WPLYWU BADANYCH ZWIĄZKÓW NA FORMOWANIE SIĘ BIOFILMÓW BAKTERYJNYCH NA POWIERZCHNI POLISTYRENOWEJ ORAZ SOCZEWEK KONTAKTOWYCH (MBFIC)**

Przeprowadzone badanie miało na celu określić zdolność związków peptydowych do ograniczania procesu formowania się biofilmu bakteryjnego na dwóch rodzajach powierzchni o różnych właściwościach. Stwierdzono, że suplementacja pożywki MHB II związkami ogranicza proces tworzenia biofilmu przez badane szczepy referencyjne zarówno na powierzchni polistyrenowej jak i na soczewkach kontaktowych. Otrzymane wartości MBFIC dla obu badanych powierzchni zostały przedstawione w tabeli 7 i 8, str. 66-67.

Podobnie jak w przypadku badań aktywności wobec komórek wolnopływających oraz dojrzałego biofilmu korzystniejsze wyniki uzyskano dla lipopeptydów wobec bakterii Gram-dodatnich. Wobec bakterii Gram-ujemnych najwyższą skuteczność wykazała cyprofloksacyna. Skutecznie zapobiegała powstawaniu biofilmu większości szczepów po aplikacji w niskich stężeniach ( $\leq 1-16 \mu\text{g/mL}$ ). Wyjątek stanowi szczep EF, który był niewrażliwy zarówno na działanie cyprofloksacyny jak i chloramfenikolu w zakresie stosowanych stężeń. Chloramfenikol jako drugi związek odniesienia prezentował słabszą aktywność hamowania rozwoju biofilmów bakteryjnych w porównaniu do cyprofloksacyny.

W przeprowadzonym badaniu szczepem o najwyższej oporności na związki peptydowe okazał się PM. W przypadku tego szczepu zahamowanie tworzenia się biofilmu zaobserwowano dopiero po aplikacji najwyższych stężeń większości związków peptydowych, a w kilku przypadkach nawet ekspozycja na najwyższe stężenia, nie ograniczała kolonizacji powierzchni przez PM. Zahamowanie rozwoju struktur formowanych przez PM było obserwowane jedynie po ekspozycji hodowli na związki konwencjonalne. Cyprofloksacyna, najaktywniejszy związek w badaniu hamowania rozwoju biofilmu PM zarówno na PS i SK wykazała działanie w stężeniu odpowiadającym MIC ( $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ). Chloramfenikol prezentował podobną aktywność wobec bakterii hodowanych obu powierzchniach po aplikacji w stężeniu  $16 \mu\text{g/mL}$ .

Zahamowanie rozwoju biofilmu PA wymagało zastosowania większości związków peptydowych w stężeniu  $512 \mu\text{g/mL}$ . Obiecujące wyniki uzyskano dla lipopetydu  $9-(\text{C}_{10})_2\text{-KKKK-NH}_2$ . Suplementacja pożywki MHB II tym związkiem w stężeniu  $64 \mu\text{g/mL}$  skutecznie hamowała rozwój biofilmu PA na obu rodzajach

powierzchni. Podobnie jak w przypadku PM, najwyższą aktywność w zapobieganiu formowaniu się biofilmu PA na obu powierzchniach wykazała cyprofloksacyna. Użycie cyprofloksacyny w stężeniu odpowiadającym MIC ( $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ) było wystarczające do zapobiegania tworzenia struktur formowanych na PS. Natomiast w przypadku powierzchni SK stężenie zapobiegające powstawaniu biofilmu PA na SK było nieco wyższe i wynosiło  $16 \mu\text{g/mL}$ . Chloramfenikol wykazał stosunkową słabą skuteczność wobec PA. Efekt zapobiegania tworzenia się biofilmu obserwowano po zastosowaniu związku w stężeniu  $256 \mu\text{g/mL}$  (dla PS) i  $512 \mu\text{g/mL}$  (dla SK).

W porównaniu do szczepów PA i PM, szczep EC okazał się bardziej podatny na działanie krótkich lipopeptydów. Formowanie się biofilmu EC było hamowane przez lipopeptydy w stężeniach równych lub kilka razy wyższych niż wartości MIC. Satysfakcjonujące wyniki uzyskano dla lipopeptydu 7. Oznaczone wartości MBFIC wyniosły odpowiednio  $32$  i  $64 \mu\text{g/mL}$  na SK i PS. Stężenie  $64 \mu\text{g/mL}$  było również wystarczające do zahamowania rozwoju biofilmu EC przez lipopeptyd 8 na obu typach powierzchni, lipopeptydy 3 i 9 na SK i lipopeptyd 5 na PS. W większości związków MBFIC oznaczony dla EC na SK był równy lub niższy niż wartości uzyskane na PS. Tylko w przypadku lipopeptydu 5 zaobserwowano silniejszą aktywność hamowania tworzenia się biofilmu na powierzchni PS niż SK. Citropina 1.1. i temporyna A prezentowały niską aktywność hamowania tworzenia biofilmu EC. Skuteczne stężenia hamujące rozwój biofilmu były kilkukrotnie wyższe od MIC. Stężenia MBFIC dla obu powierzchni były jednakowe i wynosiły  $512$  i  $256$  odpowiednio dla temporyny A i citropiny 1.1.

Znacznie silniejszą aktywność wobec EC wykazały związki odniesienia. Cyprofloksacyna skutecznie zapobiegała formowaniu się biofilmu EC na obu powierzchniach w stężeniu odpowiadającym MIC. Zbliżone wyniki uzyskano dla chloramfenikolu. Związek wykazał zdolność hamowania rozwoju biofilmu na PS w stężeniu odpowiadającym MIC i  $2\times\text{MIC}$  w przypadku powierzchni SK.

Wśród szczepów Gram-dodatnich, najmniej wrażliwym szczepem na stosowane związki peptydowe był EF. Największy wpływ na ograniczenie tworzenia biofilmu EF wykazał lipopeptyd 1, który był także najaktywniejszy wobec komórek wolnopływających. Określone wartości MBFIC wyniosły odpowiednio  $16$  i  $64 \mu\text{g/mL}$  dla PS i SK. Lipopeptydy 2 i 6 oraz temporyna A wykazały najsłabsze działanie hamujące rozwój biofilmu EF. Wyniki uzyskane na obu powierzchniach dla lipopeptydów były jednakowe. Temporyna A prezentowała zdolność hamowania rozwoju biofilmu EF na PS

w stężeniu 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . W odniesieniu do SK ten sam efekt zaobserwowano po aplikacji związku w dwukrotnie wyższym stężeniu. Citropina 1.1 wykazała zdolność hamowania rozwoju biofilmu na obu powierzchniach w użytym stężeniu 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Należy zazaczyć, że w przypadku związków konwencjonalnych zastosowane stężenia okazały się niewystarczające do zapobiegania formowania się biofilmu EF.

Aplikacja lipopeptydów w zakresie niskich stężeń pozwoliła skutecznie ograniczyć rozwój biofilmów gronkowców. Najbardziej aktywne związki (lipopeptyd 4, 8 i 9) hamowały tworzenie biofilmu SA w stężeniach od 2 do 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . W przypadku SE najbardziej aktywnymi związkami były lipopeptydy 1 i 9 (MBFIC 8 - 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Wartości MBFIC uzyskane dla SA i SE były do siebie zbliżone, w przeciwieństwie do wyników uzyskanych w teście MIC, w którym szczep SE był znacznie bardziej podatny na działanie środków przeciwdrobnoustrojowych. Aby zahamować tworzenie się biofilmu SE, konieczne było stosowanie lipopeptydów w stężeniach kilka razy wyższych niż wartości MIC, podczas gdy dla szczepu SA wartości MBFIC były zwykle równe lub nawet niższe niż uzyskane MIC.

W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano różnice między wpływem na tworzenie biofilmu na PS i SK. Zasadniczo związki peptydowe silniej hamowały tworzenie się biofilmu na powierzchni polistyrenowej (MBFIC dla SK był dwukrotnie wyższy niż dla PS). Jedynie dla lipopeptydów 3 i 6 zaobserwowano silniejsze działanie hamujące wobec biofilmu na powierzchni soczewek kontaktowych. Dla lipopeptydu 4 otrzymano jednakowe wartości MBFIC zarówno na SK i PS.

W przypadku SA wpływ związków na tworzenie się biofilmu na różnych powierzchniach był jeszcze bardziej zróżnicowany. Dla lipopeptydów 1, 5 i 7 wartości MBFIC uzyskane na PS i SK były równe (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Suplementacja lipopeptydami 2, 8 i 9 skuteczniej hamowała formowanie się biofilmu SA na PS niż na SK, w przeciwieństwie do lipopeptydów 3, 4 i 6, które wykazały silniejszy efekt hamujący tworzenie się biofilmu na powierzchni SK.

Citropina 1.1 wykazała zdolność hamowania rozwoju biofilmu SA dla obu powierzchni w stężeniu odpowiadającym MIC (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). W przypadku szczepu SE efekt hamujący wymagał zastosowania związku w stężeniach odpowiadającym 2- i 3-krotności MIC, odpowiednio dla SK i PS. Zbliżone wyniki uzyskano dla temporyny A.

Otrzymane wyniki pracy wskazują, że biofilm utworzony przez gronkowce na hydrofilowej powierzchni SK był znacznie bardziej odporny na działanie peptydów w porównaniu ze strukturą PS. Jednak w badaniu wpływu lipopeptydów na proces formowania się biofilmu na obu testowanych materiałach nie odnotowano takich rozbieżności.

Powyższe obserwacje wskazują złożoność mechanizmów zachodzących w procesie formowania i funkcjonowania biofilmów. Poznanie mechanizmów oddziaływania peptydów na proces tworzenia się biofilmu oraz określenie ich zależności z rodzajem kolonizowanej powierzchni jest kluczowe dla dalszych badań pod kątem potencjalnego zastosowania tych związków w profilaktyce infekcji związanych z biofilmem.

Zdolność do adhezji, kolonizacji powierzchni, a w konsekwencji do formowania biofilmu jest w głównej mierze uwarunkowana właściwościami fizykochemicznymi biomateriałów. Precyzyjne ustalenie tej zależności jest jednak trudne do ustalenia biorąc pod uwagę złożoną strukturę i mechanizmy formowania biofilmu. Według danych literaturowych istnieją istotne różnice w przyczepności i zdolności do formowania biofilmu SA, SE, EC i PA na różnego rodzaju metalowych implantach ortopedycznych. Drobnoustroje wykazują zdolność kolonizacji niemal wszystkich badanych powierzchni: wysoce usieciowanego polietylenu, tytanu, stali nierdzewnej oraz stopu kobaltowo-chromowego [304]. Spośród badanych materiałów, powłoka kobaltowo-chromowa wykazała najwyższą odporność na adhezję bakterii [305]. W badaniu adhezji drobnoustrojów i kolonizacji biofilmu wielogatunkowego na powierzchni powłok tytanowych wykazano umiarkowany wpływ chropowatości powierzchni na tworzenie biofilmu [306]. Natomiast w badaniu kompozytu żywicznego Park i współ. wykazali, że struktura powierzchni i stopień jej chropowatości ma istotny wpływ na tworzenie się biofilmu *Streptococcus mutans* [307]. W świetle danych literaturowych materiały hydrofobowe wykazują znaczną odporność na formowanie biofilmu, a przypadku kolonizacji drobnoustrojów umożliwiają szybką i skuteczną eradykację. Ze względu na wieloczynnikowy mechanizm obu zjawisk, brak jest jednoznacznej korelacji pomiędzy tworzeniem biofilmu i jego trwałością [308, 309].

Badania prowadzone przez Dutta i wsp., nad zjawiskiem adhezji bakteryjnej do hydrożelowych soczewek kontaktowych, wykazały, że głównymi czynnikami wpływającymi na kolonizację biomateriału jest hydrofobowość powierzchni, dostępność mediów oraz unikalne cechy danego szczepu. Wyniki badań *in vitro* potwierdziły, że adhezja PA jest wyższa niż w przypadku pozostałych szczepów odpowiedzialnych za

infekcje oka, co może być jednym z powodów dominacji tego szczepu w bakteryjnym zapaleniu rogówki. Proces kolonizacji soczewki kontaktowej był bardzo szybki i zwykle po 1 godzinie osiągał maksymalny poziom. Formowanie biofilmu było obserwowane po 24 godzinach od aplikacji szczepu [58].

Wyniki przeprowadzonych badań są zgodne z dotychczasowymi doniesieniami na temat potencjalnego zastosowania peptydów przeciwdrobnoustrojowych i ich syntetycznych analogów w profilaktyce infekcji związanych z biofilmem. Badania *in vivo* wykazały skuteczność citropiny 1.1 i temporyny A na zwierzęcych modelach infekcji wywołanych przez SA [132, 310]. W innym badaniu potwierdzono zdolność temporyny A do zapobiegania adhezji komórek SA do protezy naczyniowej na modelu szczurzym [311]. Badania prowadzone przez Ciandrini i wsp. wykazały aktywność citropiny 1.1 i temporyny A w hamowaniu rozwoju biofilmów klinicznych szczepów MRSA na powierzchni polistyrenowej i centralnym cewniku żylnym (CVC) [300].

W badaniach nad peptydami ssaków wykazano, że ludzka katelicyna LL-37 hamuje tworzenie biofilmu PA poprzez zakłócanie adhezji drobnoustrojów oraz zakłócanie mechanizmu quorum sensing [58, 160]. Związek LL-37 hamuje proces formowania się biofilmu oraz powoduje jego eradykację w stężeniach znacznie niższych niż stężenia MIC [160]. W stężeniu 0,5 µg/mL LL-37 zapobiegania tworzenia biofilmu *P.aeruginosa*, głównego czynnika etiologicznego zapalenia płuc u chorych na mukowiscydozę oraz wobec szczepu *Francisella novicida* odpowiedzialnego za rozwój tularemii [312]. Antyadhezyjne właściwości peptydu zostały potwierdzone także w badaniu nad rozwojem biofilmu *S. epidermidis* [58, 160]. Unieruchomieniu peptydu LL-37 na tytanowej powierzchni uprzednio modyfikowanej hydrofilowym, nietoksycznym Poli(glikolem etylenowym)- PEG pozwoliło uzyskać powłokę o właściwościach bakteriobójczych [313].

Syntetyczne peptydy przeciwdrobnoustrojowe, zaprojektowane w oparciu o sekwencję LL-37 takie jak OP-145, SAAP-145, SAAP-148 i SAAP-267 wykazały zdolność zapobiegania formowania się biofilmu szczepu SA wyizolowanego z zakażenia związanego z biofilmem [181, 314, 315].

Skuteczną strategią stosowaną w walce z zakażeniami towarzyszącymi stosowaniu biomateriałów są powłoki o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Do powlekania materiałów biomedycznych wykorzystywano między innymi konwencjonalne antybiotyki, metale szlachetne, czwartorzędowe związki amoniowe, kwas salicylowy, substancje polimerowe i peptydy przeciwdrobnoustrojowe [316].

Inkorporacja nanocząsteczkami srebra hydrożelowych soczewek kontaktowych oraz pojemników do przechowywania soczewek spowodowała ograniczenie adhezji PA i SA do powierzchni biomateriału [317]. Jednak zastosowanie związków srebra lub innych nieorganicznych substancji chemicznych może wywołać działanie toksyczne w warunkach *in vivo* [318]. Pokrywanie ortopedycznych protez tytanowych powłoką z poli(glikolem etylenowym) - PEG uwalniającą wankomycynę skutecznie hamuje formowanie się biofilmu SE. Uwalnianie antybiotyku w trybie ciągłym wiąże się jednak występowaniem działań niepożądanych tj. obrzęk w miejscu zakażenia [319]. Natomiast endoprotezy impregnowane powłoką uwalniającą genatymycynę wykazały szerokie spektrum działania i skuteczność wobec klinicznych izolatów SA.

Powlekanie silikonowo-hydrożelowych soczewek kontaktowych peptydem Mel-4 okazało się skuteczną strategią w profilaktyce zakażeń związanych z biofilmem. Dodatkowo przeciwdrobnoustrojowa powłoka nie prezentowała oznak cytotoksyczności ani podrażnienia w króliczym modelu oraz w badaniach klinicznych u ludzi [320, 321].

Potwierdzono zdolność laktoferyny do hamowania adhezji *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia* odpowiedzialnych za formowanie biofilmów na blaszkach poddziąsłowych [322]. Antybiofilmowe właściwości peptydu zostały wykorzystane do projektowania bezpieczniejszych implantów stomatologicznych. Unieruchomienie związku na powierzchni tytanowej skutecznie zredukowało kolonizację bakterii *Porphyromonas gingivalis*, czynnika etiologicznego próchnicy [323]. Według wcześniejszych doniesień aplikacja laktoferyny już w stężeniu 20 µg/mL hamuje formowanie biofilmu PA poprzez zapobieganie zależnej od lektyn adhezji bakteryjnej, ingerując w system *quorum sensing* oraz stymulując ruchliwość bakterii w warunkach *in vitro* [324, 325]. W innych badaniach potwierdzono antyadhezyjną aktywność laktoferyny oraz zdolność hamowania rozwoju biofilmu formowanego przez *Klebsiella pneumoniae* i uropatogeny szczep EC [14, 326]. Właściwości hamowania rozwoju biofilmu bakteryjnego mogą wynikać z wysokiego powinowactwa peptydu do wiązania kationów dwuwartościowych, w tym żelaza. Jony żelaza biorą udział w wielu procesach biologicznych mikroorganizmów, w tym rozwoju biofilmu. Uznane są za krytyczne w procesie przejścia bakterii z formy planktonowej do formy osiadłej [327]. Wychwytyjąc i wiążąc wolne jony żelaza, laktoferyna utrudnia drobnoustrojom dostęp do pierwiastka niezbędnego do rozwoju bakterii i produkcji niektórych toksyn [15]. Jednocześnie laktoferyna wykazuje zdolność bezpośredniego przenikania przez matrycę



biofilmu i oddziaływania z błoną komórkową drobnoustroju powodując utratę integralności komórek [328].

Impregnacja materiałów biomedycznych związkami peptydowymi może stanowić podstawę do opracowania alternatywnej strategii dla profilaktyki zakażeń związanych z biofilmem. Wykazano, że surfaktyna, cykliczny lipopeptyd wytwarzany przez *B. subtilis* wykazuje zdolność rozpraszania komórek biofilmu. Powlekanie powierzchni polistyrenowej lipopetydem skutecznie hamuje rozwój biofilmu uropatogennego szczepu EC i SA [329].

De Zoysa i współ. wykazali, że inkorporacja zmodyfikowanych powierzchni szklanych, silikonowych i tytanowych syntetycznym lipopeptydem GZ3.27 wpływa na redukcję biofilmów i ograniczenie adhezji szczepu PA i EC. Ponadto związek nie wykazał właściwości hemolitycznych wobec mysich erytrocytów [330].

Lipopeptyd C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub> okazał się być skuteczny w zapobieganiu zakażeń związanym z biofilmem na modelu infekcji SA u szczura [289]. Poprzez unieruchomienie tego związku z DNazą I na polidimetylosilaksanie uzyskano skuteczną powierzchnią antybakteryjną przeciwko SA i PA [331].

Otrzymane wyniki oraz przytoczone dane literaturowe zachęcają do kontynuacji badań w tym kierunku.

#### 4. OCENA AKTYWNOŚCI CYTOTOKSYCZNEJ BADANYCH ZWIĄZKÓW WOBEC LUDZKICH KERATYNOCYTÓW

Testy cytotoxyczości na ludzkich keratynocytach przeprowadzono dla najbardziej obiecujących lipopeptydów wybranych na podstawie otrzymanych wyników badań mikrobiologicznych.

Wszystkie związki peptydowe z wyjątkiem lipopetydu 9 wykazały wysoką cytotoxyczość wobec komórek HaCaT.

Pochodne kwasu heksadekanowego (lipopetydy 5, 8) zawierające reszty glicyny lub argininy prezentowały najwyższą cytotoxyczość spośród badanych krótkich lipopeptydów. Zmierzona wartość  $IC_{50}$  mieściła się w zakresie od 0,26 do 1,17  $\mu\text{g/mL}$  co w przypadku wszystkich związków było poniżej najniższego stężenia mikrobiologicznie czynnego. Lipopeptydy  $C_{16}\text{-KKK-NH}_2$ ,  $C_{12}\text{-KKC-NH}_2$  oraz  $C_{14}\text{-KR-NH}_2$  wykazały działanie cytotoxyczne w stosunku do keratynocytów w stężeniach niewiele wyższych ( $IC_{50}$  od 1,17 do 3,2) (Tabela 9, str. 69). Citropina 1.1 i temporyna A także wykazały działanie cytotoxyczne wobec komórek HaCaT w bardzo niskich stężeniach ( $IC_{50}$  od 0,04 do 0,14  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 9, str. 69). Podobnie jak w przypadku lipopeptydów otrzymane wartości  $IC_{50}$  były znacznie niższe w porównaniu do stężeń mikrobiologicznie aktywnych.

Spośród badanych związków peptydowych jedynie lipopeptyd 9 zawierający dwa łańcuchy kwasów dekanowego okazał się nietoxyczny wobec ludzkich keratynocytów w stężeniach aktywnych mikrobiologicznie w odniesieniu do płynnych kultur bakteryjnych. Zmierzona wartość  $IC_{50}$  dla  $(C_{10})_2\text{-KKKK-NH}_2$  wyniosła 49,4 mg/L i była 24-krotnie wyższa w porównaniu z stężeniem aktywnym związku wobec płynnych hodowli szczepów SE i 6-krotnie wyższa wobec kultur SA. Wobec szczepów EF, EC i PA oznaczone wartości MIC były także niższe od  $IC_{50}$ .

Porównanie wyników wartości MBEC z oznaczoną wartością  $LC_{50}$  nie dały tak korzystnych rezultatów. Lipopeptyd wykazał zdolność eradykacji biofilmu wytworzonego przez większość badanych szczepów w stężeniu wyższym w porównaniu z  $IC_{50}$ .

Wyjątek stanowią oznaczenia wartości MBEC dla szczepu SE i EF dla powierzchni polistyrenowej. Wykazano aktywność lipopetydu 9 wobec biofilmu SE i EF w stężeniach niższych niż  $IC_{50}$ . W odniesieniu do wyników MBEC na powierzchni SK

lipopeptyd 9 wykazał działanie toksyczne wobec keratynocytów w stężeniu niższym w porównaniu do wartości MBEC na PS.

Analiza wyników badań wpływu lipopeptydu na formowanie się biofilmu na powierzchni PS i SK (MBFIC) z otrzymaną wartością  $IC_{50}$  wskazuje na potencjał wykorzystania związku z profilaktyce rozwoju biofilmów szczepów SA i SE. Otrzymana wartość  $IC_{50}$  jest wyższa w porównaniu z MBFIC zarówno na PS jak i SK. W stosunku do pozostałych szczepów wartość  $IC_{50}$  mieściła się w zakresie stężeń aktywnych w oznaczeniach MBFIC zarówno na PS jak i SK.

W poprzednich badaniach potwierdzona została silna aktywność antybiofilmowa lipopeptydów zawierających kwas heksadekanowy [231, 244]. Zastosowanie tych związków jest jednak ograniczone wyłącznie do podania miejscowego, na skórę z uwagi na działanie cytotoksyczne względem ludzkich keratynocytów *in vitro* [239, 288]. Pomimo licznych obiecujących wyników badań mikrobiologicznych na zwierzęcych modelach doświadczalnych zastosowanie natywnych AMPs, ich analogów oraz związków syntetycznych w terapii zakażeń jest nadal ograniczone [132, 134, 289, 310].

Dla większości przebadanych związków peptydowych, wysoka aktywność przeciwbiofilmowa korespondowała z wysoką cytotoksycznością, limitując zastosowanie w podaniu innym niż miejscowe, na skórę. Wyjątek stanowi związek z dwiema resztami kwasu dekanowego, który nie wykazał toksyczności w stosunku do komórek ludzkich *in vitro* w stężeniach aktywnych mikrobiologicznie [239, 332]. Cytotoksyczność lipopeptydów stanowi niezwykle istotny czynnik limitujący pełne zastosowanie terapeutyczne i dotyczy także związków stosowanych w leczeniu. Toksyczność jest przyczyną ograniczenia stosowania tej grupy związków do podania miejscowego.

Polimyksyna B jest stosowana w skojarzeniu z innymi antybiotykami takimi jak neomycyna, bacytracyna, oksytetracyklina i framycetyna jako komercyjne preparaty przeznaczone do stosowania miejscowego w leczeniu zakażeń powierzchniowych tkanek gałki ocznej. Wykazuje jednak stosunkową wysoką nefrotoksyczność i neurotoksyczność. Traktowana jest często jako lek ostatniej szansy przy zakażeniach patogenami wieloopornymi. Doraźnie może być podawana pozajelitowo pacjentom z bakteriami i infekcjami dróg moczowych, ale ze względu na niebezpieczeństwo wystąpienia ostrej niewydolności oddechowej ogólne stosowanie tego antybiotyku ogranicza się do ściśle określonych zakażeń [333]. Do leczenia został wprowadzony cykliczny lipopeptyd– daptomycyna. Antybiotyk jest stosowany w leczeniu skomplikowanych zakażeń skóry i tkanek miękkich oraz ogólnoustrojowych zakażeń

wywoływanych przez *Staphylococcus spp.* Daptomycyna podawana jest parenteralnie (pozajelitowo) w leczeniu prawostronnego infekcyjnego zapalenia wsierdza i bakteriemii, ale terapia wiąże się z miopatią zależną od dawki [334].

Ze względu na miejsce podania dobór substancji o odpowiednich właściwościach stosowanych w okulistyce jest niezwykle istotny. Preparaty farmaceutyczne do oka muszą spełniać określone wymagania wynikające z miejsca podania. Ze względu na wrażliwość oka, leki do stosowania w okulistyce powinny być jałowe, izotoniczne z płynem łzowym, o określonym pH (3,5 – 8,5), bez nierozpuszczalnych zanieczyszczeń. Preparaty do oczu muszą być wytwarzane w warunkach aseptycznych przy użyciu odpowiednich materiałów i metod, które pozwalają uzyskać jałowość i uniemożliwiają zanieczyszczenie preparatu oraz wzrost drobnoustrojów. Substancje pomocnicze dodawane do kropli nie mogą wywierać działania farmakologicznego lub drażniącego, a także nie mogą wpływać na biodostępność substancji aktywnej oraz na trwałość postaci leku [335-337].

Biorąc pod uwagę wrażliwość oka i związane z nią określone wymogi dla leków stosowanych w okulistyce w badaniach projektowych nie należy zakładać stosowania wysokich dawek terapeutycznych ani substancji o potencjalnym działaniu drażniącym. Poszukiwania substancji leczniczych o optymalnych właściwościach dla tego podania jest przedmiotem badań wielu ośrodków naukowych. Godną uwagi matrycą do projektowania leków o pożądanym właściwościach jest peptyd LL-37 produkowany przez ludzkie keratynocyty. Badania nad tym związkiem wykazały, że LL-37 jest bezpieczny w stosunku do komórek nabłonka ludzkiej rogówki [156]. W innym badaniu potwierdzono właściwości ochronne LL-37 wobec ludzkich komórek nabłonkowych. Zaobserwowano zwiększone wydzielanie peptydu w miejscu zapalenia i aktywny udział w procesie gojenia ran poprzez zdolność peptydu do stymulacji proliferacji i migracji keratynocytów [338].

Dotychczas zdefiniowano wiele strategii pozwalających na projektowanie i otrzymywanie związków o poprawionych właściwościach biologicznych. W przypadku krótkich lipopeptydów podejmowane próby modyfikacji wpływają zarówno na spektrum działania, aktywność jak i występowanie potencjalnych działań niepożądanych. Jak wcześniej argumentowano koniugacja peptydu z kwasem tłuszczowym nasila interakcje błonowe oraz może zwiększać jego stabilność w surowicy, tkankach i narządach. Wykazano, że lipidowane peptydy wiążą się z albuminą surowicy. Ponadto długość łańcucha odgrywa kluczową rolę w stabilności peptydu. W badaniach przeprowadzonych

przez Malinę i Shai krótkie lipopeptydy zawierające (C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>) okazały się mniej podatne na hemolizę w porównaniu do związków o dłuższych łańcuchach kwasów tłuszczowych [223]. Obiecujące wyniki otrzymano badaniu syntetycznego lipopeptydu zawierającego trzy reszty ornityny sprzężone z kwasem tetradekanowym. Oznaczony przez badaczy związek LP-16 *in vitro* okazał się nietoksyczny wobec ludzkich erytrocytów, stabilny i oporny na działanie trypsyny [230]. Wyniki licznych badań wykazały, że lipidowe koniugaty peptydowe wykazują zdolność eradykacji biofilmu bakteryjnego będącego czynnikiem etiologicznym wielu infekcji m.in. okulistycznych [244, 339]. Ostatnie wyniki badań wskazują, że selektywność wobec patogenów w stosunku do ludzkich komórek można zwiększyć poprzez sprzężenie modyfikacji końca N-peptydu z odpowiednimi tłuszczami n-alkilowymi i aromatycznymi [229, 340]. Inną strategią modyfikacji związków w celu poprawy ich właściwości jest cyklizacja łańcuch peptydowego. Efektem tych zmian w obrębie cząstki jest poprawa stabilności związku, co bezpośrednio przekłada się na większą odporność na proteolizę. Cykliczny, otrzymany w drodze syntezy lipopetyd CLP-4 okazał się skuteczny w eliminacji zarówno wobec komórek planktonowych i zorganizowanych w strukturę biofilmu *Streptococcus mutans*. Ze względu na wysoką stabilność i niską toksyczność istnieje możliwość jego wykorzystania w profilaktyce i leczeniu m.in. próchnicy zębów [341]. Soczewki kontaktowe powlekane hybrydowym peptydem - meliminą i peptydem Mel-4 są w trakcie II/III fazy badań klinicznych. Potwierdzona została ich skuteczność względem szczepów chorobotwórczych oraz brak działania toksycznego *in vitro* wobec komórek ssaków [186]. W badaniach prowadzonych przez Cirioni i wsp. zaprojektowany lipopeptyd C<sub>12</sub>-CKK-NH<sub>2</sub> wykazał nieznaczną toksyczność (3,2%) w stosunku do komórek A-549 ludzkiego raka płuc. W badaniach *in vivo* na mysim modelu posocznicy wywołanej EF nie zaobserwowano objawów nadwrażliwości, a u zdrowych myszy leczonych C<sub>12</sub>-CKK-NH<sub>2</sub> nie odnotowano zmian parametrów fizjologicznych [258].

Ze względu na naturalne występowanie AMPs w organizmach eukariotycznych oczekuje się, że projektowane w oparciu o ich cechy lipopeptydy nie powinny wywierać toksycznego działania względem organizmu ludzkiego. Hipoteza o selektywnym działaniu AMPs opiera się na różnicach w budowie błon komórkowych mikroorganizmów i komórek eukariotycznych (obecność cholesterolu oraz rozmieszczenie fosfolipidów w błonie komórkowej) [112, 138]. Wyniki badań wskazują, że lipopeptydy zaprojektowane w oparciu o AMPs jak i peptydy pochodzące z organizmów płazów nie spełniły jednak oczekiwań dotyczących selektywnego

działania wobec komórek procariota. W niniejszej pracy jedynie lipopetyd  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> okazał się przykładem pomyślnie zaprojektowanego i zsyntetyzowanego związku w oparciu o właściwości AMPs.

W odróżnieniu od związków peptydowych konwencjonalne substancje przeciwdrobnoustrojowe wykazały bardzo niską toksyczność względem ludzkich keratynocytów. Cyprofloksacyna i chloramfenikol są powszechnie stosowane w klasycznej terapii infekcji okulistycznych. Wartość IC<sub>50</sub> dla cyprofloksacyny i chloramfenikolu wynosiły odpowiednio 211,53 µg/mL oraz 301,40 µg/mL (Tabela 9, str. 69). Wyniki wcześniejszych badań *in vitro* potwierdziły brak toksyczności konwencjonalnych związków przeciwdrobnoustrojowych wobec ludzkich linii komórkowych w stężeniach jakie osiągają one we krwi człowieka po aplikacji dawek terapeutycznych [342]. Wykorzystywane w okulistyce stężenia wynoszą 3000 µg/mL i 20000 µg/mL odpowiednio dla cyprofloksacyny (0,3%) i chloramfenikolu (0,5-2%) więc oznaczone w badaniu wartości IC<sub>50</sub> są niższe od stężeń wykorzystywanych w leczeniu zakażeń okulistycznych. Poza tym pomimo silnej aktywności w stosunku do form wolnopływających kultur bakteryjnych związki konwencjonalne okazały się nieskuteczne wobec biofilmu formowanego przez EF. Otrzymane wartości IC<sub>50</sub> były niższe aniżeli stężenia związków potrzebne do eliminacji i zahamowania rozwoju biofilmu EF. Otrzymane wyniki wskazują, że stosowanie cyprofloksacyny i chloramfenikolu w terapii infekcji związanych z biofilmem EF jest bezzasadne. Można przypuszczać, że zwiększanie dawek leków przeciwdrobnoustrojowych nie zagwarantuje skuteczności leczenia infekcji związanych z biofilmem EF i może wywołać działania niepożądane.

Zgodnie z drukami informacyjnymi stosowanie cyprofloksacyny w postaci kropli do oka może spowodować zaczerwienienia, odkładanie białych złogów na rogówce i pogorszenie komfortu stosowania. W niektórych przypadkach może prowadzić do uszkodzenia lub nacieku rogówki oraz zmniejszenia ostrości widzenia. Objawom może towarzyszyć ból, obrzęk, nasilone łzawienie. W sporadycznych przypadkach stosowanie cyprofloksacyny może wywołać efekt toksyczny wobec tkanki. Według informacji podanych na drukach informacyjnych handlowego preparatu 0,3% cyprofloksacyny w postaci kropli do oczu, przed zastosowaniem leku należy usunąć soczewki kontaktowe (zarówno twarde jak i miękkie) [343]. Stosowanie chloramfenikolu w okulistyce może wywołać podrażnienie, skórne reakcje alergiczne, a także obrzęk angioneurotyczny oraz zapalenie skóry, które są wskazaniem do odstawienia leku. W miejscowym podaniu

chloramfenikolu opisywano także uszkodzenie szpiku z towarzyszącą anemią plastyzną) [343].

Pomimo możliwości wystąpienia działań niepożądanych zarówno ciprofloksacyna, jak i chloramfenikol w postaci preparatów do oczu charakteryzują się wysokim stopniem bezpieczeństwa stosowania. Uzyskane wartości  $IC_{50}$  – znacznie niższe w porównaniu ze stężeniami wykorzystywanymi w okulistyce wskazują, że badania *in vitro* prowadzone na pojedynczej linii komórkowej mają ograniczoną przydatność w określaniu właściwości biologicznych związków. Rozbieżności rezultatów w badaniach eksperymentalnych przeprowadzonych w warunkach *in vitro* i *in vivo* zaobserwowano także w przypadku związków peptydowych. W eksperymentalnych badaniach *in vivo* z wykorzystaniem citropiny 1.1 i temporyny A wykazano skuteczność tych związków w leczeniu oraz w profilaktyce infekcji na modelach zwierzęcych [132, 134, 310]. Odnosząc się do rezultatów powyższych prac badawczych można wnioskować, że warunki fizjologiczne organizmów żywych redukują właściwości cytotoksyczne peptydów *in vivo*.

Badania prowadzone na modelu jednej linii komórkowej stanowią wstępne oszacowanie aktywności związku ponieważ nie oddają w pełni warunków panujących w danym narządzie. Dlatego należałoby kontynuować badania tym kierunku z wykorzystaniem modelu oka. Jednakże porównując wartości uzyskane dla większości związków peptydowych można jednoznacznie stwierdzić, iż wykazują one znacznie silniejsze właściwości toksyczne w porównaniu z substancjami wykorzystywanymi w terapii infekcji.

Przeprowadzone badanie pozwoliło zidentyfikować jeden lipopeptyd 9-( $C_{10}$ )<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>, jako obiecujący związek charakteryzujący się wysoką aktywnością mikrobiologiczną wobec biofilmu i niską toksycznością w stosunku do keratynocytów linii HaCaT. Na tej podstawie związek, został wytypowany do dalszych etapów badań mikrobiologicznych.

## 5. OZNACZENIE AKTYWNOŚCI $(C_{10})_2$ -K K K K-NH<sub>2</sub> I ZWIĄZKÓW KONWENCJONALNYCH WOBEC BIOFILMU WYTWORZONEGO NA POWIERZCHNI POLISTYRENOWEJ

Dotychczas prowadzone badania pozwoliły zidentyfikować wiele krótkich lipopeptydów o wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej [231, 344, 345]. Potwierdzono, że lipopeptydy wykazują skuteczną aktywność wobec struktury biofilmu i wobec wieloopornych szczepów bakteryjnych [346]. Praktyczne zastosowanie tych związków w okulistyce pozostaje jednak ograniczone ze względu na potencjalną toksyczność lub alergenicność. Kwestie te są niezwykle istotne w przypadku delikatnej i wrażliwej struktury jaką jest ludzkie oko [288, 347]. W związku z tym liczne badania skupiają się na optymalizacji biologicznych aktywności lipopeptydów. W poprzednich badaniach zidentyfikowany został lipopeptyd 9 -  $(C_{10})_2$ -K K K K-NH<sub>2</sub>, wykazujący silne działanie przeciwbakteryjne i niską toksyczność wobec ludzkich komórek *in vitro* [239, 348]. W kolejnym etapie kontynuowano badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej tego związku w kierunku jego potencjalnego zastosowania w okulistyce. Oprócz wytypowanego lipopeptydu 9, oznaczenia wykonane zostały także dla związków referencyjnych: cyprofloksacyny i chloramfenikolu.

Użyte w badaniu związki wykazały zróżnicowane działanie antybiofilmowe wobec różnych gatunków bakterii. W wielu przypadkach zaobserwowano, że usunięcie związku aktywnego i dalsza inkubacja w czystej pożywce spowodowała częściową lub pełną odnowę aktywności metabolicznej bakterii.

Struktury utworzone przez szczep SE na powierzchni 96-dołkowych płytek polistyrenowych okazały się podatne na działanie wszystkich związków. Ekspozycja biofilmu na cyprofloksacynę znacząco zredukowała aktywność metaboliczną komórek bakteryjnych. Antybiotyk zastosowany w zakresie stężeń 1 – 8  $\mu\text{g/mL}$  spowodował ok 70-80% redukcję aktywności metabolicznej bakterii w wyhodowanych biofilmach. Zastosowanie stężenia 16  $\mu\text{g/mL}$  i wyższego skutkowało obniżeniem aktywności metabolicznej do 10% lub mniej w porównaniu do kontroli pozytywnej. Jednak po wycofaniu cyprofloksacyny i dodatkowej inkubacji w świeżej pożywce zaobserwowano ponowny wzrost aktywności metabolicznej bakterii (Ryc. 10, str. 74). Trwały efekt antybiofilmowy uzyskano po zastosowaniu najwyższego stosowanego stężenia (256  $\mu\text{g/mL}$ ) cyprofloksacyny. Chloramfenikol wykazał stosunkowo niską



aktywność wobec biofilmu SE. Aplikacja związku w stężeniach 256, 128 i 64  $\mu\text{g/mL}$  spowodowała zmniejszenie aktywności metabolicznej bakterii odpowiednio do ok 12, 20 i 25% (Ryc. 10, str. 74). Działanie przeciwdrobnoustrojowe zostało znacznie zredukowane po wycofaniu związku, co skutkowało znacznym wzrostem aktywności metabolicznej bakterii.

Lipopeptyd 9 wykazał najsilniejszą aktywność wobec biofilmu SE. Zastosowanie związku w stężeniu 16  $\mu\text{g/mL}$  obniżyło aktywność metaboliczną bakterii do ok. 5%. Należy zwrócić uwagę, że była to największa redukcja aktywności metabolicznej dla tego szczepu. Co istotne, efekt antybiofilmowy utrzymał się także po wycofaniu związku z medium i dodatkowej inkubacji w czystej pożywce (Ryc. 10, str. 74).

Biofilm SA hodowany na PS okazał się mniej wrażliwy na działanie stosowanych związków w porównaniu do szczepu SE (Ryc. 11, str. 75). Różnica była szczególnie widoczna w przypadku zastosowania konwencjonalnych środków przeciwdrobnoustrojowych. Ekspozycja biofilmu na cyprofloksacynę w stężeniu 256  $\mu\text{g/mL}$  pozwoliła zredukować aktywność metaboliczną SA poniżej 20%. Zastosowanie związku w stężeniu 64-128  $\mu\text{g/mL}$  spowodowało spadek aktywności metabolicznej bakterii do ok 30%. Trwały efekt antybiofilmowy uzyskano przy zastosowaniu dwóch najwyższych stężeń. Najbardziej skutecznym związkiem wobec gronkowców był lipopeptyd  $(\text{C}_{10})_2\text{-K}4\text{KKK-NH}_2$ . Związek zredukował aktywność metaboliczną komórek SA o ponad 90% przy zastosowaniu w stężeniach 32  $\mu\text{g/mL}$  i wyższych. Traktowanie lipopeptydem skutkowało trwałym efektem antybiofilmowym – nie zaobserwowano wzrostu aktywności metabolicznej bakterii po zastąpieniu związku czystą pożywką MHB II. Podobnie jak w przypadku szczepu SE, chloramfenikol okazał się najmniej skutecznym związkiem. Aktywność metaboliczna SA została zmniejszona o połowę dopiero po zastosowaniu związku w stężeniu 128-256  $\mu\text{g/mL}$  i istotnie wzrosła po jego wycofaniu.

Biofilmy utworzone przez szczep EF wykazały najwyższą oporność na działanie konwencjonalnych środków przeciwdrobnoustrojowych (Ryc. 12, str. 76). Ich zastosowanie w najwyższych stężeniach spowodowało zmniejszenie aktywności metabolicznej do ok 35% w odniesieniu do populacji początkowych. Po usunięciu cyprofloksacyny z medium zaobserwowano trwały efekt antybiofilmowy. Natomiast efekt antybiofilmowy nie utrzymał się po wycofaniu chloramfenikolu. Usunięcie związku z medium skutkowało całkowitym odnowieniem aktywności metabolicznej bakterii. Lipopeptyd 9 wykazał zdolność do trwałej eliminacji biofilmu w zastosowanym zakresie

stężen 32-256  $\mu\text{g/mL}$ . Cyprofloksacyna i chloramfenikol nie zdołały trwale usunąć biofilmu utworzonego przez EF. Po zastosowaniu antybiotyków w stężeniach 64–256  $\mu\text{g/ml}$  zaobserwowano pewną aktywność, ale po ich wycofaniu populacja odnowiła się prawie całkowicie [349]. Trudności w eliminacji biofilmów EF za pomocą cyprofloksacyny były wcześniej obserwowane w innych ośrodkach badawczych [208]. Ze względu na słabą aktywność konwencjonalnych antybiotyków przeciwko biofilmowi EF wyniki uzyskane dla lipopeptydu 9 są bardzo obiecujące.

Wyniki aktywności lipopeptydu 9 wobec SE i SA są także znacznie bardziej zadowalające w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla konwencjonalnych środków przeciwdrobnoustrojowych. Związek wykazał zdolność do trwałego eliminowania żywych komórek bakteryjnych SA i SE po zastosowaniu w stężeniu odpowiednio 32 i 16  $\mu\text{g/mL}$ .

Wyższe stężenia lipopeptydu były niezbędne do eliminacji struktur utworzonych na powierzchni PS przez EC. Efekt antybiofilmowy uzyskano po ekspozycji bakterii na roztwór związku w stężeniach 64  $\mu\text{g/mL}$  i wyższych. Zaobserwowano wysoką redukcję metabolizmu, która utrzymywała się także po usunięciu lipopeptydu z medium. Podobny efekt uzyskano po ekspozycji biofilmów EC na cyprofloksacynę aplikowaną w stężeniach 32-256  $\mu\text{g/mL}$ . Chloramfenikol także wykazał wysoką skuteczność wobec biofilmu EC, jednak po jego usunięciu z medium zaobserwowano przywrócenie pełnej aktywności metabolicznej populacji bakteryjnej (Ryc. 13, str. 77).

Struktury utworzone na powierzchni PS przez szczep PA wykazały niską wrażliwość na działanie lipopeptydu  $(\text{C}_{10})_2\text{-K}4\text{K}4\text{-NH}_2$  (Ryc. 14, str. 78). Związek ten zmniejszył aktywność metaboliczną bakterii do 10% tylko w przypadku zastosowania go w stężeniu 256  $\mu\text{g/mL}$ . Jednak usunięcie lipopeptydu z medium skutkowało odnowieniem populacji. Zastosowanie niższych stężeń spowodowało zmniejszenie metabolizmu bakteryjnego o 50%, który jednak nie zwiększył się po usunięciu związku. Cyprofloksacyna wykazała najwyższą skuteczność wobec szczepu PA, obniżając aktywność metaboliczną bakterii o ponad 90% nawet przy najniższych stosowanych stężeniach. Dalsza inkubacja w podłożu po usunięciu antybiotyku powodowała częściowe odnowienie aktywności metabolicznej w obrębie biofilmu, ale jedynie w dołkach traktowanych antybiotykiem w stężeniach niższych niż 32  $\mu\text{g/mL}$ . Ekspozycja biofilmu PA na chloramfenikol w stężeniach 128-256  $\mu\text{g/mL}$  skutkowała redukcją aktywności metabolicznej bakterii o około 90%. Ponowna inkubacja szczepu po usunięciu chloramfenikolu z medium powodowała istotny wzrost metabolizmu bakterii.

Co istotne, wstępne traktowanie biofilmu PA chloramfenikolem w stężeniach niższych niż 32 µg/mL skutkowało promocją rozwoju biofilmu.

Wzmógłony rozwój biofilmu jest specyficzną odpowiedzią mikroorganizmów na traktowanie powszechnie stosowanymi antybiotykami. Liczne badania wykazały, że częsta ekspozycja drobnoustrojów na niskie, dawki antybiotyków stymuluje formowanie się biofilmu i może prowadzić do nabycia tolerancji na stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe [350-352].

W niniejszej pracy nie określono, czy ponowne formowanie się biofilmów w badaniu wynikało z obecności komórek przetrwałych czy standardowych komórek bakteryjnych otoczonych warstwą egzopolisacharydu (EPS) lub z innych mechanizmów oporności. Wyniki badań interpretowano jako trwałą lub nietrwałą aktywność przeciwdrobnoustrojową.

Stosowane w badaniu konwencjonalne środki przeciwdrobnoustrojowe prezentowały aktywność w pierwszym etapie badania, jednak po usunięciu związków z medium bakterie w dużym stopniu odnowiły swoją populację. Szczep EF hodowany na płytkach polistyrenowych okazał się najmniej wrażliwy na działanie związków konwencjonalnych użytych w badaniu. Liczba żywych komórek zmniejszyła się nieco przy stosowaniu wyższych dawek (64-256 mg/L), ale po wycofaniu związków populacja bakterii odnowiła się prawie całkowicie (Ryc. 12, str. 76). W oparciu o te wyniki aplikacja tych związków w terapii infekcji związanych z biofilmem jest bezzasadna. Nawet w przypadku pozytywnego efektu leczenia, nie można wykluczyć nawrotu zakażenia po zakończeniu antybiotykoterapii.

Często obserwowane zjawisko odnawiania się populacji bakteryjnej po wycofaniu związków sugeruje, że pewna populacja komórek drobnoustrojów przetrwała ekspozycję na testowane środków przeciwdrobnoustrojowe i ponownie odnowiła populację biofilmu po ich usunięciu z medium. Komórki przetrwałe (*perister cells*) uważa się za komórki odpowiedzialne za oporność biofilmu na środki przeciwdrobnoustrojowe. Stanowią one subpopulację komórek bakteryjnych o niskiej aktywności metabolicznej zlokalizowanych w głębszych warstwach biofilmu. Udowodniono, że są one odpowiedzialne za nawrót zakażeń po wycofaniu antybiotykoterapii [353]. Zdolność do nawracania infekcji po wycofaniu czynnika przeciwdrobnoustrojowego jest charakterystyczną cechą infekcji związanych z biofilmem i stanowi poważny problem terapeutyczny. W badaniu prowadzonym przez Soares i wsp. oceniali ilościowo żywotność i dynamikę populacji PA w dojrzałym biofilmie *in vitro*. Wykazano, że

początkowa aktywność cyprofloksacyny spowodowała eradykację dużej części populacji, ale już po 1 godzinie od ekspozycji na antybiotyk u części populacji zaobserwowano indukowanie odpowiedzi na wprowadzony lek. Nastąpiło uruchomienie mechanizmów regulacyjnych umożliwiających przetrwanie biofilmu i jego łatwą odbudowę w nawet najbardziej niekorzystnych warunkach. Kluczowy udział w tym procesie pełnią komórki przetrwałe, ponieważ nawet 24 godzinach po ekspozycji na antybiotyk i obserwowanego przerwania macierzy, subpopulacja tych komórek nie została całkowicie wyeliminowana [354].

Wcześniejsze doniesienia wskazywały o trudnościach w eliminacji biofilmów SA i EF konwencjonalną antybiotykoterapią z użyciem z cyprofloksacyny [53]. Cyprofloksacyna wykazała znacznie silniejszą aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych, czego należało się spodziewać, gdyż zakażenia wywołane przez EC są głównymi wskazaniami terapeutycznymi do stosowania tego antybiotyku. Struktury biofilmu zostały trwale usunięte z powierzchni polistyrenu po zastosowaniu związku w stężeniu 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , natomiast w celu eliminacji PA wystarczające było stężenie 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Lipopeptyd 9 wykazał aktywność przy stężeniu 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  w przypadku EC, ale całkowite wyeliminowanie PA nie zostało osiągnięte w badanym zakresie stężeń: nawet po zastosowaniu peptydu przy 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  populacja bakterii znacząco odnowiła się (do ok. 40%) Chloramfenikol prezentował słabszą aktywność wobec biofilmom EC i PA, a szczepy w znacznym stopniu odnowiły swoje populacje po wycofaniu związku, nawet po ekspozycji w najwyższym stężeniu.

## 6. OZNACZENIE AKTYWNOŚCI (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> I DOSTĘPNYCH NA RYNKU PŁYNÓW DO SOCZEWEK ORAZ ICH POŁĄCZEŃ W STOSUNKU DO BIOFILMU BAKTERYJNEGO

### 6.1. Biofilmy formowane na powierzchniach polistyrenowych

Lipopeptyd 9 stosowany samodzielnie był silnie aktywny wobec biofilmów utworzonych przez SA i SE w stężeniach odpowiednio 32 i 16 µg/mL (Ryc. 10,11, str. 74,75). Zastosowanie stężenia 32 µg/mL spowodowało zmniejszenie aktywności metabolicznej biofilmu EF o około 95% (Ryc. 12, str. 76). Szczepy bakterii Gram-ujemnych hodowanych na powierzchni polistyrenowej okazały się znacznie mniej wrażliwe na działanie lipopeptydu. Aplikacja związku umożliwiła tylko częściową redukcję ich metabolizmu. W przypadku szczepu PA, lipopeptyd związek wykazał umiarkowane działanie antybakteryjne tylko przy stężeniu – 128 µg/mL.

Do badań wybrane zostały płyny do soczewek, które wykazały najwyższą skuteczność we wcześniejszych oznaczeniach [339].

Wykazano, że suplementacja płynów do soczewek lipopeptydem 9 korzystnie wpłynęła na ich aktywność przeciwbakteryjną (Ryc. 16, str. 82). Było to szczególnie widoczne w przypadku płynu B, który wykazał stosunkowo słabszą skuteczność w porównaniu z płynem A. Płyn A wykazał zdolność redukcji aktywności metabolicznej bakterii o ponad 90% dla większości badanych szczepów. Natomiast suplementacja płynu A lipopeptydem skutkowała dalszym nasileniem spadku metabolicznej drobnoustrojów. Nieco niższą aktywność płynu A zaobserwowano w przypadku szczepu PA. Ekspozycja na płyn obniżyła metabolizm bakterii PA do ok 15% względem kontroli pozytywnej. Natomiast suplementacja płynu lipopeptydem w bardzo niskim stężeniu (1 µg/mL) spowodowała obniżenie aktywności metabolicznej bakterii do 5% kontroli pozytywnej.

Płyn B stosowany samodzielnie spowodował tylko częściowe obniżenie bakteryjnej aktywności metabolicznej większości szczepów (Ryc. 16, str. 82). Suplementacja płynu B związkiem w stężeniu 4 - 8 µg/mL skutkowała redukcją aktywności metabolicznej szczepów SE, SA, EC i EF o co najmniej 90%. Płyn B był nieaktywny wobec szczepu PA, ale w połączeniu z lipopeptydem 9 zastosowanym w stężeniu 128 i 64 µg/mL zaobserwowano redukcję metabolizmu szczepu odpowiednio do ok 4 i 20 %.

W związku z korzystnym wpływem suplementacji lipopetydem na aktywność płynów wobec biofilmu hodowanego na PS, badanie kontynuowano z użyciem soczewek kontaktowych.

## **6.2. Biofilmy formowane na powierzchni soczewek kontaktowych**

Wykazano, że ogólnodostępne płyny do soczewek skutecznie eliminują biofilm bakteryjny tworzony na powierzchni soczewek kontaktowych. Zaobserwowano, że płyny do soczewek obniżyły aktywność metaboliczną bakterii hodowanych na SK o co najmniej 90% dla większości badanych szczepów. Oba płyny okazały się aktywne wobec biofilmów formowanych przez szczepy SA, SE, EC i EF, redukując ich metabolizm do ok 10% w stosunku do kontroli pozytywnej. W przypadku szczepu PA, tylko zastosowanie płynu A pozwoliło uzyskać taki efekt.

Zastosowanie roztworu lipopeptydu 9 rozpuszczonego w PBS umożliwiło eradykację biofilmu hodowanego na powierzchni soczewek kontaktowych wszystkich testowanych szczepów. Najwyższą skuteczność zaobserwowano wobec biofilmu szczepu SE i EF. Zastosowanie związku w stężeniu 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  skutkowało spadkiem aktywność metabolicznej bakterii o co najmniej 90%. Dwukrotnie wyższe stężenie związku (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) było konieczne aby uzyskać taki efekt wobec szczepu SA. Najmniej podatnymi szczepami okazały się EC i PA. Obniżenie aktywności metabolicznej o ok. 90% było obserwowane po ekspozycji biofilmów na związek zaaplikowany w stężeniu 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Ryc. 15, str. 80).

Należy zaznaczyć, że powyższe wyniki uzyskano, gdy ekspozycja biofilmu na płyny i lipopeptyd 9 trwała do momentu odczytania wyników. Po usunięciu płynów i dalszej inkubacji soczewek w czystej pożywce MHB II, aktywność metaboliczna większości badanych szczepów wróciła do poziomu aktywności metabolicznej kontroli pozytywnej, co sugeruje, że populacja biofilmu została prawie całkowicie odnowiona. Efekt antybakteryjny płynów do soczewek po ich usunięciu utrzymał się tylko wobec szczepu SE, podczas gdy dla płynu A i szczepu EF, zaobserwowano promocję rozwoju biofilmu. W porównaniu do testowanych płynów, lipopeptyd 9 okazał się bardziej skuteczny w stosunku do biofilmu bakterii Gram –dodatnich. Aplikacja roztworu związku w stężeniu 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  skutkowała trwałym usunięciem biofilmu SA i SE z powierzchni SK. Mniej obiecujące wyniki uzyskano względem biofilmów formowanych przez bakterie Gram-ujemne. Po wycofaniu roztworu związku we

wszystkich testowanych stężeniach populacja szczepu PA odnowiła się całkowicie, a populacja szczepu EC do ok 50%. Podobnie jak w przypadku płynu do soczewek A, traktowanie szczepu EF roztworem lipopeptydu powodowało wzrost jego aktywności metabolicznej.

Suplementacja płynów do soczewek lipopeptydem 9 znacząco poprawiła ich aktywność wobec biofilmu bakteryjnego formowanego na powierzchni soczewek kontaktowych. Ekspozycja biofilmu na kombinację lipopetyd - płyn do soczewek umożliwiła trwałą redukcję metabolizmu bakterii. Efekt synergii był szczególnie widoczny w przypadku biofilmów PA, EC i EF.

Niezależne zastosowanie płynów do soczewek lub lipopeptydu przeciwko biofilmom EC i PA skutkowało częściową lub całkowitą odnową aktywności metabolicznej po usunięciu czynnika przeciwdrobnoustrojowego. Poprzez dodanie do płynów do soczewek związku w stężeniu 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  uzyskano redukcję metabolizmu bakterii do ok. 2 %. Trwały efekt wobec PA uzyskano po zastosowaniu płynu B w kombinacji z lipopeptydem w stężeniu 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Suplementacja płynów A i B lipopeptydem 9 w stężeniach 16 i 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  spowodowała niemal całkowitą eliminację biofilmu EF z powierzchni soczewek – spadek aktywności metabolicznej do ok. 1-2 %. Biofilm SA został trwale usunięty z powierzchni soczewek kontaktowych po dodaniu do obu płynów lipopeptydu odpowiednio w stężeniach 8 i 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Pomimo, że biofilmy SE były podatne na działanie obu czynników stosowanych samodzielnie, odnotowano także wzmocnienie działania płynów do soczewek po suplementacji lipopeptydem 9 (Ryc. 17, str. 84). Zgodnie z danymi literaturowymi, dotychczas były prowadzone badania aktywności płynów do soczewek suplementowanych związkami peptydowymi.

W badaniach prowadzonych przez Mannis i wsp. jako czynnik przeciwdrobnoustrojowy płynu do soczewek kontaktowych zastosowano syntetyczną pochodną cekropiny, peptyd Shiva-11. Związek wykazał silną aktywność wobec szczepów PA, SE i SA [355]. W kontynuowanym badaniu prowadzonym przez Gunshefski i wsp. związek wykazał skuteczne działanie przeciwbakteryjne wobec klinicznych patogenów odpowiedzialnych za infekcje okulistyczne w tym wobec szczepów wysoce opornych na gentamycynę. Badania zostały przeprowadzone na szczepach *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* i *C. albicans* wyizolowanych od chorych z objawami ciężkiego, wrzodziejącego zapalenia rogówki, potwierdzając szerokie spektrum działania związku [206]. Podobne badania prowadził Sousa i wsp. z wykorzystaniem innego analogu cekropiny – peptydu D5C. Suplementacja płynów do

soczewek peptydem D5C zwiększyła ich skuteczność poprzez wzmocnienie działania przeciwdrobnoustrojowego wobec klinicznych izolatów PA w obecności soczewki kontaktowej [356].

Stosowany samodzielnie lipopeptyd  $(C_{10})_2$ -K<sub>4</sub>KKK-NH<sub>2</sub> wykazał wysoką aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich oraz stosunkową niższą aktywność wobec szczepów Gram-ujemnych. Kolejne oznaczenia wykazały, że działanie przeciwbakteryjne nie utrzymuje się po usunięciu płynów do soczewek, a w niektórych przypadkach również po wycofaniu roztworu związku.

Uzyskane wyniki dla powierzchni soczewek kontaktowych wykazały, że trwałe działanie przeciwdrobnoustrojowe płynów do soczewek uzyskano jedynie wobec szczepu SE. Natomiast lipopeptyd 9 okazał się być aktywny wobec SE i SA. Na uwagę zasługuje fakt, że ekspozycja biofilmu EF na lipopeptyd  $(C_{10})_2$ -K<sub>4</sub>KKK-NH<sub>2</sub> spowodowała promowanie wzrostu biofilmu na SK po zastąpieniu roztworu związku świeżym medium. Prawdopodobnie ma to związek z mechanizmem obronnym bakterii. Tworzenie biofilmu jest opisane jako jeden z mechanizmów nabytych przez bakterie w celu uniknięcia działania endogennych peptydów przeciwdrobnoustrojowych w organizmie człowieka [353, 357, 358].

Biofilm formowany przez szczep PA kazał się najtrudniejszą strukturą do wyeliminowania z powierzchni SK, co koresponduje z poprzednimi wynikami badań, w których oceniano aktywność płazich peptydów i krótkich lipopeptydów zawierających kwas heksadekanowy w celu ich potencjalnego zastosowania jako dodatków do płynów do SK [339]. Wyniki z przeprowadzonych testów przeciwdrobnoustrojowych również były obiecujące. Jednak z uwagi na wysoką toksyczność wobec ludzkich keratynocytów *in vitro*, zrezygnowano z kontynuacji badań lipopeptydów z kwasem heksadekanowym w kierunku tego zastosowania [239, 288]. W przeciwieństwie do pozostałych krótkich lipopeptydów, związek z dwoma resztami kwasu dekanowego wykazał znacznie niższą toksyczności *in vitro* wobec komórek ludzkich [239, 348]. Uzyskane wyniki badań wykazują, że lipopeptyd 9 zwiększa skuteczność komercyjnych płynów do soczewek w stężeniach znacznie niższych niż stężenia zidentyfikowane jako toksyczne, zarówno wobec ludzkich keratynocytów jak i erytrocytów.

Wyniki uzyskane w oznaczeniach aktywności mikrobiologicznej potwierdziły, że związek  $(C_{10})_2$ -K<sub>4</sub>KKK-NH<sub>2</sub> wykazuje wysoki potencjał przeciwdrobnoustrojowy i należy rozważyć dalszą analizę w celu zastosowania lipopeptydu jako alternatywy dla antybiotykoterapii zakażeń związanych z biofilmem. Lipopeptyd  $(C_{10})_2$ -K<sub>4</sub>KKK-NH<sub>2</sub>



wykazuje zdolność do eliminacji biofilmu bakteryjnego w nieco wyższych stężeniach w porównaniu do lipopeptydów z kwasem heksadekanowym. W przeciwieństwie do tych związków stężenie aktywne związku wobec większości szczepów zidentyfikowane zostało jako bezpieczne dla ludzkich komórek [239, 288].

## 7. OCENA POTENCJAŁU DRAŻNIĄCEGO OKA

Ocena potencjału podrażnienia oka jest istotnym etapem w procesie opracowywania nowych preparatów leczniczych. Test oceniający podrażnienie oka jest częścią oceny ryzyka w procedurze rejestracji preparatu leczniczego do stosowania w okulistyce. Ludzka gałka oczna jest złożonym organem, podatnym na uszkodzenia i podrażnienia. Z tego względu badania oceny bezpieczeństwa substancji chemicznych do niedawna były przeprowadzone na zwierzętach (Test Draize'a). Zintegrowane podejście badań sekwencyjnych działania drażniącego i żrącego na oczy zostało określone w Rozporządzeniu Komisji UE 2017/735. Wytyczne wskazują, aby w dobrze pojętym interesie nauki i z uwagi na dobrostan zwierząt w miarę możliwości unikać niepotrzebnego wykorzystywania zwierząt oraz minimalizować badania, które mogą powodować silne reakcje u zwierząt.

Wszystkie dostępne informacje na temat substancji chemicznej istotne z punktu widzenia jej potencjalnego działania drażniącego lub żrącego na oczy powinny zostać poddane ocenie przed podjęciem badań *in vivo*. Odpowiednia kwalifikacja danej substancji może przyczynić się do zminimalizowania potrzeby badań *in vivo*. W tym celu można wykorzystać metody obliczeniowe, które umożliwiają identyfikację potencjalnych zagrożeń na podstawie znanych lub proponowanych struktur chemicznych.

Metody obliczeniowe stały się użytecznym narzędziem do przewidywania zależności pomiędzy właściwościami projektowanych związków, a ich biologiczną aktywnością. Modele predykcyjne wyliczone za pomocą metod statystycznych znajdują zastosowanie w ocenie ryzyka i przewidywaniu toksyczności. Podejście oparte na zależnościach wynikających ze struktury związku na jego aktywność - QSAR (quantitative structure-activity relationship) bądź struktury związku na jego toksyczność - QSTR (quantitative structure-toxicity relationship) pozwala na projektowanie lub optymalizację struktur nowo syntetyzowanych związków.

Metody ilościowe zależności struktura-aktywność/toksyczność (QSAR/QSTR) od dawna są przydatne do prognozowania toksycznego działania chemikaliów na różne układy biologiczne [359, 360]. W badaniach prowadzonych przez Kleandrovą obliczony model QSAR, przewidujący właściwości toksyczne nanocząstek na bazie niklu wobec wskaźników biologicznych został porównany z wynikami badań eksperymentalnych. Dokładność wyliczonego modelu prognostycznego wynosiła ok 99% [361].

Rajput i wsp. na podstawie danych opisujących peptydy o potwierdzonej aktywności wobec biofilmów, opracował model QSAR, który wykazał 80% zgodności w identyfikacji i przewidywaniu aktywności przeciwbiofilmowej dla substancji chemicznych [199]. Haney i wsp. opracował model QSAR oparciu o eksperymentalnie ocenioną aktywność peptydu 1018 wobec biofilmu MRSA. Model wykazał 85% zgodności z przewidywanymi założeniami oraz stanowił podstawę do identyfikacji i syntezy nowego związku (peptyd 3002) o pożądanej aktywności wobec biofilmu [198].

Podejście QSAR/QSTR zostało z powodzeniem zastosowane także do przewidywania aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz właściwości hemolitycznych krótkich syntetycznych lipopetydów kationowych [222].

Zgodnie z wynikami uzyskanymi metodą obliczeniową za pomocą aplikacji Toxtree, oczekuje się, że związek ten nie będzie podrażniał ludzkiego oka. Należy to potwierdzić metodami doświadczalnymi, ale zebrane dotychczas dane sugerują, że  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> może potencjalnie znaleźć zastosowanie w terapii infekcji związanych z biofilmem oraz w profilaktyce zakażeń jako środek do inkorporacji soczewek kontaktowych jak również jako dodatek do płynów do soczewek.

## V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Powszechne stosowanie wyrobów medycznych i implantów biomedycznych istotnie zwiększa możliwości terapeutyczne i bezpośrednio wpływa na poprawę jakości życia pacjenta, ale stwarza też ryzyko rozwoju infekcji związanych z biofilmem [264, 348, 362, 363]. Niezależnie od stopnia zaawansowania materiałów stanowią one potencjalną powierzchnię do kolonizacji przez drobnoustroje [364-367]. SK są jednym z najczęściej stosowanych biomateriałów. Zdolność różnych gatunków bakterii do formowania się biofilmu na powierzchni biomateriałów ogrywa kluczową rolę w patogenezie zakażeń związanych ze stosowaniem SK. Niedostateczna higiena rąk podczas noszenia soczewek kontaktowych, stosowania płynów do soczewek i pojemników do przechowywania soczewek kontaktowych mogą stanowić kolejny czynnik sprzyjający rozwojowi infekcji. Zakażenia związane z SK występują stosunkowo rzadko, ale mogą prowadzić do poważnych komplikacji zagrażającym widzeniu. Standardowe leczenie bakteryjnych infekcji okulistycznych polega na stosowaniu antybiotykoterapii. Jednak powszechne stosowanie antybiotyków, szczególnie o szerokim spektrum działania i niewłaściwe ich stosowanie prowadzi do wzrostu oporności drobnoustrojów i indukuje rozwój szczepów wieloopornych [368].

W związku z formowaniem się biofilmów na powierzchni SK, dostępne środki profilaktyki i terapii zakażeń okulistycznych nie zawsze są wystarczające. Formowanie się biofilmu jest swoistą reakcją drobnoustrojów służącą przetrwaniu w niekorzystnych warunkach. Biofilm jest zorganizowaną populacją drobnoustrojów, związanych z powierzchnią i otoczonych macierzą pozakomórkową, która zabezpiecza je przed działaniem czynników zewnętrznych takich jak aktywność układu odpornościowego czy substancje przeciwdrobnoustrojowe. Rozwój biofilmu wiąże się z problemami terapeutycznymi ponieważ mikroorganizmy rosnące w tej populacji charakteryzują się wysoką odpornością wobec powszechnie stosowanych środków przeciwdrobnoustrojowych. Infekcje związane z biofilmem wykazują tendencję do przechodzenia w stan przewlekły, predysponują do nawrotów lub skutkują jej nasileniem. Dane epidemiologiczne wskazują, że ok 80% przewlekłych i nawracających infekcji jest rezultatem formowania się biofilmu na powierzchni stosowanych biomateriałów w tym implantów serca, cewników, protez naczyniowych, ortopedycznych lub soczewek kontaktowych [95]. Infekcje o takiej etiologii są trudne do wyeliminowania i często prowadzą do konieczności całkowitej wymiany biomateriału [264, 278, 315].

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą eliminować biofilm poprzez różne mechanizmy działania. Wykazując zdolność wiązania się do powierzchni drobnoustrojów redukują przyleganie mikroorganizmów do kolonizowanych powierzchni. Poprzez unieruchamianie na biomateriałach zmieniają ich właściwości antyadhezyjne, zapobiegając rozwojowi biofilmu. Dzięki zdolności do penetracji EPS, inaktywacji cząsteczek sygnałowych i zakłócania komunikacji QS, związki peptydowe mogą eliminować dojrzałą strukturę biofilmu, a stymulując odpowiedź układu odpornościowego mogą wzmacniać leczenie infekcji związanych z biofilmem.

Od czasu przedstawienia krótkich lipopeptydów jako potencjalnej alternatywy dla dostępnych środków przeciwdrobnoustrojowych, stały się one tematem intensywnych badań. W oparciu o ich wysoką aktywność mikrobiologiczną wobec bakterii zarówno w formie planktonowej jak i w postaci biofilmu oraz przy relatywnie niskich kosztach produkcji, prowadzone są badania pod kątem wykorzystania związków w terapii i profilaktyce infekcji związanych z biofilmem. Ze względu na stosunkowo wysoką toksyczność wykazywaną przez liczne lipopeptydy wiele uwagi poświęca się optymalizacji właściwości biologicznych.

Celem pracy doktorskiej było otrzymanie i zbadanie aktywności krótkich lipopeptydów w odniesieniu do ich potencjalnego zastosowania w eradykacji oraz zapobieganiu formowania się biofilmu bakteryjnego na powierzchni soczewek kontaktowych.

Realizacja poszczególnych etapów pracy badawczej pozwoliła na sformułowanie poniższych wniosków:

1. Wobec hodowli płynnych badane związki peptydowe prezentowały aktywność w stosunku do wszystkich badanych szczepów, jednak niższą w porównaniu do użytych związków odniesienia: cyprofloksacyny i chloramfenikolu.
2. Większość otrzymanych krótkich lipopeptydów oraz citropina 1.1 i temporyna A prezentowały wysoką aktywność wobec biofilmu bakterii Gram-dodatnich (SA, SE, EF) formowanych na powierzchni polistyrenowej. Podczas gdy konwencjonalne substancje przeciwdrobnoustrojowe były nieaktywne wobec biofilmu EF.
3. Biofilm formowany przez szczepy bakteryjne na powierzchni soczewek kontaktowych był mniej wrażliwy na działanie większości badanych związków w porównaniu do struktur hodowlanych na powierzchni polistyrenowej.

4. Suplementacja pożywki hodowlanej większością badanych związków peptydowych skutecznie hamowała rozwój biofilmu tworzonego przez bakterie Gram-dodatnie na powierzchni polistyrenowej oraz soczewek kontaktowych. Związki konwencjonalne okazały się nieskuteczne w hamowaniu rozwoju biofilmu EF na obu badanych powierzchniach.
5. Wszystkie związki peptydowe z wyjątkiem lipopeptydu  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> prezentowały aktywność toksyczną *in vitro* wobec keratynocytów HaCaT w stężeniach niższych niż stężenia aktywne mikrobiologicznie. Analiza metodą obliczeniową dla tego związku wykazała brak potencjału drażniącego.
6. Ocena trwałości działania antybiofilmowego po usunięciu związków z pożywki wykazała, że lipopeptyd  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> wykazuje znacznie silniejsze działanie wobec szczepów Gram-dodatnich w porównaniu z cyprofloksycyną i chloramfenikolem.
7. Suplementacja płynów do soczewek lipopeptydem  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> w bardzo niskich stężeniach pozwoliła znacznie zwiększyć aktywność płynów wobec biofilmu bakteryjnego hodowanego na powierzchni polistyrenowej i soczewkach kontaktowych.
8. Ze względu na wysoką aktywność mikrobiologiczną zarówno wobec utworzonego jak i zapobieganiu tworzenia się biofilmu bakteryjnego oraz działanie synergistyczne z płynami do soczewek przy stosunkowo niskiej toksyczności wobec ludzkich komórek lipopeptyd  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> powinien zostać poddany dalszym badaniom pod kątem wykorzystania w terapii oraz profilaktyce infekcji okulistycznych związanych z noszeniem soczewek kontaktowych.

Część wyników otrzymanych w ramach niniejszej pracy została opublikowana w poniższych publikacjach:

- „Influence of Amphibian Antimicrobial Peptides and Short Lipopeptides on Bacterial Biofilms Formed on Contact Lenses”, autorstwa: Maciejewska M., Bauer M., Neubauer D., Kamysz W., Dawgul M. Praca została opublikowana w czasopiśmie *Materials* (2016; 9(11):873, str.1-12) o współczynniku oddziaływania IF= 2,654, punktacja MNiSW= 35.
- „Antibacterial Activities of Lipopeptide (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> Applied Alone and in Combination with Lens Liquids to Fight Biofilms Formed on Polystyrene Surfaces and Contact Lenses”, autorstwa: Padászyńska M., Maciejewska M., Greber K., Sawicki W., Kamysz W. Praca została opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (2019, 20(2):393, str. 1-19) o współczynniku IF= 4,556, punktacja MNiSW= 140.
- „Influence of Short Cationic Lipopeptides with Fatty Acids of Different Chain Lengths on Bacterial Biofilms Formed on Polystyrene and Hydrogel Surfaces”, autorstwa: Padászyńska M., Maciejewska M., Neubauer D., Gołacki K., Szymukowicz M., Bauer M., Kamysz W. Praca została opublikowana w czasopiśmie *Pharmaceutics* (2019, 11(10):506, str.1-15) o współczynniku oddziaływania IF= 4,421, punktacja MNiSW= 100.

## VI. STRESZCZENIE

Soczewki kontaktowe są stosowane przez miliony ludzi na całym świecie. Aplikowane bezpośrednio na gałkę oczną stanowią dokładną i komfortową metodę korekcji wad wzroku. Jak każdy biomateriał soczewki kontaktowe są podatne na adhezję drobnoustrojów. Niestety, mimo znacznego postępu inżynierii biomateriałowej, stosowanie soczewek kontaktowych jest jednym z głównych czynników predysponujących do rozwoju infekcji okulistycznych związanych z tworzeniem się biofilmu.

Standardową metodą leczenia infekcji okulistycznych jest antybiotykoterapia. Jednak nadużywanie związków przeciwdrobnoustrojowych o szerokim spektrum działania indukuje rozwój szczepów opornych wobec stosowanych terapeutyków. Antybiotykoterapia wykazuje także ograniczoną skuteczność w infekcjach oka związanych z tworzeniem się biofilmu. Zakażenia związane z biofilmem stanowią wyzwanie dla dzisiejszej medycyny i wskazują potrzebę opracowania nowych strategii terapeutycznych.

Prowadzone są intensywne badania nad opracowaniem nowych materiałów odpornych na kolonizację drobnoustrojów, a także nowych związków aktywnych wobec struktury biofilmu. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs) i ich analogi są intensywnie badane w tym kierunku ze względu na ich obiecujące działanie przeciwdrobnoustrojowe i szerokie spektrum działania. Niespecyficzny mechanizm działania oparty na interakcjach z błoną komórkową, zmniejsza ryzyko rozwoju oporności drobnoustrojów.

Badania nad cechami determinującymi aktywność przeciwdrobnoustrojową AMPs doprowadziły do zaprojektowania krótkich lipopeptydów. Jest to grupa wysoce skutecznych związków wykazujących podobieństwo strukturalne do endogennych antybiotyków peptydowych poprzez sumaryczny ładunek dodatni oraz amfipatyczność. Ich charakterystyczną cechą jest krótka sekwencja aminokwasowa połączona z kwasem tłuszczowym. Zaletą zaprojektowanych w ten sposób związków jest istotnie krótszy czas syntezy i niższe koszty produkcji.

Prowadzone badania nad krótkimi lipopeptydami pozwoliły zidentyfikować związki prezentujące aktywność w stosunku do wieloopornych szczepów bakteryjnych zarówno w formie wolnopływającej, jak i w postaci biofilmu. Obecnie praktyczne zastosowanie tych związków w terapii jest jednak nadal ograniczone ze względu na ich



potencjalną toksyczość i alergenicność. W związku z powyższym podejmowane są próby optymalizacji ich właściwości biologicznych.

Przedmiotem badań pracy doktorskiej były związki peptydowe, które syntetyzowano manualnie na stałym nośniku polimerowym. Otrzymano 9 syntetycznych krótkich lipopeptydów ( $C_{12}$ -KKC-NH<sub>2</sub>,  $C_{12}$ -KR-NH<sub>2</sub>,  $C_{14}$ -KKC-NH<sub>2</sub>,  $C_{14}$ -KR-NH<sub>2</sub>,  $C_{16}$ -KGG-NH<sub>2</sub>,  $C_{16}$ -KKC-NH<sub>2</sub>,  $C_{14}$ -KKK-NH<sub>2</sub>,  $C_{16}$ -KR-NH<sub>2</sub>,  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub>) oraz dwa peptydy naturalnie występujące w organizmach płazów (temporyna A, citropina 1.1).

W pierwszym etapie badań związki oceniano pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej w stosunku do referencyjnych szczepów uznanych za czynniki etiologiczne infekcji okulistycznych związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych (SA, SE, EF, EC, PA, PM). Jako związki referencyjne do badań wykorzystano dwa związki przeciwdrobnoustrojowe stosowane w konwencjonalnej terapii tych infekcji (cyprofloksacyna, chloramfenikol). Metodą seryjnych rozcieńczeń oznaczono minimalne stężenie hamujące wzrost hodowli płynnych (MIC) minimalne stężenie eradykujące biofilm (MBEC) oraz minimalne stężenie hamujące biofilm (MBFIC). Oznaczenia aktywności związków wobec biofilmu (antybiofilmowej) wykonano na powierzchni polistyrenowej i soczewek kontaktowych.

W kolejnym etapie za pomocą testu MTT przeprowadzono ocenę toksyczości związków peptydowych i związków referencyjnych w stosunku do linii komórkowej keratynocytów ludzkich (HaCaT). Na podstawie badań mikrobiologicznych oraz oznaczeń cytotoksyczności wytypowano związek o najwyższym potencjale -  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub>.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że peptydy są aktywne w stosunku do wszystkich badanych referencyjnych szczepów odpowiedzialnych za rozwój infekcji odsoczewkowych. Związki odniesienia prezentowały jednak wyższą skuteczność wobec hodowli płynnych. Większość badanych związków peptydowych prezentowała silniejsze działanie wobec biofilmu bakterii Gram-dodatnich, jednak biofilm formowany przez szczepy bakteryjne na powierzchni soczewek kontaktowych okazał się mniej wrażliwy na działanie większości badanych związków. Poprzez suplementację pożywki hodowlanej większością badanych związków peptydowych, rozwój biofilmu tworzonego przez bakterie Gram-dodatnie na obu badanych powierzchniach został skutecznie zredukowany. Pomimo zaobserwowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, związki peptydowe z wyjątkiem lipopeptydu 9 -

(C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> prezentowały aktywność toksyczną *in vitro* wobec keratynocytów HaCaT w stężeniach niższych niż stężenia aktywne mikrobiologicznie.

Dalsze etapy pracy miały na celu ocenę potencjalnego zastosowania lipopeptydu (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> w profilaktyce lub leczeniu infekcji okulistycznych związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych. W tym celu dokonano oceny wpływu związku na aktywność metaboliczną biofilmu wytworzonego na powierzchni polistyrenowej i soczewkach kontaktowych, a następnie dokonano oceny skuteczności dostępnych na rynku płynów do soczewek po suplementacji lipopeptydem. Wykorzystując metodę obliczeniową za pomocą aplikacji Toxtree oceniono także potencjał drażniącego na oko.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że krótki lipopeptyd prezentuje silniejsze właściwości anty-biofilmowe w porównaniu do referencyjnych środków przeciwdrobnoustrojowych oraz wykazuje zdolność do wzmocnienia aktywności płynów do soczewek w niskich stężeniach. Wyniki metody obliczeniowej sugerują, że lipopeptyd nie będzie wywierał działania drażniącego w stosunku do oka ludzkiego. Ze względu na wysoką aktywność mikrobiologiczną zarówno wobec utworzonego jak i zapobieganiu tworzenia się biofilmu bakteryjnego oraz działanie synergistyczne z płynami do soczewek przy stosunkowo niskiej toksyczności wobec ludzkich komórek lipopeptyd (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> powinien zostać poddany dalszym badaniom pod kątem wykorzystania w terapii oraz profilaktyce infekcji okulistycznych związanych z noszeniem soczewek kontaktowych. Związek (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> jest przykładem pomyślnie zaprojektowanego i zsyntetyzowanego nowego związku w oparciu o AMPs.

## VII. SUMMARY

Contact lenses are used by millions of people around the world. Applied directly to the eyeball, they are an accurate and comfortable method of correcting vision defects. Like any biomaterial, contact lenses are susceptible to microbial adhesion. Unfortunately, despite significant advances in biomaterial engineering, the use of contact lenses is one of the main factors predisposing to the development of ophthalmic infections associated with biofilm formation.

The standard treatment of ophthalmic infections is antibiotic therapy. However, the abuse of broad-spectrum systemic antimicrobial compounds resulted in induction of antibiotic-resistant strains. Antibiotic therapy also shows limited effectiveness in eye infections associated with biofilm formation. Biofilm-related infections pose a challenge to modern medicine and indicate the need for new therapeutic strategies.

Intensive research is carried out on the development of new materials resistant to the colonization of microorganisms, as well as new compounds active against the mature structure of the biofilm. Antimicrobial peptides (AMPs) and their analogues have been extensively examined due to their promising antimicrobial activity against a wide range of bacteria. The non-specific mechanism of action, based on interactions with the cell membrane, reduces the risk of the development of microbial resistance.

Research on the characteristics determining the antimicrobial activity of AMPs led to the design of short lipopeptides. It is a group of highly effective compounds showing structural similarity to endogenous peptide antibiotics through the total positive charge and amphipathicity. Their characteristic feature is a short amino acid sequence combined with fatty acid. The advantage of compounds designed in this way is significantly shorter synthesis time and lower production costs.

The research conducted on short lipopeptides allowed to identify compounds presenting activity against multi-resistant bacterial strains both planctonic and biofilm form. Currently, the practical use of these compounds in therapy is still limited due to their potential toxicity and allergenicity. Therefore, attempts are made to optimize their biological properties.

The subject of the dissertation was peptide compounds, which were synthesized manually through the solid-phase method. Nine synthetic short lipopeptides ( $C_{12}$ -KKC-NH<sub>2</sub>,  $C_{12}$ -KR-NH<sub>2</sub>,  $C_{14}$ -KKC-NH<sub>2</sub>,  $C_{14}$ -KR-NH<sub>2</sub>,  $C_{16}$ -KGK-NH<sub>2</sub>,

C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>, C<sub>14</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KR-NH<sub>2</sub>, (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>) and two peptides naturally occurring in amphibian organisms (temporin A, citropine 1.1) were obtained.

In the first stage of the study the compounds were evaluated for antimicrobial activity in relation to reference strains considered as etiological factors of ophthalmic infections associated with the use of contact lenses (SA, SE, EF, EC, PA, PM). Two antimicrobial compounds used in conventional therapy of these infections (ciprofloxacin, chloramphenicol) were used as reference compounds. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum biofilm inhibitory concentration (MBEC) and minimum biofilm inhibitory concentration (MBFIC) were determined using the serial dilution method. The determination of the activity of compounds against the biofilm (antibiofilm) was performed on the polystyrene surface and contact lenses.

In the next stage, the toxicity of peptide and reference compounds to human keratinocyte cell line (HaCaT) was assessed using the MTT. Based on microbiological tests and cytotoxicity determinations, the compound with the highest potential - (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> was selected.

Based on the results obtained, it was found that peptides are active against all tested reference strains responsible for the development of contact lenses-related infections. However, the reference compounds presented higher effectiveness against liquid cultures. Most of the tested peptide compounds presented a stronger effect against Gram-positive bacteria biofilm, but the biofilm formed by bacterial strains on the surface of contact lenses proved to be less sensitive to most of the tested compounds. By supplementation of the culture medium with most of the tested peptide compounds, the development of biofilm formed by Gram-positive bacteria on both tested surfaces was effectively reduced. Despite the antimicrobial activity observed, peptide compounds with the exception of lipopeptide 9 - (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> presented in vitro toxic activity against HaCaT keratinocytes at concentrations lower than microbiologically active ones.

Further actions were taken to assess the potential use of lipopeptide

(C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> in the prevention or treatment of ophthalmic infections associated with contact lenses. For this purpose, the effect of the compound on the metabolic activity of the biofilm produced on the polystyrene surface contact lenses was assessed and then the effectiveness of commercially available lens solutions after lipopeptide supplementation was evaluated. Using the calculation method with Toxtree application the eye irritation potential was also evaluated.

Based on the results obtained, it was found that short lipopeptide presents stronger antibiofilm properties compared to reference antimicrobial agents and has the ability to enhance the activity of lens fluids at low concentrations. The results of the calculation method suggest that lipopeptide will not have an irritating effect on the human eye. Due to its high microbiological activity against both the formed and prevented bacterial biofilm and its synergistic effect with lens fluids at relatively low toxicity to human cells, lipopetide  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> should be further tested for use in therapy and prevention of ophthalmic infections associated with contact lens wear. The compound  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> is an example of a successfully designed and synthesized new compound.

## VIII. LITERATURA

1. Bochenek A. RM. Anatomia Człowieka. Warszawa: PZWL.
2. Nizankowska MH. Okulistyka Podstawy Kliniczne. Warszawa: PZWL; 2007.
3. Dana R. Corneal antigen presentation: molecular regulation and functional implications. *Ocul Surf.* 2005 Oct;3(4 Suppl):S169-72.
4. McDermott AM, Perez V, Huang AJ, Pflugfelder SC, Stern ME, Baudouin C, et al. Pathways of corneal and ocular surface inflammation: a perspective from the cullen symposium. *Ocul Surf.* 2005 Oct;3(4 Suppl):S131-8.
5. Zhu SN, Dana MR. Expression of cell adhesion molecules on limbal and neovascular endothelium in corneal inflammatory neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Jun;40(7):1427-34.
6. McDermott AM. The role of antimicrobial peptides at the ocular surface. *Ophthalmic Res.* 2009;41(2):60-75.
7. Efron N. Contact lens practice: Butterworth – Heineman; 2002.
8. Sariri R, Ghafoori H. Tear proteins in health, disease, and contact lens wear. *Biochemistry (Mosc).* 2008 Apr;73(4):381-92.
9. Sack RA, Nunes I, Beaton A, Morris C. Host-defense mechanism of the ocular surfaces. *Biosci Rep.* 2001 Aug;21(4):463-80.
10. Berman HM. Biochemistry of the eye. New York: Plenum Press; 1991.
11. McDermott AM. Defense mechanisms of tear and ocular surface. In: Dartt DA, editor. *Encyclopedia of the eye.* Amsterdam: Elsevier; 2010.
12. Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc R Soc London B.* 1922(21):463–80.
13. McDermott AM. Antimicrobial compounds in tears. *Exp Eye Res.* 2013 Dec;117:53-61.
14. Giugliano LG, Ribeiro ST, Vainstein MH, Ulhoa CJ. Free secretory component and lactoferrin of human milk inhibit the adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 1995 Jan;42(1):3-9.
15. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol.* 2003 Nov;40(7):395-405.
16. Flanagan JL, Willcox MD. Role of lactoferrin in the tear film. *Biochimie.* 2009 Jan;91(1):35-43.
17. Dartt DA. Tear lipocalin: structure and function. *Ocul Surf.* 2011 Jul;9(3):126-38.
18. Fluckinger M, Haas H, Merschak P, Glasgow BJ, Redl B. Human tear lipocalin exhibits antimicrobial activity by scavenging microbial siderophores. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Sep;48(9):3367-72.
19. Gasyimov OK, Abduragimov AR, Yusifov TN, Glasgow BJ. Interaction of tear lipocalin with lysozyme and lactoferrin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Nov 19;265(2):322-5.
20. Nagyova B, Tiffany JM. Components responsible for the surface tension of human tears. *Curr Eye Res.* 1999 Jul;19(1):4-11.
21. Campos-Rodriguez R, Oliver-Aguillon G, Vega-Perez LM, Jarillo-Luna A, Hernandez-Martinez D, Rojas-Hernandez S, et al. Human IgA inhibits adherence of *Acanthamoeba polyphaga* to epithelial cells and contact lenses. *Can J Microbiol.* 2004 Sep;50(9):711-8.
22. Lan J, Willcox MD, Jackson GD. Effect of tear-specific immunoglobulin A on the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* I to contact lenses. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1999 Jun-Aug;27(3-4):218-20.
23. Qu XD, Lehrer RI. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun.* 1998 Jun;66(6):2791-7.
24. Buckland AG, Heeley EL, Wilton DC. Bacterial cell membrane hydrolysis by secreted phospholipases A(2): a major physiological role of human group IIa sPLA(2) involving both bacterial cell wall penetration and interfacial catalysis. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Apr 12;1484(2-3):195-206.

25. Nevalainen TJ, Graham GG, Scott KF. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jan-Feb;1781(1-2):1-9.
26. Sallénave JM. Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Jun;42(6):635-43.
27. Awasthi S. Surfactant protein (SP)-A and SP-D as antimicrobial and immunotherapeutic agents. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2010 Jun;5(2):115-23.
28. Brauer L, Kindler C, Jager K, Sel S, Nolle B, Pleyer U, et al. Detection of surfactant proteins A and D in human tear fluid and the human lacrimal system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Sep;48(9):3945-53.
29. Ni M, Evans DJ, Hawgood S, Anders EM, Sack RA, Fleiszig SM. Surfactant protein D is present in human tear fluid and the cornea and inhibits epithelial cell invasion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 2005 Apr;73(4):2147-56.
30. Alarcon I, Tam C, Mun JJ, LeDue J, Evans DJ, Fleiszig SM. Factors impacting corneal epithelial barrier function against *Pseudomonas aeruginosa* traversal. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Mar;52(3):1368-77.
31. McCormick CC, Hobden JA, Balzli CL, Reed JM, Caballero AR, Denard BS, et al. Surfactant protein D in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2007 Sep-Oct;15(5):371-9.
32. Tan KO, Sack RA, Holden BA, Swarbrick HA. Temporal sequence of changes in tear film composition during sleep. *Curr Eye Res*. 1993 Nov;12(11):1001-7.
33. McIntosh RS, Cade JE, Al-Abed M, Shanmuganathan V, Gupta R, Bhan A, et al. The spectrum of antimicrobial peptide expression at the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Apr;46(4):1379-85.
34. Haynes RJ, Tighe PJ, Dua HS. Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface. *Br J Ophthalmol*. 1999 Jun;83(6):737-41.
35. Zhou L, Huang LQ, Beuerman RW, Grigg ME, Li SF, Chew FT, et al. Proteomic analysis of human tears: defensin expression after ocular surface surgery. *J Proteome Res*. 2004 May-Jun;3(3):410-6.
36. Garreis F, Schlorf T, Worlitzsch D, Steven P, Brauer L, Jager K, et al. Roles of human beta-defensins in innate immune defense at the ocular surface: arming and alarming corneal and conjunctival epithelial cells. *Histochem Cell Biol*. 2010 Jul;134(1):59-73.
37. Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*. 2001 Jun 15;97(12):3951-9.
38. Garreis F, Gottschalt M, Schlorf T, Glaser R, Harder J, Worlitzsch D, et al. Expression and regulation of antimicrobial peptide psoriasin (S100A7) at the ocular surface and in the lacrimal apparatus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jun;52(7):4914-22.
39. Mohammed I, Yeung A, Abedin A, Hopkinson A, Dua HS. Signalling pathways involved in ribonuclease-7 expression. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Jun;68(11):1941-52.
40. You J, Fitzgerald A, Cozzi PJ, Zhao Z, Graham P, Russell PJ, et al. Post-translation modification of proteins in tears. *Electrophoresis*. 2010 Jun;31(11):1853-61.
41. Steele PS JM, Smith NB, Pierce WM. Detection of Histatin 5 in normal human Schirmer strip samples by mass spectroscopy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2002;43(e-abstract 98).
42. Kański JJ. *Okulistyka kliniczna*. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban&Partner; 1997.
43. Wu YT, Willcox M, Zhu H, Stapleton F. Contact lens hygiene compliance and lens case contamination: A review. *Cont Lens Anterior Eye*. 2015 Oct;38(5):307-16.
44. Wu YT, Zhu H, Harmis NY, Iskandar SY, Willcox M, Stapleton F. Profile and frequency of microbial contamination of contact lens cases. *Optom Vis Sci*. 2010 Mar;87(3):E152-8.
45. Willcox MD, Carnt N, Diec J, Naduvilath T, Evans V, Stapleton F, et al. Contact lens case contamination during daily wear of silicone hydrogels. *Optom Vis Sci*. 2010 Jul;87(7):456-64.

46. Nicholson PC VJ. Soft contact lens polymers: An evolution 2001.
47. Tranoudis I, Efron N. Water properties of soft contact lens materials. *Cont Lens Anterior Eye*. 2004 Dec;27(4):193-208.
48. Efron N, Brennan NA, Chalmers RL, Jones L, Lau C, Morgan PB, et al. Thirty years of 'quiet eye' with etafilcon A contact lenses. *Cont Lens Anterior Eye*. 2020 Jun;43(3):285-97.
49. Pritchard N, Fonn D, Brazeau D. Discontinuation of contact lens wear: a survey. *Int Contact Lens Clin*. 1999 Nov;26(6):157-62.
50. Dumbleton K, Woods CA, Jones LW, Fonn D. The impact of contemporary contact lenses on contact lens discontinuation. *Eye Contact Lens*. 2013 Jan;39(1):93-9.
51. Willcox MDP, Argueso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf*. 2017 Jul;15(3):366-403.
52. Brennan NA, Coles ML. Proposed performance criteria for extended wear contact lenses. *Cont Lens Anterior Eye*. 2000;23(4):135-9.
53. Timberlake GT, Doane MG, Bertera JH. Short-term, low-contrast visual acuity reduction associated with in vivo contact lens drying. *Optom Vis Sci*. 1992 Oct;69(10):755-60.
54. Bruinsma GM, van der Mei HC, Busscher HJ. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials*. 2001 Dec;22(24):3217-24.
55. Powell CH, Lally JM, Hoong LD, Huth SW. Lipophilic versus hydrodynamic modes of uptake and release by contact lenses of active entities used in multipurpose solutions. *Cont Lens Anterior Eye*. 2010 Feb;33(1):9-18.
56. Hart DE, Tidsale RR, Sack RA. Origin and composition of lipid deposits on soft contact lenses. *Ophthalmology*. 1986 Apr;93(4):495-503.
57. Masschalck B, Van Houdt R, Van Haver EG, Michiels CW. Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Jan;67(1):339-44.
58. Dutta D, Cole N, Willcox M. Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses. *Mol Vis*. 2012;18:14-21.
59. Jones L, Senchyna M, Glasier MA, Schickler J, Forbes I, Louie D, et al. Lysozyme and lipid deposition on silicone hydrogel contact lens materials. *Eye Contact Lens*. 2003 Jan;29(1 Suppl):S75-9; discussion S83-4, S192-4.
60. Thai LC, Tomlinson A, Doane MG. Effect of contact lens materials on tear physiology. *Optom Vis Sci*. 2004 Mar;81(3):194-204.
61. Luensmann D, Jones L. Albumin adsorption to contact lens materials: a review. *Cont Lens Anterior Eye*. 2008 Aug;31(4):179-87.
62. Eones L. An in vivo comparison of the kinetics of protein and lipid deposition on group II and group IV frequent-replacement contact lenses. *Optometry and vision science American Academy of Optometry* 2000;77: 503-10.
63. Gellatly KW, Brennan NA, Efron N. Visual decrement with deposit accumulation of HEMA contact lenses. *Am J Optom Physiol Opt*. 1988 Dec;65(12):937-41.
64. Pritchard N, Fonn D, Weed K. Ocular and subjective responses to frequent replacement of daily wear soft contact lenses. *CLAO J*. 1996 Jan;22(1):53-9.
65. Long B, Schweizer H, Bleshoy H, Zeri F. Expanding your use of silicone hydrogel contact lenses: using lotrafilcon A for daily wear. *Eye Contact Lens*. 2009 Mar;35(2):59-64.
66. Hart DE, Schkolnick JA, Bernstein S, Wallach D, Gross DF. Contact lens induced giant papillary conjunctivitis: a retrospective study. *J Am Optom Assoc*. 1989 Mar;60(3):195-204.
67. Porazinski AD, Donshik PC. Giant papillary conjunctivitis in frequent replacement contact lens wearers: a retrospective study. *CLAO J*. 1999 Jul;25(3):142-7.
68. Kotow M, Holden BA, Grant T. The value of regular replacement of low water content contact lenses for extended wear. *J Am Optom Assoc*. 1987 Jun;58(6):461-4.
69. Bontempo AR, Rapp J. Lipid deposits on hydrophilic and rigid gas permeable contact lenses. *CLAO J*. 1994 Oct;20(4):242-5.
70. Butrus SI, Klotz SA. Contact lens surface deposits increase the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Eye Res*. 1990 Aug;9(8):717-24.



71. Guillon J.P. GM. The role of tears in contact lens performance and its measurement. In: Ruben M. GM, editor. *Contact Lens practice: Chapman & Hall Medical*; 1994.
72. de Caro JJ, Ta CN, Ho HK, Cabael L, Hu N, Sanislo SR, et al. Bacterial contamination of ocular surface and needles in patients undergoing intravitreal injections. *Retina*. 2008 Jun;28(6):877-83.
73. Hovding G. Acute bacterial conjunctivitis. *Acta Ophthalmol*. 2008 Feb;86(1):5-17.
74. Willcox M, Sharma S, Naduvilath TJ, Sankaridurg PR, Gopinathan U, Holden BA. External ocular surface and lens microbiota in contact lens wearers with corneal infiltrates during extended wear of hydrogel lenses. *Eye Contact Lens*. 2011 Mar;37(2):90-5.
75. Jurkis JM. Contact lens induced Giant papillary Conjunctivitis. Anterior segment complications of contact lens wear. 1994.
76. Begley CG. Giant papillary conjunctivitis. In: Tomlinson A, editor. *Complications of contact lens wear: Mosby*; 1992.
77. Izdebska J. Kompenium okulistyki: Leczenie przeciwbakteryjne. *Okulistyka*. 2008;2.
78. Wu P, Stapleton F, Willcox MD. The causes of and cures for contact lens-induced peripheral ulcer. *Eye Contact Lens*. 2003 Jan;29(1 Suppl):S63-6; discussion S83-4, S192-4.
79. Edwards K, Keay L, Naduvilath T, Snibson G, Taylor H, Stapleton F. Characteristics of and risk factors for contact lens-related microbial keratitis in a tertiary referral hospital. *Eye (Lond)*. 2009 Jan;23(1):153-60.
80. Liesegang TJ. Contact lens-related microbial keratitis: Part I: Epidemiology. *Cornea*. 1997 Mar;16(2):125-31.
81. Tabbara KF, El-Sheikh HF, Aabed B. Extended wear contact lens related bacterial keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2000 Mar;84(3):327-8.
82. Nayak N, Nag TC, Satpathy G, Ray SB. Ultrastructural analysis of slime positive & slime negative Staphylococcus epidermidis isolates in infectious keratitis. *Indian J Med Res*. 2007 Jun;125(6):767-71.
83. Fleiszig SM, Evans DJ, Mowrey-McKee MF, Payor R, Zaidi TS, Vallas V, et al. Factors affecting Staphylococcus epidermidis adhesion to contact lenses. *Optom Vis Sci*. 1996 Sep;73(9):590-4.
84. Jachowicz R. *Leki stosowane w terapii okulistycznej*. I ed. Warszawa 2001.
85. Nikolaev Iu A, Plakunov VK. [Biofilm--"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms?]. *Mikrobiologiya*. 2007 Mar-Apr;76(2):149-63.
86. Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2010 Nov;83(2):89-105.
87. LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. Candida albicans biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Nov;50(11):3839-46.
88. Douglas LJ. Candida biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003 Jan;11(1):30-6.
89. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. Candida biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005 Apr;4(4):633-8.
90. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001 Jul 14;358(9276):135-8.
91. Książczyk M, KE, Futoma-Kołoch B., Bugła-Płoskońska G. Oddziaływanie związków dezynfekcyjnych na komórki bakteryjne w kontekście bezpieczeństwa higieny i zdrowia publicznego. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015;69:1042-55.
92. Henly EL, Dowling JAR, Maingay JB, Lacey MM, Smith TJ, Forbes S. Biocide Exposure Induces Changes in Susceptibility, Pathogenicity, and Biofilm Formation in Uropathogenic Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Mar;63(3).
93. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001 Jan;9(1):34-9.
94. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001 Oct 15;33(8):1387-92.
95. Bryers JD. Medical biofilms. *Biotechnol Bioeng*. 2008 May 1;100(1):1-18.

96. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8:76.
97. Zegans ME, Becker HI, Budzik J, O'Toole G. The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA Cell Biol*. 2002 May-Jun;21(5-6):415-20.
98. Fleiszig SM, Evans DJ. Pathogenesis of contact lens-associated microbial keratitis. *Optom Vis Sci*. 2010 Apr;87(4):225-32.
99. Bispo PJ, Haas W, Gilmore MS. Biofilms in infections of the eye. *Pathogens*. 2015 Mar 23;4(1):111-36.
100. Conlon JM, Sonnevend A. Antimicrobial peptides in frog skin secretions. *Methods Mol Biol*. 2010;618:3-14.
101. Radek K, Gallo R. Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. *Semin Immunopathol*. 2007 Apr;29(1):27-43.
102. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D1087-93.
103. Riley MA. Bacteriocins, biology, ecology, and evolution. In: Schaechter M, editor. *Encyclopedia of Microbiology*. Oxford: Elsevier; 2009. p. 32-44.
104. Smarda J, Smajs D. Colicins--exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol (Praha)*. 1998;43(6):563-82.
105. [https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=676&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=676](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=676&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=676).
106. Hahn-Lobmann S, Stephan A, Schulz S, Schneider T, Shaverskyi A, Tuse D, et al. Colicins and Salmocins - New Classes of Plant-Made Non-antibiotic Food Antibacterials. *Front Plant Sci*. 2019;10:437.
107. Roy SM, Riley MA. Evaluation of the potential of colicins to prevent extraluminal contamination of urinary catheters by *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. 2019 Nov;54(5):619-25.
108. Desmyttere H, Deweer C, Muchembled J, Sahmer K, Jacquin J, Coutte F, et al. Antifungal Activities of *Bacillus subtilis* Lipopeptides to Two *Venturia inaequalis* Strains Possessing Different Tebuconazole Sensitivity. *Front Microbiol*. 2019;10:2327.
109. Kraszewska J, WW, Sztando E., Raczyńska-Cabaj A. Aktywność Antagonistyczna bakterii fermentacji mlekowej z gatunku *Lactobacillus plantarum* *Acta Sci Pol, Technol Aliment*. 2005;4(1):39-52.
110. Galvez A, Lopez RL, Abriouel H, Valdivia E, Omar NB. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol*. 2008;28(2):125-52.
111. Riley MA. Bacteriocins, biology, ecology, and evolution. In: M. Schaechter, editor. *Encyclopedia of Microbiology*. Oxford: Elsevier; 2009. p. 32-44.
112. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002 Jan 24;415(6870):389-95.
113. Schaubert J, Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Aug;122(2):261-6.
114. Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol*. 2005 Mar;52(3 Pt 1):381-90; quiz 91-2.
115. Scott MG, Rosenberger CM, Gold MR, Finlay BB, Hancock RE. An alpha-helical cationic antimicrobial peptide selectively modulates macrophage responses to lipopolysaccharide and directly alters macrophage gene expression. *J Immunol*. 2000 Sep 15;165(6):3358-65.
116. Nijnik A, Pistolc J, Filewod NC, Hancock RE. Signaling pathways mediating chemokine induction in keratinocytes by cathelicidin LL-37 and flagellin. *J Innate Immun*. 2012;4(4):377-86.
117. Kindrachuk J, Jenssen H, Elliott M, Nijnik A, Magrangeas-Janot L, Pasupuleti M, et al. Manipulation of innate immunity by a bacterial secreted peptide: lantibiotic nisin Z is selectively immunomodulatory. *Innate Immun*. 2013 Jun;19(3):315-27.
118. Haney EF, Mansour SC, Hancock RE. Antimicrobial Peptides: An Introduction. *Methods Mol Biol*. 2017;1548:3-22.

119. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013 Nov 28;6(12):1543-75.
120. Kamysz W, Okroj M, Lukasiak J. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim Pol*. 2003;50(2):461-9.
121. Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol*. 2012 Mar;132(3 Pt 2):887-95.
122. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Oct;6(5):468-72.
123. Otvos L, Jr. Antibacterial peptides isolated from insects. *J Pept Sci*. 2000 Oct;6(10):497-511.
124. Mylonakis E, Podsiadlowski L, Muhammed M, Vilcinskas A. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2016 May 26;371(1695).
125. Irving P, Troxler L, Hetru C. Is innate enough? The innate immune response in *Drosophila*. *C R Biol*. 2004 Jun;327(6):557-70.
126. Poppel AK, Vogel H, Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 May;59(5):2508-14.
127. Langen G, Imani J, Altincicek B, Kieseritzky G, Kogel KH, Vilcinskas A. Transgenic expression of gallerimycin, a novel antifungal insect defensin from the greater wax moth *Galleria mellonella*, confers resistance to pathogenic fungi in tobacco. *Biol Chem*. 2006 May;387(5):549-57.
128. Boman HG, Wade D, Boman IA, Wahlin B, Merrifield RB. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS Lett*. 1989 Dec 18;259(1):103-6.
129. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Aug;84(15):5449-53.
130. Rinaldi AC. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. *Curr Opin Chem Biol*. 2002 Dec;6(6):799-804.
131. Soravia E, Martini G, Zasloff M. Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett*. 1988 Feb 15;228(2):337-40.
132. Simonetti O, Cirioni O, Goteri G, Ghiselli R, Kamysz W, Kamysz E, et al. Temporin A is effective in MRSA-infected wounds through bactericidal activity and acceleration of wound repair in a murine model. *Peptides*. 2008 Apr;29(4):520-8.
133. Kamysz W, Mickiewicz B, Rodziewicz-Motowidlo S, Greber K, Okroj M. Temporin A and its retro-analogues: synthesis, conformational analysis and antimicrobial activities. *J Pept Sci*. 2006 Aug;12(8):533-7.
134. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Kamysz W, Orlando F, Mocchegiani F, et al. Citropin 1.1-treated central venous catheters improve the efficacy of hydrophobic antibiotics in the treatment of experimental staphylococcal catheter-related infection. *Peptides*. 2006 Jun;27(6):1210-6.
135. Dennison SR, Harris F, Phoenix DA. The interactions of aurein 1.2 with cancer cell membranes. *Biophys Chem*. 2007 Apr;127(1-2):78-83.
136. Avila EE. Functions of Antimicrobial Peptides in Vertebrates. *Curr Protein Pept Sci*. 2017;18(11):1098-119.
137. Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*. 2004 Apr;198:169-84.
138. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*. 2009 Mar;30(3):131-41.
139. Hancock RE, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 1;97(16):8856-61.
140. Gee K, Kozlowski M, Kumar A. Tumor necrosis factor-alpha induces functionally active hyaluronan-adhesive CD44 by activating sialidase through p38 mitogen-activated protein

- kinase in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. *J Biol Chem*. 2003 Sep 26;278(39):37275-87.
141. Blanque R, Meakin C, Millet S, Gardner CR. Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides: comparison with serum levels of IL1 beta, IL6 and TNF alpha. *Gen Pharmacol*. 1996 Sep;27(6):973-7.
  142. Freudenberg MA, Tchaptchet S, Keck S, Fejer G, Huber M, Schutze N, et al. Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: benefits and hazards of LPS hypersensitivity. *Immunobiology*. 2008;213(3-4):193-203.
  143. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun*. 1995 Apr;63(4):1291-7.
  144. Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jun;43(6):1317-23.
  145. Sima P, Trebichavsky I, Sigler K. Mammalian antibiotic peptides. *Folia Microbiol (Praha)*. 2003;48(2):123-37.
  146. De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett*. 2005 Sep;27(18):1337-47.
  147. Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jun;6(6):447-56.
  148. Hattenbach LO, Gumbel H, Kippenberger S. Identification of beta-defensins in human conjunctiva. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Dec;42(12):3332.
  149. McDermott AM, Redfern RL, Zhang B, Pei Y, Huang L, Proske RJ. Defensin expression by the cornea: multiple signalling pathways mediate IL-1beta stimulation of hBD-2 expression by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 May;44(5):1859-65.
  150. Narayanan S, Miller WL, McDermott AM. Expression of human beta-defensins in conjunctival epithelium: relevance to dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Sep;44(9):3795-801.
  151. Kumar A, Zhang J, Yu FS. Toll-like receptor 2-mediated expression of beta-defensin-2 in human corneal epithelial cells. *Microbes Infect*. 2006 Feb;8(2):380-9.
  152. Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Sep;1758(9):1408-25.
  153. Scheenstra MR, van den Belt M, Tjeerdsma-van Bokhoven JLM, Schneider VAF, Ordonez SR, van Dijk A, et al. Cathelicidins PMAP-36, LL-37 and CATH-2 are similar peptides with different modes of action. *Sci Rep*. 2019 Mar 18;9(1):4780.
  154. McPhee JB, Scott MG, Hancock RE. Design of host defence peptides for antimicrobial and immunity enhancing activities. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2005 May;8(3):257-72.
  155. Anderson RC, Rehders M, Yu PL. Antimicrobial fragments of the pro-region of cathelicidins and other immune peptides. *Biotechnol Lett*. 2008 May;30(5):813-8.
  156. Schneider S, Klein HH. Long-term graft function of cryostored alginate encapsulated rat islets. *Eur J Med Res*. 2011 Sep 12;16(9):396-400.
  157. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol*. 2012 Nov;280(1):22-35.
  158. Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG, Yates KA, Proske RJ, McDermott AM. Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr Eye Res*. 2005 May;30(5):385-94.
  159. Zanetti M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr Issues Mol Biol*. 2005 Jul;7(2):179-96.
  160. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun*. 2008 Sep;76(9):4176-82.

161. Bucki R, Namiot DB, Namiot Z, Savage PB, Janmey PA. Salivary mucins inhibit antibacterial activity of the cathelicidin-derived LL-37 peptide but not the cationic steroid CSA-13. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Aug;62(2):329-35.
162. Tjabringa GS, Ninaber DK, Drijfhout JW, Rabe KF, Hiemstra PS. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;140(2):103-12.
163. Lau YE, Rozek A, Scott MG, Goosney DL, Davidson DJ, Hancock RE. Interaction and cellular localization of the human host defense peptide LL-37 with lung epithelial cells. *Infect Immun.* 2005 Jan;73(1):583-91.
164. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Bergnach C, Orlando F, Silvestri C, et al. LL-37 protects rats against lethal sepsis caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 May;50(5):1672-9.
165. MacKay BJ, Denepitiya L, Iacono VJ, Krost SB, Pollock JJ. Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 1984 Jun;44(3):695-701.
166. Nikawa H, Jin C, Fukushima H, Makihira S, Hamada T. Antifungal activity of histatin-5 against non-albicans *Candida* species. *Oral Microbiol Immunol.* 2001 Aug;16(4):250-2.
167. Abraham CM, al-Hashimi I, Haghghat N. Evaluation of the levels of oral *Candida* in patients with Sjogren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jul;86(1):65-8.
168. Kamysz W. ŁJ. Endogenne antybiotyki peptydowe. *Farmacja Polska.* 2002;58(13):617-23.
169. Xu T, Levitz SM, Diamond RD, Oppenheim FG. Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infect Immun.* 1991 Aug;59(8):2549-54.
170. van Dijk IA, Beker AF, Jellema W, Nazmi K, Wu G, Wismeijer D, et al. Histatin 1 Enhances Cell Adhesion to Titanium in an Implant Integration Model. *J Dent Res.* 2017 Apr;96(4):430-6.
171. Nicolas P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J.* 2009 Nov;276(22):6483-96.
172. Jessen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jul;19(3):491-511.
173. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005 Mar;3(3):238-50.
174. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2002;66(4):236-48.
175. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules.* 2018 Jan 19;8(1).
176. Uematsu N, Matsuzaki K. Polar angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: a model peptide study. *Biophys J.* 2000 Oct;79(4):2075-83.
177. Melo MN, Ferre R, Castanho MA. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Mar;7(3):245-50.
178. Peschel A, Sahl HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Jul;4(7):529-36.
179. Brunetti J, Falciani C, Bracci L, Pini A. Models of In-Vivo Bacterial Infections for the Development of Antimicrobial Peptide-based Drugs. *Curr Top Med Chem.* 2017;17(5):613-9.
180. Pletzer D, Wolfmeier H, Bains M, Hancock REW. Synthetic Peptides to Target Stringent Response-Controlled Virulence in a *Pseudomonas aeruginosa* Murine Cutaneous Infection Model. *Front Microbiol.* 2017;8:1867.
181. de Breij A, Riool M, Cordfunke RA, Malanovic N, de Boer L, Koning RI, et al. The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms. *Sci Transl Med.* 2018 Jan 10;10(423).
182. Dostert M, Belanger CR, Hancock REW. Design and Assessment of Anti-Biofilm Peptides: Steps Toward Clinical Application. *J Innate Immun.* 2019;11(3):193-204.

183. Ansari JM, Abraham NM, Massaro J, Murphy K, Smith-Carpenter J, Fikrig E. Anti-Biofilm Activity of a Self-Aggregating Peptide against *Streptococcus mutans*. *Front Microbiol.* 2017;8:488.
184. Park SC, Park Y, Hahm KS. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *Int J Mol Sci.* 2011;12(9):5971-92.
185. Batoni G, Maisetta G, Brancatisano FL, Esin S, Campa M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. *Curr Med Chem.* 2011;18(2):256-79.
186. Dutta D, Cole N, Kumar N, Willcox MD. Broad spectrum antimicrobial activity of melimine covalently bound to contact lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Jan 7;54(1):175-82.
187. Dutta D, Ozkan J, Willcox MD. Biocompatibility of antimicrobial melimine lenses: rabbit and human studies. *Optom Vis Sci.* 2014 May;91(5):570-81.
188. Cole N, Hume EB, Vijay AK, Sankaridurg P, Kumar N, Willcox MD. In vivo performance of melimine as an antimicrobial coating for contact lenses in models of CLARE and CLPU. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Jan;51(1):390-5.
189. Tan XW, Goh TW, Saraswathi P, Nyein CL, Setiawan M, Riau A, et al. Effectiveness of antimicrobial peptide immobilization for preventing perioperative cornea implant-associated bacterial infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Sep;58(9):5229-38.
190. Tan XW, Lakshminarayanan R, Liu SP, Goh E, Tan D, Beuerman RW, et al. Dual functionalization of titanium with vascular endothelial growth factor and beta-defensin analog for potential application in keratoprosthesis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012 Nov;100(8):2090-100.
191. Libardo MDJ, Bahar AA, Ma B, Fu R, McCormick LE, Zhao J, et al. Nuclease activity gives an edge to host-defense peptide piscidin 3 over piscidin 1, rendering it more effective against persisters and biofilms. *FEBS J.* 2017 Nov;284(21):3662-83.
192. Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Dec 16;11(1):37-51.
193. Park IY, Cho JH, Kim KS, Kim YB, Kim MS, Kim SC. Helix stability confers salt resistance upon helical antimicrobial peptides. *J Biol Chem.* 2004 Apr 2;279(14):13896-901.
194. Kacprzyk L, Rydengard V, Morgelin M, Davoudi M, Pasupuleti M, Malmsten M, et al. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Nov;1768(11):2667-80.
195. Liu S, Zhou L, Li J, Suresh A, Verma C, Foo YH, et al. Linear analogues of human beta-defensin 3: concepts for design of antimicrobial peptides with reduced cytotoxicity to mammalian cells. *Chembiochem.* 2008 Apr 14;9(6):964-73.
196. Koh JJ, Lin S, Beuerman RW, Liu S. Recent advances in synthetic lipopeptides as antimicrobial agents: designs and synthetic approaches. *Amino Acids.* 2017 Oct;49(10):1653-77.
197. Chung EMC, Dean SN, Propst CN, Bishop BM, van Hoek ML. Komodo dragon-inspired synthetic peptide DRGN-1 promotes wound-healing of a mixed-biofilm infected wound. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2017;3:9.
198. Haney EF, Brito-Sanchez Y, Trimble MJ, Mansour SC, Cherkasov A, Hancock REW. Computer-aided Discovery of Peptides that Specifically Attack Bacterial Biofilms. *Sci Rep.* 2018 Jan 30;8(1):1871.
199. Rajput A, Thakur A, Sharma S, Kumar M. aBiofilm: a resource of anti-biofilm agents and their potential implications in targeting antibiotic drug resistance. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(D1):D894-D900.
200. Sader HS, Fedler KA, Rennie RP, Stevens S, Jones RN. Omiganan pentahydrochloride (MBI 226), a topical 12-amino-acid cationic peptide: spectrum of antimicrobial activity and measurements of bactericidal activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Aug;48(8):3112-8.
201. Melo MN, Dugourd D, Castanho MA. Omiganan pentahydrochloride in the front line of clinical applications of antimicrobial peptides. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2006 Jun;1(2):201-7.

202. Trials.gov C. <https://clinicaltrials.gov/>. A service of the U.S. National Institutes of Health.
203. Hancock RE. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000 Aug;9(8):1723-9.
204. Giuliani A PG, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol*. 2007;2(1):1-33.
205. Mickels N, McManus C, Massaro J, Friden P, Braman V, D'Agostino R, et al. Clinical and microbial evaluation of a histatin-containing mouthrinse in humans with experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2001 May;28(5):404-10.
206. Gunshefski L, Mannis MJ, Cullor JS, Schwab IR, Jaynes J, Smith WL, et al. In vitro antimicrobial activity of Shiva-11 against ocular pathogens. *Cornea*. 1994 May;13(3):237-42.
207. Rajasekaran G, Kim EY, Shin SY. LL-37-derived membrane-active FK-13 analogs possessing cell selectivity, anti-biofilm activity and synergy with chloramphenicol and anti-inflammatory activity. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017 May;1859(5):722-33.
208. Brogden NK, Brogden KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Sep;38(3):217-25.
209. Nos-Barbera S, Portoles M, Morilla A, Ubach J, Andreu D, Paterson CA. Effect of hybrid peptides of cecropin A and melittin in an experimental model of bacterial keratitis. *Cornea*. 1997 Jan;16(1):101-6.
210. Yu H, Wang C, Feng L, Cai S, Liu X, Qiao X, et al. Cathelicidin-trypsin inhibitor loop conjugate represents a promising antibiotic candidate with protease stability. *Sci Rep*. 2017 Jun 1;7(1):2600.
211. Mojsoska B, Jenssen H. Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015 Jul 13;8(3):366-415.
212. Raman N, Lee MR, Rodriguez Lopez AL, Palecek SP, Lynn DM. Antifungal activity of a beta-peptide in synthetic urine media: Toward materials-based approaches to reducing catheter-associated urinary tract fungal infections. *Acta Biomater*. 2016 Oct 1;43:240-50.
213. Almaaytah A, Qaoud MT, Khalil Mohammed G, Abualhaijaa A, Knappe D, Hoffmann R, et al. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of UP-5, an Ultrashort Antimicrobial Peptide Designed Using Only Arginine and Biphenylalanine. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018 Jan 2;11(1).
214. 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.
215. Mangoni ML, Shai Y. Short native antimicrobial peptides and engineered ultrashort lipopeptides: similarities and differences in cell specificities and modes of action. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Jul;68(13):2267-80.
216. Smit W, Hancock T, Kumaresen J, Santos-Burgoa C, Sanchez-Kobashi Meneses R, Friel S. Toward a research and action agenda on urban planning/design and health equity in cities in low and middle-income countries. *J Urban Health*. 2011 Oct;88(5):875-85.
217. Shai Y, Makovitzky A, Avrahami D. Host defense peptides and lipopeptides: modes of action and potential candidates for the treatment of bacterial and fungal infections. *Curr Protein Pept Sci*. 2006 Dec;7(6):479-86.
218. Avrahami D, Shai Y. A new group of antifungal and antibacterial lipopeptides derived from non-membrane active peptides conjugated to palmitic acid. *J Biol Chem*. 2004 Mar 26;279(13):12277-85.
219. Jerala R. Synthetic lipopeptides: a novel class of anti-infectives. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007 Aug;16(8):1159-69.
220. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*. 2003 Mar;55(1):27-55.

221. Eckhard LH, Hourri-Haddad Y, Sol A, Zeharia R, Shai Y, Beyth S, et al. Sustained Release of Antibacterial Lipopeptides from Biodegradable Polymers against Oral Pathogens. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162537.
222. Greber KE, Ciura K, Belka M, Kawczak P, Nowakowska J, Baczek T, et al. Characterization of antimicrobial and hemolytic properties of short synthetic cationic lipopeptides based on QSAR/QSTR approach. *Amino Acids*. 2018 Apr;50(3-4):479-85.
223. Malina A, Shai Y. Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide. *Biochem J*. 2005 Sep 15;390(Pt 3):695-702.
224. Laverty G, McLaughlin M, Shaw C, Gorman SP, Gilmore BF. Antimicrobial activity of short, synthetic cationic lipopeptides. *Chem Biol Drug Des*. 2010 Jun;75(6):563-9.
225. Papo N, Oren Z, Pag U, Sahl HG, Shai Y. The consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. *J Biol Chem*. 2002 Sep 13;277(37):33913-21.
226. Makovitzki A, Avrahami D, Shai Y. Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 24;103(43):15997-6002.
227. de la Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock RE. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog*. 2014 May;10(5):e1004152.
228. de la Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Mansour SC, Reckseidler-Zenteno SL, Hernandez D, Brackman G, et al. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chem Biol*. 2015 Feb 19;22(2):196-205.
229. Neubauer D, Jaskiewicz M, Bauer M, Golacki K, Kamysz W. Ultrashort Cationic Lipopeptides-Effect of N-Terminal Amino Acid and Fatty Acid Type on Antimicrobial Activity and Hemolysis. *Molecules*. 2020 Jan 8;25(2).
230. Kolodziej LE, Lodolce JP, Chang JE, Schneider JR, Grimm WA, Bartulis SJ, et al. TNFAIP3 maintains intestinal barrier function and supports epithelial cell tight junctions. *PLoS One*. 2011;6(10):e26352.
231. 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 Aug;4(12):1541-51.
232. Azmi F, Elliott AG, Marasini N, Ramu S, Ziora Z, Kavanagh AM, et al. Short cationic lipopeptides as effective antibacterial agents: Design, physicochemical properties and biological evaluation. *Bioorg Med Chem*. 2016 May 15;24(10):2235-41.
233. Kamysz E, Simonetti O, Cirioni O, Arzeni D, Ganzetti G, Campanati A, et al. In vitro activity of the lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>, alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of *Candida* spp. *Peptides*. 2011 Jan;32(1):99-103.
234. Kamysz W, Silvestri C, Cirioni O, Giacometti A, Licci A, Della Vittoria A, et al. In vitro activities of the lipopeptides palmitoyl (Pal)-Lys-Lys-NH(2) and Pal-Lys-Lys alone and in combination with antimicrobial agents against multiresistant gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jan;51(1):354-8.
235. Dawgul M. B-RW, Bielińska S., Nowicki R., Kamysz W. Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na biofilm *Candida*. *Alergia Astma Immunologia*. 2010;15:220-5.
236. Greber KE. Synteza oraz badania właściwości fizykochemicznych i biologicznych surfaktantów opartych na lipopeptydach. Rozprawa doktorska. 2011;Gdański Uniwersytet Medyczny.
237. Serrano GN, Zhanel GG, Schweizer F. Antibacterial activity of ultrashort cationic lipopeptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 May;53(5):2215-7.
238. Lohan S, Cameotra SS, Bisht GS. Systematic study of non-natural short cationic lipopeptides as novel broad-spectrum antimicrobial agents. *Chem Biol Drug Des*. 2013 Nov;82(5):557-66.



239. Dawgul MA, Greber KE, Bartoszewska S, Baranska-Rybak W, Sawicki W, Kamysz W. In Vitro Evaluation of Cytotoxicity and Permeation Study on Lysine- and Arginine-Based Lipopeptides with Proven Antimicrobial Activity. *Molecules*. 2017 Dec 8;22(12).
240. Gerner I, Liebsch M, Spielmann H. Assessment of the eye irritating properties of chemicals by applying alternatives to the Draize rabbit eye test: the use of QSARs and in vitro tests for the classification of eye irritation. *Altern Lab Anim*. 2005 Jun;33(3):215-37.
241. Safford RJ. The Dermal Sensitisation Threshold- a TTC approach for allergic contact dermatitis. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2008 Jul;51(2):195-200.
242. Di Luca M, Maccari G, Nifosi R. Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. *Pathog Dis*. 2014 Apr;70(3):257-70.
243. Galdiero E, Lombardi L, Falanga A, Libralato G, Guida M, Carotenuto R. Biofilms: Novel Strategies Based on Antimicrobial Peptides. *Pharmaceutics*. 2019 Jul 10;11(7).
244. Dawgul M, Maciejewska M, Jaskiewicz M, Karafova A, Kamysz W. Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm. *Acta Pol Pharm*. 2014 Jan-Feb;71(1):39-47.
245. Jacobsen SM, Shirtliff ME. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence*. 2011 Sep-Oct;2(5):460-5.
246. Kwiecinska-Pirog J, Skowron K, Bartzak W, Gospodarek-Komkowska E. The Ciprofloxacin Impact on Biofilm Formation by *Proteus Mirabilis* and *P. Vulgaris* Strains. *Jundishapur J Microbiol*. 2016 Apr;9(4):e32656.
247. Arciola CR, Baldassarri L, Campoccia D, Creti R, Pirini V, Huebner J, et al. Strong biofilm production, antibiotic multi-resistance and high gelE expression in epidemic clones of *Enterococcus faecalis* from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*. 2008 Feb;29(5):580-6.
248. Pletzer D, Hancock RE. Antibiofilm Peptides: Potential as Broad-Spectrum Agents. *J Bacteriol*. 2016 Oct 1;198(19):2572-8.
249. de la Fuente-Nunez C, Cardoso MH, de Souza Candido E, Franco OL, Hancock RE. Synthetic antibiofilm peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2016 May;1858(5):1061-9.
250. Drzewiecka D, Zych K, Sidorczyk Z. Characterization and serological classification of a collection of *Proteus penneri* clinical strains. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2004 Mar-Apr;52(2):121-8.
251. Rothbard JB, Kreider E, VanDeusen CL, Wright L, Wylie BL, Wender PA. Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: role of backbone spacing in cellular uptake. *J Med Chem*. 2002 Aug 15;45(17):3612-8.
252. Wu Z, Cui Q, Yethiraj A. Why do arginine and lysine organize lipids differently? Insights from coarse-grained and atomistic simulations. *J Phys Chem B*. 2013 Oct 10;117(40):12145-56.
253. Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG, Rothbard JB. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res*. 2000 Nov;56(5):318-25.
254. Sikorska E, Stachurski O, Neubauer D, Maluch I, Wyrzykowski D, Bauer M, et al. Short arginine-rich lipopeptides: From self-assembly to antimicrobial activity. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2018 Nov;1860(11):2242-51.
255. Sikorska E, Dawgul M, Greber K, Ilowska E, Pogorzelska A, Kamysz W. Self-assembly and interactions of short antimicrobial cationic lipopeptides with membrane lipids: ITC, FTIR and molecular dynamics studies. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Oct;1838(10):2625-34.
256. Wenda JM, Juhaniwicz J, Tymecka D, Konarzewska D, Sek S. Modulation of Activity of Ultrashort Lipopeptides toward Negatively Charged Model Lipid Films. *Langmuir*. 2017 May 16;33(19):4619-27.
257. Zhao Y, Zhang M, Qiu S, Wang J, Peng J, Zhao P, et al. Antimicrobial activity and stability of the D-amino acid substituted derivatives of antimicrobial peptide polybia-MPI. *AMB Express*. 2016 Dec;6(1):122.

258. Cirioni O, Kamysz E, Ghiselli R, Kamysz W, Silvestri C, Orlando F, et al. Lipopeptide Laur-CKK-NH<sub>2</sub> dimer preserves daptomycin susceptibility and enhances its activity against *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Apr;66(4):859-62.
259. Dawgul M, B-RW, Greber K., Guzik I., Nowicki R., Kamysz W. Aktywność przeciwbakteryjna krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus* *Alergia Astma Immunologia*. 2001;16:31-6.
260. Ciandrini E, Morroni G, Arzeni D, Kamysz W, Neubauer D, Kamysz E, et al. Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides (AMPs) Against Clinical Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Curr Top Med Chem*. 2018;18(24):2116-26.
261. Dalhoff A. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2012;2012:976273.
262. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Sep;1354:12-31.
263. Lee AE, Niruttan K, Rawson TM, Moore LSP. Antibacterial resistance in ophthalmic infections: a multi-centre analysis across UK care settings. *BMC Infect Dis*. 2019 Sep 3;19(1):768.
264. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1318-22.
265. Brandis G, Pietsch F, Alemayehu R, Hughes D. Comprehensive phenotypic characterization of rifampicin resistance mutations in *Salmonella* provides insight into the evolution of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Mar;70(3):680-5.
266. Nomamiukor BO, Horner C, Kirby A, Hughes GJ. Living conditions are associated with increased antibiotic resistance in community isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Nov;70(11):3154-8.
267. Hwang DG. Fluoroquinolone resistance in ophthalmology and the potential role for newer ophthalmic fluoroquinolones. *Surv Ophthalmol*. 2004 Mar;49 Suppl 2:S79-83.
268. Davies SP, Azadian BS, Kox WJ, Brown EA. Pharmacokinetics of ciprofloxacin and vancomycin in patients with acute renal failure treated by continuous haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 1992;7(8):848-54.
269. Hryniewicz W. HM. Rekomendacje diagnostyki, terapii i profilaktyki zakażeń układu moczowego u dorosłych. Narodowy Program Ochrony Antybiotyków na lata 2011-2015. 2015; Narodowy Instytut Leków, Warszawa.
270. Polin HB, Plaut ME. Chloramphenicol. *N Y State J Med*. 1977 Mar;77(3):378-81.
271. Brown KE, Tisdale J, Barrett AJ, Dunbar CE, Young NS. Hepatitis-associated aplastic anemia. *N Engl J Med*. 1997 Apr 10;336(15):1059-64.
272. Lorenzo D. Chloramphenicol Resurrected: A Journey from Antibiotic Resistance in Eye Infections to Biofilm and Ocular Microbiota. *Microorganisms*. 2019 Aug 21;7(9).
273. Civljak R, Giannella M, Di Bella S, Petrosillo N. Could chloramphenicol be used against ESKAPE pathogens? A review of in vitro data in the literature from the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014 Feb;12(2):249-64.
274. Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect*. 2002 Apr;4(4):481-9.
275. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:207-28.
276. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Aug;7(8):555-67.
277. Agarwal A, Singh KP, Jain A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010 Mar;58(2):147-60.
278. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Apr;35(4):322-32.
279. Romling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med*. 2012 Dec;272(6):541-61.

280. Bartoszko JJ, Mertz D, Thabane L, Loeb M. Antibiotic therapy for skin and soft tissue infections: a protocol for a systematic review and network meta-analysis. *Syst Rev*. 2018 Sep 11;7(1):138.
281. Khan A, Wilson B, Gould IM. Current and future treatment options for community-associated MRSA infection. *Expert Opin Pharmacother*. 2018 Apr;19(5):457-70.
282. Tacconelli E, CE, Savoldi A., Kattula D., Burkert F. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization. 2018.
283. Gentile RC, Shukla S, Shah M, Ritterband DC, Engelbert M, Davis A, et al. Microbiological spectrum and antibiotic sensitivity in endophthalmitis: a 25-year review. *Ophthalmology*. 2014 Aug;121(8):1634-42.
284. Chen FV, Chang TC, Cavuoto KM. Patient demographic and microbiology trends in bacterial conjunctivitis in children. *J AAPOS*. 2018 Feb;22(1):66-7.
285. Chang VS, Dhaliwal DK, Raju L, Kowalski RP. Antibiotic Resistance in the Treatment of Staphylococcus aureus Keratitis: a 20-Year Review. *Cornea*. 2015 Jun;34(6):698-703.
286. Stapleton F, Carnt N. Contact lens-related microbial keratitis: how have epidemiology and genetics helped us with pathogenesis and prophylaxis. *Eye (Lond)*. 2012 Feb;26(2):185-93.
287. Snyder RW, Glasser DB. Antibiotic therapy for ocular infection. *West J Med*. 1994 Dec;161(6):579-84.
288. Baranska-Rybak W, Pikula M, Dawgul M, Kamysz W, Trzonkowski P, Roszkiewicz J. Safety profile of antimicrobial peptides: camel, citropin, protegrin, temporin a and lipopeptide on HaCaT keratinocytes. *Acta Pol Pharm*. 2013 Sep-Oct;70(5):795-801.
289. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Kamysz W, Silvestri C, Orlando F, et al. The lipopeptides Pal-Lys-Lys-NH(2) and Pal-Lys-Lys soaking alone and in combination with intraperitoneal vancomycin prevent vascular graft biofilm in a subcutaneous rat pouch model of staphylococcal infection. *Peptides*. 2007 Jun;28(6):1299-303.
290. Ghiselli R, Silvestri C, Cirioni O, Kamysz W, Orlando F, Calcinari A, et al. Protective effect of citropin 1.1 and tazobactam-piperacillin against oxidative damage and lethality in mice models of gram-negative sepsis. *J Surg Res*. 2011 Dec;171(2):726-33.
291. Ye Z, Zhu X, Acosta S, Kumar D, Sang T, Aparicio C. Self-assembly dynamics and antimicrobial activity of all l- and d-amino acid enantiomers of a designer peptide. *Nanoscale*. 2018 Dec 20;11(1):266-75.
292. Kamysz w. NP. Przeciwbakteryjna aktywność peptydów ze skóry płazów *Ann Acad Med Gedan* 2005;35:29034.
293. Holmberg A, Morgelin M, Rasmussen M. Effectiveness of ciprofloxacin or linezolid in combination with rifampicin against *Enterococcus faecalis* in biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Feb;67(2):433-9.
294. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Apr;45(4):999-1007.
295. Nicolle LE. Catheter-related urinary tract infection. *Drugs Aging*. 2005;22(8):627-39.
296. Tenke P, Kovacs B, Jackel M, Nagy E. The role of biofilm infection in urology. *World J Urol*. 2006 Feb;24(1):13-20.
297. Wang L, Di Luca M, Tkhilaishvili T, Trampuz A, Gonzalez Moreno M. Synergistic Activity of Fosfomycin, Ciprofloxacin, and Gentamicin Against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Front Microbiol*. 2019;10:2522.
298. Bourcier T, Thomas F, Borderie V, Chaumeil C, Laroche L. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. *Br J Ophthalmol*. 2003 Jul;87(7):834-8.
299. Teweldemedhin M, Gebreyesus H, Atsbaha AH, Asgedom SW, Saravanan M. Bacterial profile of ocular infections: a systematic review. *BMC Ophthalmol*. 2017 Nov 25;17(1):212.
300. Ciandrini E, Morroni G, Cirioni O, Kamysz W, Kamysz E, Brescini L, et al. Synergistic combinations of antimicrobial peptides against biofilms of methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus (MRSA) on polystyrene and medical devices. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 Oct 31;21:203-10.
301. Moussa DG, Fok A, Aparicio C. Hydrophobic and antimicrobial dentin: A peptide-based 2-tier protective system for dental resin composite restorations. *Acta Biomater*. 2019 Apr 1;88:251-65.
  302. Haisma EM, de Breij A, Chan H, van Dissel JT, Drijfhout JW, Hiemstra PS, et al. LL-37-derived peptides eradicate multidrug-resistant Staphylococcus aureus from thermally wounded human skin equivalents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Aug;58(8):4411-9.
  303. Anunthawan T, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE, Klaynongsruang S. Cationic amphipathic peptides KT2 and RT2 are taken up into bacterial cells and kill planktonic and biofilm bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1848(6):1352-8.
  304. Besinis A, Hadi SD, Le HR, Tredwin C, Handy RD. Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings. *Nanotoxicology*. 2017 Apr;11(3):327-38.
  305. Malhotra R, Dhawan B, Garg B, Shankar V, Nag TC. A Comparison of Bacterial Adhesion and Biofilm Formation on Commonly Used Orthopaedic Metal Implant Materials: An In vitro Study. *Indian J Orthop*. 2019 Jan-Feb;53(1):148-53.
  306. Schmidlin PR, Muller P, Attin T, Wieland M, Hofer D, Guggenheim B. Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. *J Appl Oral Sci*. 2013 Jan-Feb;21(1):48-55.
  307. Park JW, Song CW, Jung JH, Ahn SJ, Ferracane JL. The effects of surface roughness of composite resin on biofilm formation of Streptococcus mutans in the presence of saliva. *Oper Dent*. 2012 Sep-Oct;37(5):532-9.
  308. Gkana EN, Doulgeraki AI, Chorianopoulos NG, Nychas GE. Anti-adhesion and Anti-biofilm Potential of Organosilane Nanoparticles against Foodborne Pathogens. *Front Microbiol*. 2017;8:1295.
  309. De Oliveira DC, Fernandes Junior A, Kaneno R, Silva MG, Araujo Junior JP, Silva NC, et al. Ability of Salmonella spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne Pathog Dis*. 2014 Jun;11(6):478-83.
  310. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Kamysz W, Orlando F, Mocchegiani F, et al. Temporin A alone and in combination with imipenem reduces lethality in a mouse model of staphylococcal sepsis. *J Infect Dis*. 2005 Nov 1;192(9):1613-20.
  311. Ghiselli R, Giacometti A, Cirioni O, Mocchegiani F, Orlando F, Kamysz W, et al. Temporin A as a prophylactic agent against methicillin sodium-susceptible and methicillin sodium-resistant Staphylococcus epidermidis vascular graft infection. *J Vasc Surg*. 2002 Nov;36(5):1027-30.
  312. Amer LS, Bishop BM, van Hoek ML. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against Francisella. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May 28;396(2):246-51.
  313. Gabriel M, Nazmi K, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV, Zentner A. Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity. *Bioconjug Chem*. 2006 Mar-Apr;17(2):548-50.
  314. de Breij A, Riool M, Kwakman PH, de Boer L, Cordfunke RA, Drijfhout JW, et al. Prevention of Staphylococcus aureus biomaterial-associated infections using a polymer-lipid coating containing the antimicrobial peptide OP-145. *J Control Release*. 2016 Jan 28;222:1-8.
  315. Riool M, de Breij A, Drijfhout JW, Nibbering PH, Zaat SAJ. Antimicrobial Peptides in Biomedical Device Manufacturing. *Front Chem*. 2017;5:63.
  316. Pavithra D, Doble M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants--issues and prevention. *Biomed Mater*. 2008 Sep;3(3):034003.
  317. Vijay AK, Zhu H, Willcox M, Ketelson H, Stapleton F. Bacterial biofilm in silver-impregnated contact lens cases. *Cont Lens Anterior Eye*. 2019 Nov 22.

318. Ramstedt M, Ekstrand-Hammarstrom B, Shchukarev AV, Bucht A, Osterlund L, Welch M, et al. Bacterial and mammalian cell response to poly(3-sulfopropyl methacrylate) brushes loaded with silver halide salts. *Biomaterials*. 2009 Mar;30(8):1524-31.
319. Antoci V, Jr., Adams CS, Parvizi J, Davidson HM, Composto RJ, Freeman TA, et al. The inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection. *Biomaterials*. 2008 Dec;29(35):4684-90.
320. Dutta D, Zhao T, Cheah KB, Holmlund L, Willcox MDP. Activity of a melimine derived peptide Mel4 against *Stenotrophomonas*, *Delftia*, *Elizabethkingia*, *Burkholderia* and biocompatibility as a contact lens coating. *Cont Lens Anterior Eye*. 2017 Jun;40(3):175-83.
321. Dutta D, Kamphuis B, Ozcelik B, Thissen H, Pinarbasi R, Kumar N, et al. Development of Silicone Hydrogel Antimicrobial Contact Lenses with Mel4 Peptide Coating. *Optom Vis Sci*. 2018 Oct;95(10):937-46.
322. Arslan SY, Leung KP, Wu CD. The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Oct;24(5):411-6.
323. Yoshinari M, Kato T, Matsuzaka K, Hayakawa T, Shiba K. Prevention of biofilm formation on titanium surfaces modified with conjugated molecules comprised of antimicrobial and titanium-binding peptides. *Biofouling*. 2010 Jan;26(1):103-10.
324. Lesman-Movshovich E, Gilboa-Garber N. *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-III as a powerful probe for human and bovine milk analysis. *J Dairy Sci*. 2003 Jul;86(7):2276-82.
325. Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. 2002 May 30;417(6888):552-5.
326. Chhibber S, Nag D, Bansal S. Inhibiting biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* B5055 using an iron antagonizing molecule and a bacteriophage. *BMC Microbiol*. 2013;13:174.
327. Weinberg ED. Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Med Hypotheses*. 2004;63(5):863-5.
328. Ammons MC, Ward LS, Fisher ST, Wolcott RD, James GA. In vitro susceptibility of established biofilms composed of a clinical wound isolate of *Pseudomonas aeruginosa* treated with lactoferrin and xylitol. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Mar;33(3):230-6.
329. Rivardo F, Turner RJ, Allegrone G, Ceri H, Martinotti MG. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009 Jun;83(3):541-53.
330. De Zoysa GH, Sarojini V. Feasibility Study Exploring the Potential of Novel Battacin Lipopeptides as Antimicrobial Coatings. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017 Jan 18;9(2):1373-83.
331. Alves D, Magalhaes A, Grzywacz D, Neubauer D, Kamysz W, Pereira MO. Co-immobilization of Palm and DNase I for the development of an effective anti-infective coating for catheter surfaces. *Acta Biomater*. 2016 Oct 15;44:313-22.
332. Shentu TP, He M, Sun X, Zhang J, Zhang F, Gongol B, et al. AMP-Activated Protein Kinase and Sirtuin 1 Coregulation of Cortactin Contributes to Endothelial Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 Dec;36(12):2358-68.
333. Ambroziak A.M; Rębało E. II. Chemioterapia infekcji bakteryjnych – jak połączyć wiedzę kliniczną z podstawami mikrobiologii i farmakologii. Część II. *Okulistyka*. 2015;4(32).
334. Carpenter CF, Chambers HF. Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. *Clin Infect Dis*. 2004 Apr 1;38(7):994-1000.
335. Farmakopea Polska Wydanie XI. Warszawa: Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych 2017.
336. Sznitowska M, editor. *Farmacja stosowana technologia postaci leku*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2017.

337. Jachowicz R, editor. *Postać leku. Optymalizacja leków doustnych i do oczu w nowoczesnej technologii farmaceutycznej*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2013.
338. Akiyama T, Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Nguyen TT, Ushio H, Fujimura T, et al. The human cathelicidin LL-37 host defense peptide upregulates tight junction-related proteins and increases human epidermal keratinocyte barrier function. *J Innate Immun*. 2014;6(6):739-53.
339. Maciejewska M, Bauer M, Neubauer D, Kamysz W, Dawgul M. Influence of Amphibian Antimicrobial Peptides and Short Lipopeptides on Bacterial Biofilms Formed on Contact Lenses. *Materials (Basel)*. 2016 Oct 26;9(11).
340. Kamysz E, Sikorska E, Jaskiewicz M, Bauer M, Neubauer D, Bartoszevska S, et al. Lipidated Analogs of the LL-37-Derived Peptide Fragment KR12-Structural Analysis, Surface-Active Properties and Antimicrobial Activity. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 30;21(3).
341. Min KR, Galvis A, Williams B, Rayala R, Cudic P, Ajdic D. Antibacterial and Antibiofilm Activities of a Novel Synthetic Cyclic Lipopeptide against Cariogenic *Streptococcus mutans* UA159. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Aug;61(8).
342. Damour O, Hua SZ, Lasne F, Villain M, Rousselle P, Collombel C. Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. *Burns*. 1992 Dec;18(6):479-85.
343. <https://www.pharmindex.pl/> [database on the Internet].
344. Jaskiewicz M, Neubauer D, Kamysz W. Comparative Study on Antistaphylococcal Activity of Lipopeptides in Various Culture Media. *Antibiotics (Basel)*. 2017 Aug 2;6(3).
345. Catiau L, Traisnel J, Chihib NE, Le Flem G, Blanpain A, Melnyk O, et al. RYH: a minimal peptidic sequence obtained from beta-chain hemoglobin exhibiting an antimicrobial activity. *Peptides*. 2011 Jul;32(7):1463-8.
346. Vallon-Eberhard A, Makovitzki A, Beauvais A, Latge JP, Jung S, Shai Y. Efficient clearance of *Aspergillus fumigatus* in murine lungs by an ultrashort antimicrobial lipopeptide, palmitoyl-lys-ala-DAla-lys. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep;52(9):3118-26.
347. Pikula M, Zielinski M, Specjalski K, Baranska-Rybak W, Dawgul M, Langa P, et al. In Vitro Evaluation of the Allergic Potential of Antibacterial Peptides: Camel and Citropin. *Chem Biol Drug Des*. 2016 Apr;87(4):562-8.
348. Greber KE, Dawgul M, Kamysz W, Sawicki W, Lukasiak J. Biological and surface-active properties of double-chain cationic amino acid-based surfactants. *Amino Acids*. 2014 Aug;46(8):1893-8.
349. Padiuszynska MA, Maciejewska M, Greber KE, Sawicki W, Kamysz W. Antibacterial Activities of Lipopeptide (C10)(2)-KKKK-NH(2) Applied Alone and in Combination with Lens Liquids to Fight Biofilms Formed on Polystyrene Surfaces and Contact Lenses. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 17;20(2).
350. Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, Karwacki MT, Kim S, Bose JL, et al. Low levels of beta-lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio*. 2012;3(4):e00198-12.
351. Oliveira NM, Martinez-Garcia E, Xavier J, Durham WM, Kolter R, Kim W, et al. Correction: Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. *PLoS Biol*. 2015 Aug;13(8):e1002232.
352. Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci*. 2011 Apr;3(2):55-65.
353. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Apr 1;3(4):a010306.
354. Soares A, Roussel V, Pestel-Caron M, Barreau M, Caron F, Bouffartigues E, et al. Understanding Ciprofloxacin Failure in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: Persister Cells Survive Matrix Disruption. *Front Microbiol*. 2019;10:2603.
355. Mannis M.J CJ. The use of synthetic cecropin (Shiva-11) in preservative-free timolol and contact lens solutions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34(859).

356. Sousa LB, Mannis MJ, Schwab IR, Cullor J, Hosotani H, Smith W, et al. The use of synthetic Cecropin (D5C) in disinfecting contact lens solutions. *CLAO J.* 1996 Apr;22(2):114-7.
357. Jorge P, Grzywacz D, Kamysz W, Lourenco A, Pereira MO. Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* single- and double-species biofilms. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174654.
358. Bormann N, Koliszak A, Kasper S, Schoen L, Hilpert K, Volkmer R, et al. A short artificial antimicrobial peptide shows potential to prevent or treat bone infections. *Sci Rep.* 2017 May 4;7(1):1506.
359. Roy K, Ghosh G. QSTR with extended topochemical atom (ETA) indices. 9. Comparative QSAR for the toxicity of diverse functional organic compounds to *Chlorella vulgaris* using chemometric tools. *Chemosphere.* 2007 Nov;70(1):1-12.
360. Fernandez A, Lombardo A, Rallo R, Roncaglioni A, Giralt F, Benfenati E. Quantitative consensus of bioaccumulation models for integrated testing strategies. *Environ Int.* 2012 Sep 15;45:51-8.
361. Kleandrova VV, Luan F, Gonzalez-Diaz H, Ruso JM, Melo A, Speck-Planche A, et al. Computational ecotoxicology: simultaneous prediction of ecotoxic effects of nanoparticles under different experimental conditions. *Environ Int.* 2014 Dec;73:288-94.
362. Bionda N, Fleeman RM, de la Fuente-Nunez C, Rodriguez MC, Reffuveille F, Shaw LN, et al. Identification of novel cyclic lipopeptides from a positional scanning combinatorial library with enhanced antibacterial and antibiofilm activities. *Eur J Med Chem.* 2016 Jan 27;108:354-63.
363. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.* 2003 Nov;112(10):1466-77.
364. Hasan A, Waibhaw G, Tiwari S, Dharmalingam K, Shukla I, Pandey LM. Fabrication and characterization of chitosan, polyvinylpyrrolidone, and cellulose nanowhiskers nanocomposite films for wound healing drug delivery application. *J Biomed Mater Res A.* 2017 Sep;105(9):2391-404.
365. Hasan A, Waibhaw G, Saxena V, Pandey LM. Nano-biocomposite scaffolds of chitosan, carboxymethyl cellulose and silver nanoparticle modified cellulose nanowhiskers for bone tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol.* 2018 May;111:923-34.
366. Hasan A, Saxena V, Pandey LM. Surface Functionalization of Ti6Al4V via Self-assembled Monolayers for Improved Protein Adsorption and Fibroblast Adhesion. *Langmuir.* 2018 Mar 20;34(11):3494-506.
367. Lau KH, Sileika TS, Park SH, Sousa AM, Burch P, Szleifer I, et al. Molecular Design of Antifouling Polymer Brushes Using Sequence-Specific Peptoids. *Adv Mater Interfaces.* 2015 Jan 7;2(1).
368. Bertino JS, Jr. Impact of antibiotic resistance in the management of ocular infections: the role of current and future antibiotics. *Clin Ophthalmol.* 2009;3:507-21.

## VIII. SUPLEMENT

### Spis rycin

Rycina 1. Schemat budowy gałki ocznej. ....	9
Rycina 2. Trójwarstwowa struktura filmu łzowego. A) Klasyczny model wg Wolffa (1946), B) Nowy model budowy ze zmniejszającym się ku warstwie lipidowej stężeniem mucyn rozpuszczonych w wodzie. ....	11
Rycina 3. Przekrój rogówki oka w centralnej części. ....	13
Rycina 4. Komponenty przeciwdrobnoustrojowe filmu łzowego. ....	13
Rycina 5. Schemat przedstawiający funkcje peptydów przeciwdrobnoustrojowych oka. ....	16
Rycina 6. Schemat powstawania biofilmu. ....	28
Rycina 7. Mechanizmy działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych. ....	40
Rycina 8. Schemat przedstawiający redukcję enzymatyczną resazuryiny do rezorufiny pod wpływem mitochondrialnej dehydrogenazy. ....	62
Rycina 9. Redukcja MTT do nierozpuszczalnego formazanu. ....	67
Rycina 10. Aktywność lipopeptydu (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub> i referencyjnych związków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w stężeniach 1-256 µg/mL wobec biofilmu SE utworzonych na PS. (A) - wyniki odczytane 24 h po ekspozycji na związki; (B) – wyniki odczytane po wycofaniu związków i dodatkowych 24 h inkubacji w MHB II. ....	73
Rycina 11. Aktywność lipopeptydu (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub> i referencyjnych związków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w stężeniach 1-256 µg/mL wobec biofilmu SA utworzonych na PS. (A) - wyniki odczytane 24 h po ekspozycji na związki; (B) – wyniki odczytane po wycofaniu związków i dodatkowych 24 h inkubacji w MHB II. ....	74
Rycina 12. Aktywność lipopeptydu (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub> i referencyjnych związków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w stężeniach 1-256 µg/mL wobec biofilmu EF utworzonych na PS. (A) - wyniki odczytane 24 h po ekspozycji na związki; (B) – wyniki odczytane po wycofaniu związków i dodatkowych 24 h inkubacji w MHB II. ....	75
Rycina 13. Aktywność lipopeptydu (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub> i referencyjnych związków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w stężeniach 1-256 µg/mL wobec biofilmu EC utworzonych na PS. (A) - wyniki odczytane 24 h po ekspozycji na związki; (B) – wyniki odczytane po wycofaniu związków i dodatkowych 24 h inkubacji w MHB II. ....	76
Rycina 14. Aktywność lipopeptydu (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub> i referencyjnych związków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w stężeniach 1-256 µg/mL wobec biofilmu PA utworzonych na PS. (A) - wyniki odczytane 24 h po ekspozycji na związki; (B) – wyniki odczytane po wycofaniu związków i dodatkowych 24 h inkubacji w MHB II. ....	77
Rycina 15. Aktywność lipopeptydu (C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub> stosowanego w stężeniach 4-128 µg/mL wobec biofilmów tworzonych na soczewkach kontaktowych. Wyniki przedstawiono jako procent aktywności metabolicznej w porównaniu do kontroli pozytywnej (100%) i negatywnej (0%); RSD ≤ 20%. ....	78
Rycina 16. Aktywność płynów do soczewek stosowanych bez dodatku i z dodatkiem lipopeptydu aplikowanym w stężeniu 1-128 µg/mL w stosunku do biofilmu utworzonego na płytkach polistyrenowych przez: (A) SE; (B) SA; (C) EF; (D) EC;	



oraz (E) PA. Wyniki przedstawiono jako procent aktywności metabolicznej w porównaniu do kontroli pozytywnych (100%) i negatywnych (0%); RSD  $\leq$  15%... 80

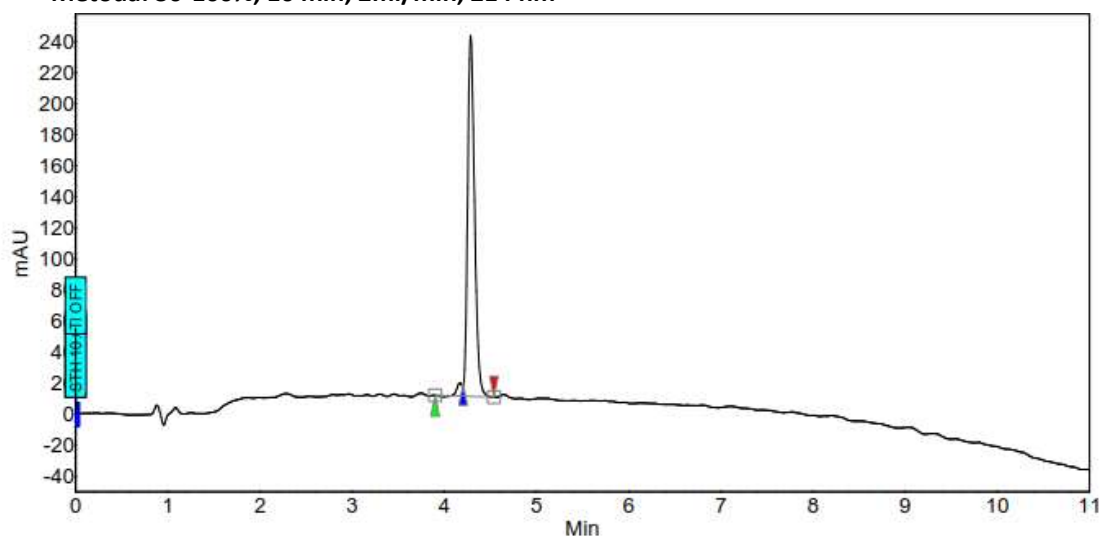
Rycina 17. Aktywność płynów do soczewek bez dodatku i z dodatkiem lipopeptydu zastosowanym w stężeniach 4-32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  w stosunku do biofilmów utworzonych na soczewkach kontaktowych przez: (A) SE; (B) SA; (C) EF; (D) EC; oraz (E) PA. Wyniki przedstawiono jako procent aktywności metabolicznej w porównaniu do kontroli pozytywnych (100%) i negatywnych (0%); RSD  $\leq$  20%..... 82

## Spis tabel

Tabela 1. Referencyjne szczepy bakteryjne wytypowane do badań. ....	54
Tabela 2. Płyny do soczewek użyte w badaniu i ich skład.....	55
Tabela 3. Sekwencje aminokwasowe, masy cząsteczkowe [Da] i ładunki otrzymanych peptydów.....	59
Tabela 4. MIC dla badanych związków w stosunku do hodowli planktonowych szczepów odpowiedzialnych za infekcje oka [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].....	61
Tabela 5. MBEC badanych związków w stosunku do biofilmu formowanego przez szczepy referencyjne na PS [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].....	63
Tabela 6. MBEC badanych związków w stosunku do biofilmów formowanych przez szczepy referencyjne na soczewkach kontaktowych [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].....	64
Tabela 7. MBFIC badanych związków oznaczone na powierzchni polistyrenowej [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].....	65
Tabela 8. MBFIC dla badanych związków oznaczone wobec biofilmu hodowanego na powierzchni soczewek kontaktowych [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].....	66
Tabela 9. Wartości stężeń $\text{IC}_{50}$ wybranych związków po 24 godzinnej inkubacji keratynocytów linii HaCaT.....	68
Tabela 10. MBEC 50 i MBEC 90 lipopeptydu $(\text{C}_{10})_2\text{-K}\text{K}\text{K}\text{K}\text{-NH}_2$ i konwencjonalnych związków przeciwdrobnoustrojowych w stosunku do biofilmu formowanego przez szczepy referencyjne na powierzchni polistyrenowej ( $\text{RSD}\leq 15\%$ ).....	70
Tabela 11. MBEC II 50 i MBEC II 90 lipopeptydu $(\text{C}_{10})_2\text{-K}\text{K}\text{K}\text{K}\text{-NH}_2$ i konwencjonalnych związków przeciwdrobnoustrojowych w stosunku do biofilmu formowanego przez szczepy referencyjne na powierzchni polistyrenowej ( $\text{RSD}\leq 15\%$ ).....	72

1. C<sub>12</sub>-KCC-NH<sub>2</sub>, dimer

Metoda: 30-100%, 10 min, 2ml/min, 214 nm

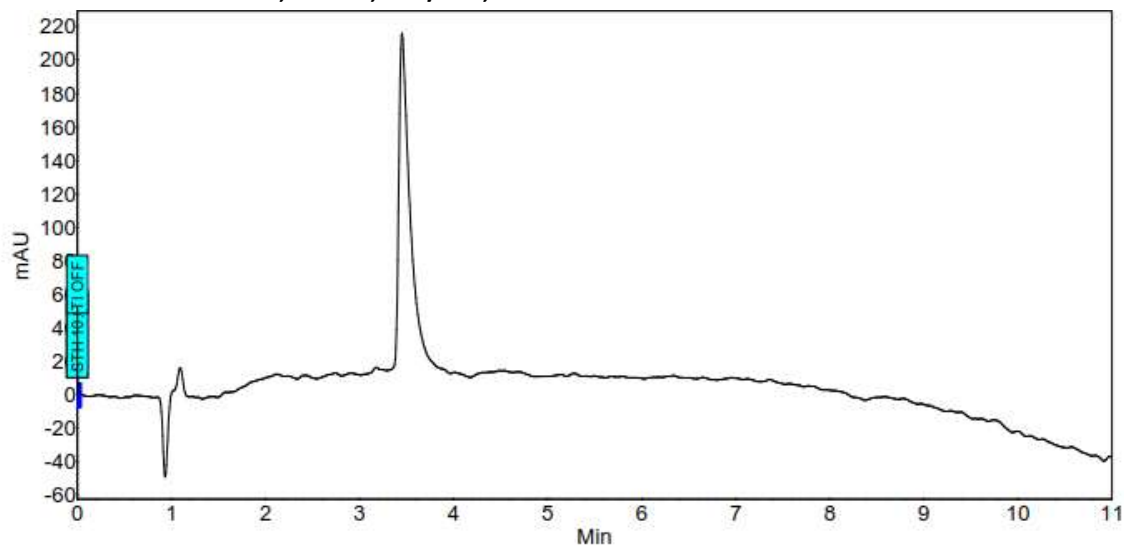


Peak results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [mAU]	Area [mAU.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	4.17	2.55	8.5	0.5	2.547
2	UNKNOWN	4.29	97.45	232.3	20.2	97.453
Total			100.00	240.9	20.8	100.000

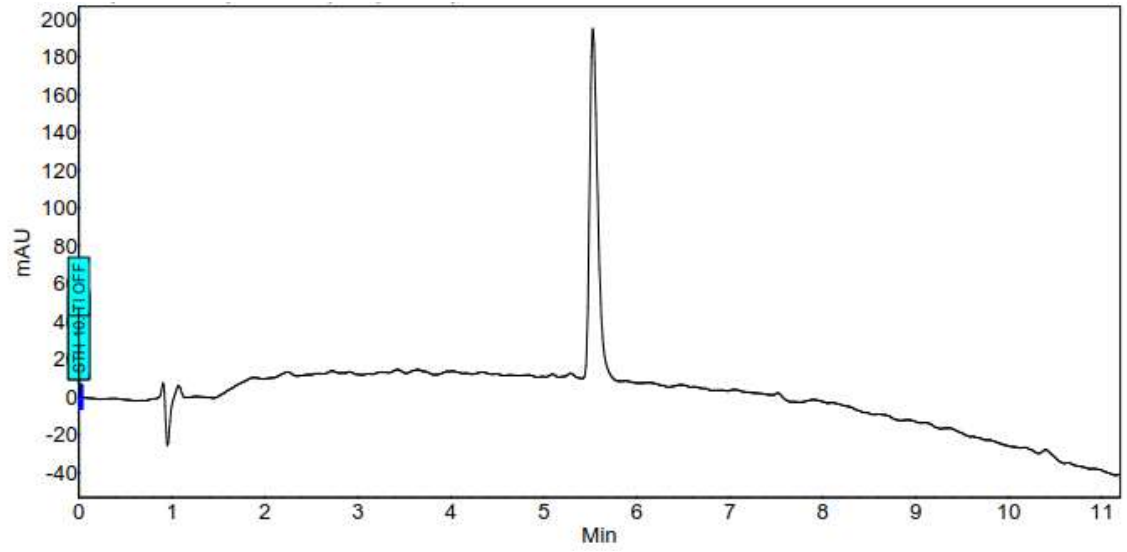
2. C<sub>12</sub>-KR-NH<sub>2</sub>

Metoda: 30-100%, 10 min, 2ml/min, 214 nm



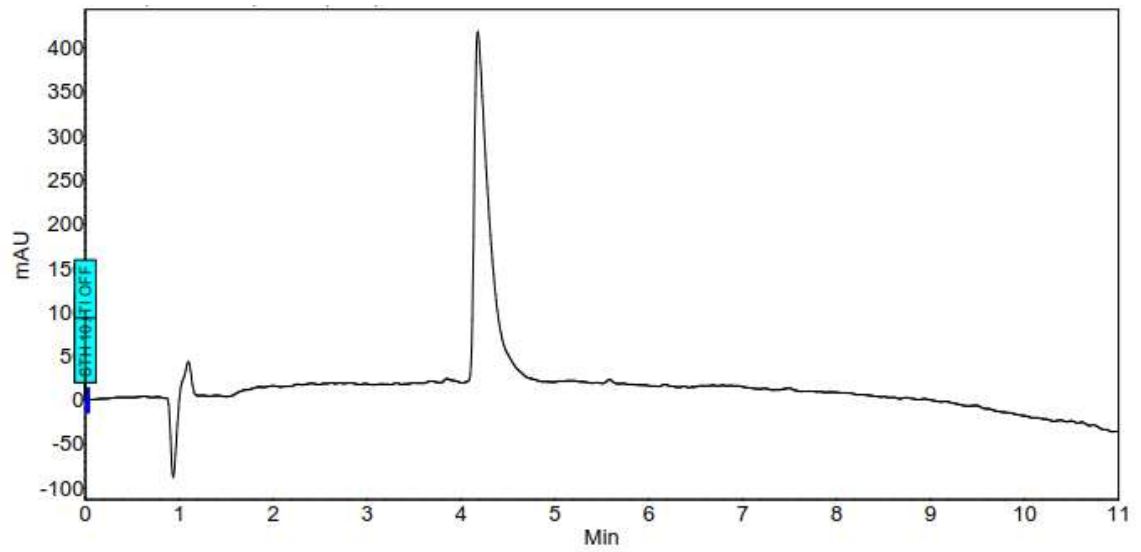
**3. C<sub>14</sub>-KKC-NH<sub>2</sub>, dimer**

**Metoda: 30-100%, 10 min, 2ml/min, 214 nm**



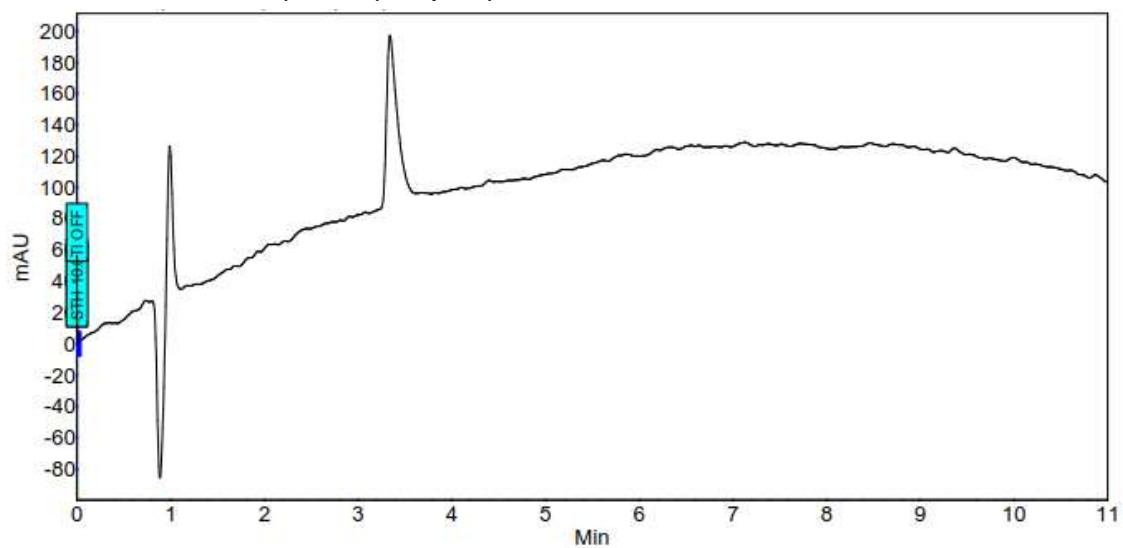
**4. C<sub>14</sub>-KR-NH<sub>2</sub>**

**Metoda: 30-100%, 10 min, 2ml/min, 214 nm**



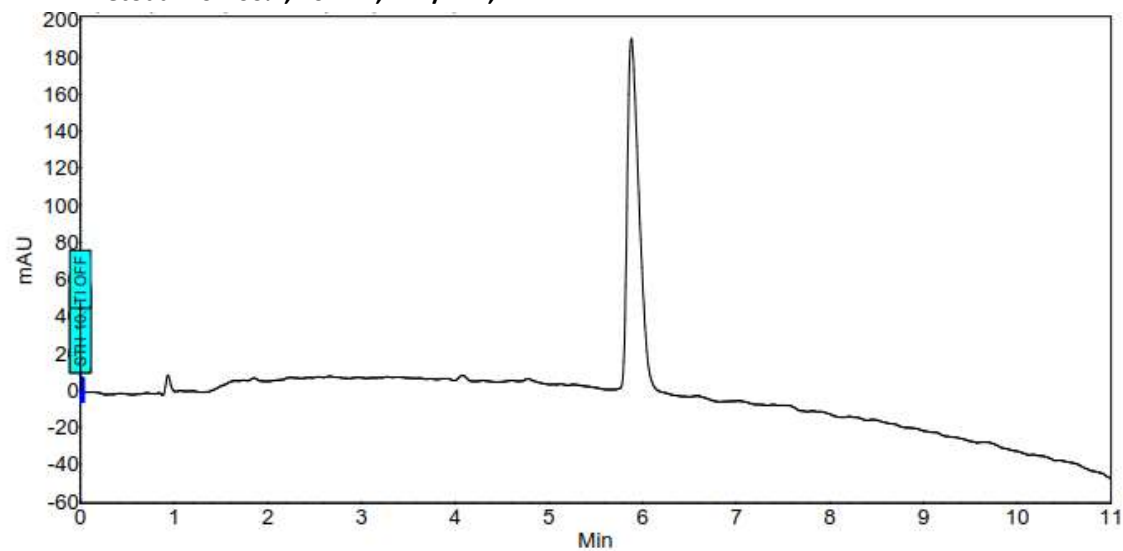
5. C<sub>16</sub>-KGK-NH<sub>2</sub>

Metoda: 40-100%, 10 min, 2ml/min, 214 nm



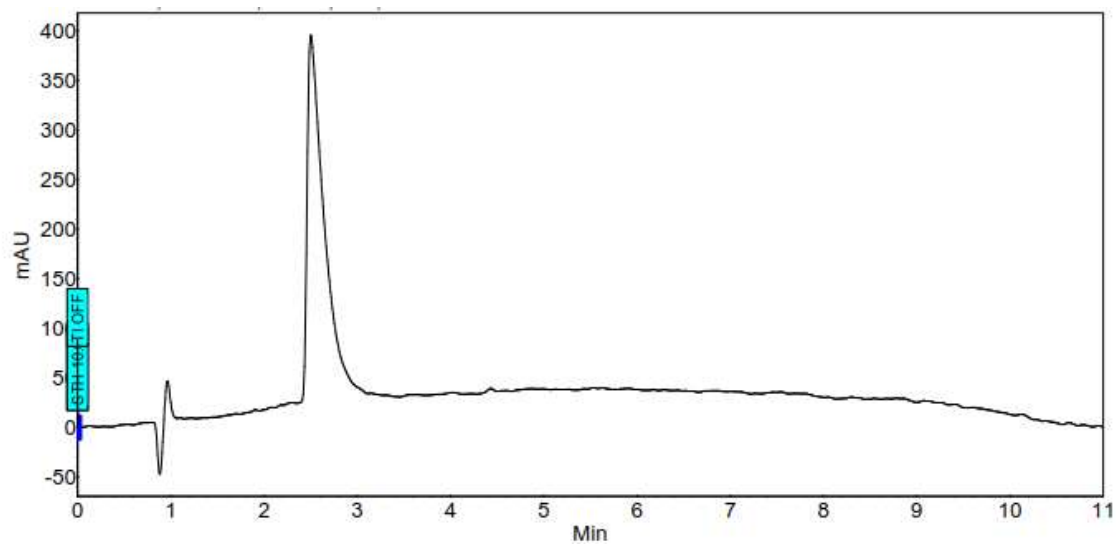
6. C<sub>16</sub>-KKC-NH<sub>2</sub>, dimer

Metoda: 40-100%, 10 min, 2ml/min, 214 nm



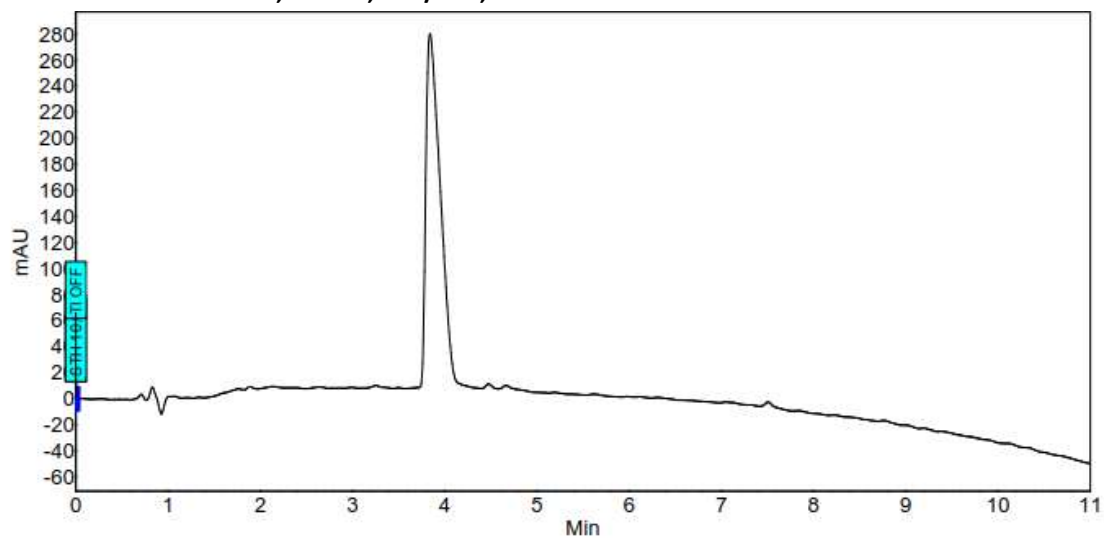
7. C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>

Metoda: 40-100%, 10 min, 2ml/min, 214 nm



8. C<sub>16</sub>-KR-NH<sub>2</sub>

Metoda: 40-100%, 10 min, 2ml/min, 214 nm



9.  $(C_{10})_2KKK-NH_2$

Metoda: 30-100%, 10 min, 2ml/min, 214 nm

