

Staphylococcus aureus jest jednym z najważniejszych patogenów bakteryjnych człowieka, odpowiedzialnym za zakażenia skóry, tkanek miękkich, kości, płuc oraz zakażenia ogólnoustrojowe. Szczególne zagrożenie stanowią szczepy metycylinyoporne (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), które wykazują oporność na wiele stosowanych antybiotyków. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) oporność drobnoustrojów na środki przeciwdrobnoustrojowe należy do najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia publicznego na świecie. Rosnąca częstość występowania szczepów wielolekoopornych ogranicza skuteczność dostępnych terapii i podkreśla potrzebę poszukiwania nowych chemioterapeutyków. Obiecującą grupą związków są peptydomimetyki, które mogą wykazywać wysoką aktywność wobec bakterii opornych na antybiotyki.

Jednym z peptydomimetyków aktywnych wobec bakterii Gram-dodatnich, w tym *S. aureus*, jest związek A-20 (Cystapep 1). Opracowano go na podstawie N-końcowego fragmentu ludzkiej cystatyny C (Arg⁸-Leu⁹-Val¹⁰-Gly¹¹), która jest białkiem o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Głównym celem mojej pracy było zaprojektowanie, synteza oraz kompleksowa charakterystyka nowych analogów cząsteczki Cystapep 1 (A-20) jako potencjalnej klasy peptydomimetycznych związków przeciwbakteryjnych aktywnych wobec szczepów MRSA.

Cel ten obejmował określenie zależności pomiędzy strukturą chemiczną peptydomimetyków, właściwościami fizykochemicznymi i aktywnością przeciwbakteryjną z wykorzystaniem metod chemometrycznych oraz SAR, ale także ocenę aktywności przeciwbakteryjnej, stabilności i cytotoksyczności otrzymanych związków. Istotnym elementem rozprawy doktorskiej było również wyjaśnienie możliwych mechanizmów działania wybranych peptydomimetyków wobec komórek MRSA, w tym ocena ich wpływu na integralność błony komórkowej oraz biosyntezę makrocząsteczek. Dodatkowo podjęłam próbę identyfikacji potencjalnych celów molekularnych badanych związków w komórkach MRSA poprzez analizę zmian proteomicznych.

Nowe analogi związku A-20 zaprojektowałam na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych w Katedrze Chemii Biomedycznej oraz z wykorzystaniem metod chemometrycznych i analizy SAR przeprowadzonej we współpracy z dr hab. Agnieszką Gajewicz-Skrętną z Katedry Chemii Fizycznej Wydziału Chemii Politechniki Gdańskiej. Wybrane związki otrzymałam metodą syntezy klasycznej w roztworze, a następnie oczyściłam i scharakteryzowałam. Ich aktywność przeciwbakteryjną oceniłam poprzez wyznaczenie wartości MIC i MBC wobec szczepów *S. aureus* oraz *S. pyogenes*. Prawie wszystkie otrzymane związki posiadały aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec badanych szczepów. Badania

stabilności wykazały, że wybrane pochodne są stabilne zarówno w środowisku wodnym, jak i w ludzkim osoczu.

Następnie oceniłam skuteczność związku A-20 oraz jego wybranych pochodnych (A-75, A-76, A-238, A-241, A-243) wobec szerszego panelu szczepów MRSA, obejmującego izolaty szpitalne i laboratoryjne. Badania wzrostu bakterii w obecności peptydomimetyków prowadzone metodą pomiaru gęstości optycznej (OD₆₀₀) w czasie potwierdziły wysoką aktywność związków niezależnie od pochodzenia szczepów.

Dla związku A-20 oraz jego wybranych zsyntezowanych analogów (A-75, A-76, A-238, A-241, A-243) przeprowadziłam badania cytotoksyczności wobec ludzkich keratynocytów oraz ocenę aktywności hemolitycznej. Analizowane peptydomimetyki nie wykazywały działania cytotoksycznego ani hemolitycznego w zakresie stężeń odpowiadających ich aktywności przeciwbakteryjnej.

Mechanizm działania badanych peptydomimetyków (A-20, A-76 i A-241) w komórkach MRSA analizowałam poprzez ocenę wpływu na proces replikacji, transkrypcji, translacji oraz integralność wewnętrznej błony cytoplazmatycznej. Wykorzystując radioaktywnie znakowane prekursorzy wykazałam hamowanie syntezy DNA i RNA w komórkach MRSA. Test wychwyty jodku propidyny oraz obserwacje z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) wskazały na destabilizację błony cytoplazmatycznej. Otrzymane wyniki sugerują złożony mechanizm działania obejmujący zarówno oddziaływanie uzyskanych związków z błoną komórkową, jak i wpływ na procesy wewnątrzkomórkowe.

Ze względu na istotną rolę biofilmów w patogenezie zakażeń wywoływanych przez *S. aureus*, oceniłam również zdolność wybranych związków (A-20, A-76 oraz A-241) do redukcji biofilmu MRSA. Skuteczność działania potwierdziłam metodą oznaczania liczby jednostek tworzących kolonie, barwieniem fioletem krystalicznym oraz obserwacjami przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Wszystkie przebadane związki wykazywały zdolność do redukcji biofilmu bakteryjnego.

W ostatnim etapie podjęłam próbę identyfikacji potencjalnych celów molekularnych badanych peptydomimetyków (A-20, A-220, A-235, A-76, A-241) z wykorzystaniem metod PISA oraz FITeXP. Pomimo zastosowania nowoczesnych narzędzi proteomicznych jednoznaczne wskazanie celu molekularnego okazało się utrudnione, co może wynikać ze złożonego i wielokierunkowego mechanizmu działania tej grupy związków.

Przeprowadzone badania poszerzają wiedzę na temat peptydomimetyków jako potencjalnych kandydatów na nowe leki przeciwbakteryjne. Otrzymane pochodne związku A-20 charakteryzują się wysoką aktywnością wobec szczepów MRSA, korzystnym profilem

bezpieczeństwa oraz wysoką stabilnością w warunkach fizjologicznych. Uzyskane wyniki wskazują, że wybrane analogi związku A- 20 (A-75, A-76, A-238, A-241 oraz A-243) stanowią obiecującą grupę chemioterapeutyków do dalszych badań nad nowymi terapiami zakażeń wywoływanych przez szczepy MRSA.