

# Wspomnienie o ś.p. Profesor Krystynie Konopce – próba krótkiej charakterystyki jej osiągnięć naukowych

**dr hab. nauk med. Wojciech Antoni Turski**

profesor Świętokrzyskiej Szkoły Wyższej w Kielcach

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_445](https://doi.org/10.18388/pb.2021_445)

## WSTĘP

27 grudnia 2021 r. w Calgary (Kanada) zmarła dr Krystyna Konopka, absolwentka Akademii Medycznej w Łodzi i Uniwersytetu Łódzkiego, Profesor Pacific University w San Francisco, długoletnia adiunkt Zakładu Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi – światowej sławy znawczyni problemów metabolizmu żelaza, a przede wszystkim wnikania wirusów, jak HIV, do komórek docelowych, wielka uczona, taterniczka [uprawiała wspinaczkę wysokogórską od 1958 roku przez 50 lat na wszystkich niemal kontynentach]. Wspaniała Kobieta, od ponad pół wieku nasza Niezapomniana Przyjaciółka...

Pamiętają Ją jednak zapewne starsi badacze, zwłaszcza ci badający komórki i mitochondria. Jej prace mogą być bliżej znane specjalistom zajmującym się infekcjami wirusowymi i... terapią AIDS.

Kierując się powyższym – i znając Krystynę ponad 60 lat – postanowiłem przybliżyć Czytelnikom Jej sylwetkę, życie i osiągnięcia naukowe. Zdaję sobie sprawę, że pełna ocena pracy naukowej Zmarłej może wymagałaby lepszego, niż moje, pióra.

## KRYSTYNA W POLSCE TJ. DO ROKU 1981 – PRZEDE WSZYSTKIM PRACE NAD TRANSPORTEM JONÓW ŻELAZA

Poznałem Krystynę, Panią Profesor Krystynę Konopkę, 60 lat temu, w Katedrze Chemii Ogólnej i Fizjologicznej Akademii Medycznej w Łodzi – na zebraniu u Profesora Bronisława Filipowicza. Krystyna miała wtedy 23 lata, już była lekarzem [maturę zdała w wieku 17 lat]. Jeszcze przed ukończeniem medycyny rozpoczęła studia biochemiczne w Uniwersytecie Łódzkim, które ukończyła w roku 1966. Jej praca doktorska, pod kierunkiem profesor Wandy Leyko, dotyczyła nukleotydów adeninowych i innych fosforanowych metabolitów erytrocytów krwi, badanych u wielokrotnych dawców krwi. Duże straty krwi, to utrata żelaza; toteż suplementacja żelazem i jego transport stały się – rozwijaną latami – wielką naukową pasją Krystyny.

W roku 1969 – Ona i ja – obroniliśmy doktoraty na UŁ; Ona u Pani Profesor Wandy Leyko, a ja u Pana Profesora Bronisława Filipowicza. Krystyna była wówczas kierownikiem Działu Analitycznego Wojewódzkiej Stacji Krwiodawstwa w Łodzi, ale w roku 1970 zaczęła pracować jako adiunkt u nas tzn. u Profesora Filipowicza. Pracowaliśmy razem – właściwie w jednym [„moim”] zespole badawczym do 1981 roku, zajmując się razem izolowaniem i oczyszczaniem frakcji [struktur] subkomórkowych, w tym mitochondriów.

Opublikowaliśmy szereg prac o tej tematyce; wymienię tu wspólne prace związane z błoną komórkową [i 5'-nukleotydamy jako markerem] [1] i siateczką śródplazmatyczną [glukozy-6-fosfataza] [2]. Ale też publikowaliśmy na temat mitochondriów i RNA/i rybosomów/ z mitochondriów [3-5] – mojej wtedy największej pasji. I tak Krystyna stała się znawcą enzymów i cytochemii.

Od 1976 roku Krystyna zaczęła własne badania nad transportem jonów żelaza do komórek mitochondriów [ale nadal współpracowaliśmy]. W 1978 Krystyna opublikowała pracę nad transferem jonów żelaza do mitochondriów [wątroby] z kompleksu Fe<sup>3+</sup>-transferyna [6]. Wiadomo było już, że transferyna może ulegać endocytozie i wchodzić do komórek. Wykazała, że to jest możliwe i że na ten proces wpływają zarówno chelatory, jak EDTA czy cytrynian, jak i pochodne adeninowe [ATP, ADP, AMP] i pirofosforan. Wykazała stymulację wiązania jonów żelaza z mitochondriami przez ATP,ADP i pirofosforan. Zostało to potwierdzone [6] w eksperymentach

z dializą mieszanin mitochondria-kompleks Fe-transferyna -X [np. ATP i ...]. Autorka zasugerowała też, że AMP, glutation i cytrynian mogą pośredniczyć w odrywaniu jonów żelaza od transferyny.

Rok później Krystyna z Ewą Turską [7] wykazały, że jony żelaza [radioaktywne z  $^{59}\text{Fe}$ ], ale praktycznie nie samo białko transferyna [jodowana], wiążą się przede wszystkim z wewnętrznym kompartmentem mitochondriów [mitoplastami], złożonym z błony wewnętrznej i matrix mitochondriów. Sporo transferyny wiązało się natomiast z zewnętrzną błoną mitochondriów. Okazało się też, że same mitoplasty pobierają jony żelaza z kompleksu z transferyną i mają na to też wpływ zarówno chelatory jak i wymienione wyżej związki fosforanowe.

W roku 1979 Krystyna pracowała z Inge Romslo w Norwegii i efektem tego były dwie prace, opublikowane w 1980 i 1981 roku [8,9]. Okazało się [8], potwierdzając wcześniejsze badania Krystyny, że związki fosforowe „aktywują” wiązanie żelaza ze strukturą mitochondriów [w kolejności malejącego wpływu: pirofosforan - ATP - GTP - 2,3-difosfoglicerynian - fosforan nieorganiczny]. Jednak nie wymagało to hydrolizy ATP.

Następna praca [9] wskazała, że pirofosforan stymuluje wiązanie Fe z mitochondriami, które jest 9x wyższe niż w nieobecności pirofosforanu, „oddysojując” jony żelaza od transferyny, przy czym zachodzi to prawie wyłącznie w mitochondriach aktywnie zużywających tlen [„oddychających”].

Krystyna stała się słynna jako badacz transportu i metabolizmu komórkowego żelaza. Dostała w 1980 roku zaproszenie do Belgii do profesora Michaela Crichtona. Efektem tego była praca [10] wykazująca, że jony  $\text{Fe}^{3+}$  odrywają się od kompleksu  $\text{Fe}^{3+}$ -pirofosforan [ten ostatni przedtem oderwał żelazo od transferyny] i powstaje kompleks  $\text{Fe}^{3+}$ -ferrytyna. Następna praca z Louvain [11] wykazała, że podobnie jak pirofosforan również 2,3-difosfoglicerynian, ATP, GTP, ADP [ale nie AMP] tworzą z  $\text{Fe}^{3+}$  trwałe kompleksy, z których jednak  $\text{Fe}^{3+}$  nie mogą połączyć się z ferrytyną.

Badaniami Krystyny zainteresował się profesor Neilands i zaprosił ją do swojego laboratorium w USA.

#### **KRYSTYNA W CALIFORNIA UNIVERSITY W BERKELEY I CALIFORNIA UNIVERSITY W SAN FRANCISCO [1981-1991]**

W latach 1981-1984 Krystyna pracowała w Department of Biochemistry u prof. Neilandsa w UC Berkeley, w latach 1984-1989 w Department of Anesthesia, California University w San Francisco, i tamże w latach 1989-1991 lecz w Cancer Research Institute. Badania Krystyny u prof. Neilandsa zaowocowały dwoma publikacjami [12,13], ale jeszcze w 1987 roku [gdy Krystyna już nie pracowała u Neilandsa] ukazała się ich wspólna praca [14]. Wykazano w niej, że drożdże *S. cerevisiae* nie produkują sideroforów. *Nota bene* w tym samym roku Crichton [15] wykazał, że drożdże mają inną strategię walki o żelazo - a mianowicie system transportu jonów  $\text{Fe}^{2+}$ .

Prace z Neilandsem to w dalszym ciągu prace o metabolizmie/transporcie żelaza, ale dotyczyły nieco innego aspektu

tego szerokiego problemu, a mianowicie tzw. sideroforów, czyli produkowanych przez bakterie substancji wiążących żelazo. Siderofory są bronią bakterii - niejako „walczą o żelazo” odrywając jony żelaza - a tym samym pozbawiając żelaza np. człowieka jako gospodarza. Stąd duża potencjalna rola sideroforów w warunkach szpitalnych infekcji bakteryjnych. W pierwszej z wymienionych prac [12] - z 1982 roku - badano efekty dwóch sideroforów: aerobaktyny [Ae] [typ hydroksamowy] i enterobaktyny [En] [typ katecholowy] z *Escherichia coli*. Wprawdzie wiązanie  $\text{Fe}^{3+}$  z Ae było słabsze niż z En, ale nasilało się ono w obecności pirofosforanu. Okazało się, że Ae, ale nie En, tworzy potrójny kompleks Ae-  $\text{Fe}^{3+}$ - transferyna. Ae miała większe powinowactwo „przerzutu”  $\text{Fe}^{3+}$ - z transferyny do komórek *E. coli*, mimo tego, że En lepiej wiązało  $\text{Fe}^{3+}$  [było jakby silniejszym sideroforem]. Praca [13] - z 1984 roku - bliżej analizuje wpływ albuminy i białek osocza na transfer żelaza z transferyny do bakterii - w obecności sideroforów. Surowica [zarówno albuminy jak immunoglobuliny] hamowała wiązanie  $\text{Fe}^{3+}$  z En i dalszy transfer do bakterii. Natomiast nie było wpływu surowicy na transfer z udziałem Ae.

W 1984 Krystyna przeniosła się do laboratorium Lucy Waskell, znanego biochemika i anestezjologa [później profesora anestezjologii w Berkeley od 1994, a od 1998 na University of Michigan]. I tak zaczęła się trwająca 10 lat „przygoda kalifornijska” Krystyny z badaniem cytochromów siateczki śródplazmatycznej [„mikrosomalnych”] i ich roli w procesach detoksykacji, w tym substancji używanych do anestezji. Pierwsza publikacja z tej serii ukazała się w 1985 roku [16]. Praca ta wykazała że detoksykacyjny metabolizm enfluranu przez szlak z cytochromem P-450 absolutnie wymaga udziału cytochromu  $b_5$ . Kolejna praca [17] wyjaśniła bardzo wiele. Wiadomo, że metabolizm halotanu [„w ewolucyjnym zamiarze” detoksykacyjny] - w mikrosomach wątroby - prowadzi do utworzenia kwasu trójfluorooctowego [KTFO], który jest bardzo toksyczny i może to „niemal w całości” wyjaśniać szkodliwe efekty anestezji halotanem. Autorzy [Krystyna] opracowali metodę oznaczania KTFO 100 razy czulszą od metod dotychczasowych. Praca [18] jest dalszym potwierdzeniem pracy [17]; dodatkowo informuje, że imidazol i..... etanol są silnymi induktorami biosyntezy izoenzymu 3a cytochromu P-450.

Również w 1988 roku ukazały się dwie prace tylko Krystyny i Lucy Waskell [20,21], obie mające bardzo wysoki score [0,329 i 0,339]. Obie te prace zajmują się wpływem dietyliopirrowęglału [DEPW] na aktywację przez cytochrom  $b_5$  oksydacyjnego metabolizmu anestetyku metoksyfluranu katalizowanego przez cytochrom P-450. DEPW jest - w pH około 7 - w dużym stopniu specyficzny dla reszt histydy. Okazało się [20], że DEPW modyfikuje cytochrom  $b_5$  [wyzolowany przy udziale detergentów] reagując z „osiowymi” resztami histydy, ale i odrywa hem od białka [ $b_5$ ]. Praca [20] wykazała też, że DEPW działa podobnie na cytochrom *c* i mioglobinę. Bardzo istotne są badania prezentowane w pracy [21]. Bardzo małe stężenia DEPW uniemożliwiają wiązanie hemu przez apocytochrom  $b_5$ . Dwie dodatkowe reszty histydy [His 39 i 63] były modyfikowane w apo, ale nie w holocytochromie  $b_5$ . Ale cytochrom  $b_5$  zsolubilizowany przy udziale trypsyny - w przeciwieństwie do tego zsolubilizowanego przy pomocy detergentu - był oporny na DEPW [nawet 200x krotny nadmiar miał nieznaczne efekty]. Autorki wyjaśniły skąd te rozbieżności. Otóż forma otrzymana przy pomocy trypsyny była

monomerem, a forma solubilizowana detergentem – oktamerem. Dysocjacja oktameru prowadzi do zmiany konformacji obniżającej reaktywność histydyn w hydrofilowej domenie – w okolicy hemu. Dalsza praca [22] bliżej wyjaśniła indukcję cytochromu P-450, głównie formy 3a, przez izoniazyd, etanol i imidazol. Traktowanie królików imidazolem [zwróćmy uwagę, że pierścień imidazolu jest w histydynie] wywołuje 250% wzrost mikrosomalnego metabolizmu anestetyków: enfluranu, sevofluranu i metoksyfluranu, ale i...aniliny. Poliklonalne przeciwciała anti-3a hamowały o 90% metabolizm enfluranu, ale tylko o 40% metoksyfluranu.

Omówię teraz dwie ważne prace porównujące metabolizm, a szczególnie toksyczne efekty uboczne kilku anestetyków. „Głównym graczem” był tu I-653 [desfluran], który porównywano z izofluranem, metoksyfluranem i halotanem. Tylko z I-653 nie odnotowano praktycznie przyrostu zawartości jonów fluorkowych w osoczu [i związków fluoroorganicznych w moczu] po anestezji [w porównaniu z kontrolą bez anestetyku, a jedynie z preekspozycją na fenobarbital] – u szczurów [23]. Ta oporność desfluranu – na powstawanie jonów F<sup>-</sup> – decyduje o minimalnej toksyczności tego anestetyku. Praca [24] w pełni to potwierdziła u świń. Tuż po anestezji I-653 nie było żadnego wzrostu stężenia jonów F<sup>-</sup>; przyrost o 17% był 4 godziny po anestezji. W pracy [25] porównano dwóch pacjentów: jednego, któremu przeszczepiono nerkę i drugiego, któremu wykonano operację rekonstrukcji jelita krętego. W skład mieszanki do wziewnej anestezji u obu był izofluran, obu też podawano izoniazyd, zastosowany jako induktor cytochromu P-450. Okazało się, że u obu pacjentów dynamika w czasie – po operacji/po anestezji – powstawania wolnych jonów F<sup>-</sup> i kwasu trifluoroctowego- była bardzo różna. U pacjenta I [z transplantacją nerki] poziom jonów fluorkowych osocza wzrósł do 30 μM, a u pacjenta II jedynie 8 μM [bez izoniazydu około 4 μM]. Wskazuje to, iż izoniazyd nie musi dawać toksycznych efektów ubocznych.

Dwie prace – opublikowane sporo później, poruszają proces ochronnej roli cytochromu b<sub>5</sub> przy stosowaniu anestezji pociągającej za sobą metabolizm anestetyku w siateczce śródplazmatycznej wątroby w kaskadzie reakcji, w której główną rolę odgrywa cytochrom P-450. Pierwsza z tych prac [26] z 1992 roku wskazuje, że w obecności cytochromu b<sub>5</sub> w tym procesie, w mikrosomach powstaje dużo mniej reaktywnych form tlenu [ROS]; cytochrom b<sub>5</sub> pełni rolę antyoksydanta. Druga z tych prac [27] z 1994 roku wskazuje, że w trakcie metabolizmu anestetyków cytochrom b<sub>5</sub> w ogóle obniża produkcję toksycznych produktów ubocznych – nie tylko ROS, ale i nefrotoksycznych jonów fluorkowych. Ale najciekawsza i najczęściej cytowana jest najpóźniejsza z prac o cytochromach, opublikowana w 1995 roku [27]. Poświęcona jest ona badaniom stochiometrii kompleksów silnych anestetyków metoksyfluranu i benzfetaminy, przy czym ta ostatnia nie wymaga udziału w swoim metabolizmie cytochromu b<sub>5</sub>.

## PRACA W PACIFIC UNIVERSITY W SAN FRANCISCO – GŁÓWNIENAD HIV-W LATACH 1991-2012

### HIV A LIPOSOMY KATIONOWE [I ANIONOWE]

W roku 1991 Krystyna przeniosła się do University of Pacific w San Francisco, do Department of Microbiology, słynnej w USA School of Dentistry. Dostała tam etat „senior research

scientist”. W roku 1998 została *associate professor*, a w 2003 roku – profesorem [full profesor!]. Przez cały okres [aż do śmierci] pracowała z Nejatem Düzgünesem, który od 1991 do 2003 był Jej szefem, a zawsze przyjacielem i współpracownikiem. Co budzi najwyższy podziw w aktywności Krystyny, to fakt, że już w pierwszym roku pracy opublikowała ...pięć prac – z zupełnie nowej, trudnej tematyki – i to była w nich pierwszym autorem. Były to prace o wirusie HIV i liposomach. Krystyna była bardzo zdolna i pracowita, a mimo to, aż trudno to tempo badawcze i publikacyjne pojąć.

Praca [28] wykazała, że włączenie wirusa HIV do struktury liposomów może wpływać na infekcję komórek [oczywiście mających glikoproteinę CD, będącą „receptorem HIV” tzn. CD4+]. Wpływ ten może być bardzo różny – zależny od ładunku elektrycznego liposomów tzn. głównego ich lipidu.

Powyższa praca – na starcie w School of Dentistry – to było jak „wejście smoka”; pierwsza praca i już wirusy, hodowle komórkowe, liposomy!

Podobnie było z pracą drugą [29], właściwie równoległą. Okazało się, że komórki CD4 minus też mogą być, choć słabiej, zainfekowane wirusem HIV, ale fuzja wirusa z DOTMA [LK!] znacznie zwiększa zakaźność. Co więcej – bez CD4 nie ma hamowania infekcyjności przez przeciwciała.

W pracy zespołu Nejata, „bez Krystyny” [29 A] Larsen *et al.* – w 1990 roku – wykazali, że małpi odpowiednik HIV – u makaków-SIV<sub>mac</sub> może ulegać fuzji z błoną komórek docelowych nie zawierających CD4. W pracy Krystyny [30] te dane zostały potwierdzone. Dodatkowo badano tam wnikanie „ludzkiego” HIV-1, dla którego też wykazano stymulację jonami wapnia i obniżeniem pH, ale dodatkowo stymulujący wpływ [użycia] LK z ...DOTMA. Praca [31] dalej potwierdziła hamujący wpływ kardiolipiny na wnikanie HIV.

Praca [32] wyjaśniła, że surowica znacznie hamowała wnikanie HIV do komórek docelowych, ale stymulacja przez DOTMA [w liposomach] była wyraźnie wyższa w obecności surowicy niż bez niej. Oprócz DOTMA stymulację wywoływało zastosowanie kationowych polimerów [jak DEAE – dekstran]. Liposomy zawierające DOTMA wiązały się z wirusem [ew. DNA „anty RNA wirusa”] HIV-1, ale nie wiązały się – w obecności surowicy – z błoną komórkową. Wiązanie było absolutnie zależne od obecności CD4. Daje to następującą kolejność etapów: 1. wiązanie HIV z liposomami, 2. wiązanie liposomów z błoną [CD4], 3. dalsza penetracja wirusa.

Praca [33] podsumowuje, że LA nie ulegają praktycznie fuzji z błoną komórki docelowej. W 1994 roku Diana Flasher, Krystyna i zespół [34] wprowadzili do liposomów białko CD4 [uważane za receptor HIV] tzn. jego ektodomenę. Gdy CD4 jest w błoni, to efektywnie wiąże HIV, a konkretnie jego glikoproteinę gp120. Okazało się, że takie liposomy z CD4 wiązały się, ale...tylko z chronicznie zakażonymi komórkami. Liposomy z CD4 wiązały się z błoną i...hamowały zakażenie. Tak samo jak CD4 można było do liposomów wprowadzić „chimeryczny” kompleks CD4 z immunoadhezyną [IgG]. Tak więc liposomy mogą być użyte do przenoszenia substancji antywirusowych i cytotoksycznych. Istotnie w pracy [35] wy-

kazano, że przy pomocy LK można do komórek zakażonych HIV wprowadzić specjalny rybozym [RNA] anty HIV.

Praca [36] wykazała, że infekcja HIV zwiększa wrażliwość makrofagów i monocytów [THP-1] na cytotoksyczny wpływ liposomów kationowych]. Preinkubowano zakażone i niezakażone komórki z LK [z lipofektyną/DOTMA i dioleilofosfatydyloetanolaminą (DOPE)] w stosunku 1:1/lipofektamina oraz DMRIE [1,2-dimiryostoiloksypropylo-3-dimetylohydroksyetylo amoniowy bromek] w obecności surowicy wołowej w 37°C. Żywotność była ustalana przez pomiar czerwonej fluorescencji – żywych komórek – z penetrującym plazmalemmę Alamar Blue [ergo namnażanie się wirusów monitorowane – immunochemicznie – jako poziom białka kapsydu wirusowego p24]. Wprawdzie wszystkie liposomy dawały efekt cytotoksyczny, to jednak okazało się, że produkcja nowych wirusów była bardziej niż żywotność wrażliwa na działanie LK.

Dalsza praca Krystyny [37] to istotny postęp. Autorzy wpadli na pomysł wprowadzenia do LK fragmentu genu toksyny błoniczej [pTHA43] [FGTB]. Mogłaby to być już „terapia genu” – zakładając powiązanie ekspresji tegoż genu z wirusem HIV. Użycie owego genu dawało niemal całkowite zahamowanie replikacji wirusów, ale...gdy ów gen był kotransfekowany z wirusem HIV. Natomiast podanie LK z FGTB z i bez CD4 do zawiesiny komórek chronicznie zakażonych HIV nie dawało wzrostu efektu w porównaniu do LK bez FGTB. Po prostu same liposomy wywoływały ogólny efekt cytotoksyczny na tyle duży, że hamowało to namnażanie się wirusów.

W pracy [38] próbowano z powodzeniem wprowadzić do LK [z lipofektyną] aptamer – anty HIV[RBE(apt)]. Tak skonstruowane liposomy inkubowano z zakażonymi HIV komórkami HeLa. Znaczne zahamowanie mnożenia się wirusów zaobserwowano, ...ale przy kotransfekcji z zastosowaniem LK z aptamerem i DNA: proviral HIV clone [HxBδBg]. Nie był to efekt „wzrostu ogólnej cytotoksyczności”, gdyż nie było żadnej różnicy w żywotności między stosowaniem LK z aptamerem i bez. Warto zwrócić uwagę, iż transferyna [!] dodana do LK – przed aptamerem-zwiększała wydajność transfekcji .

Publikacja [39] wykazała, że jednak dostarczenie „chimerycznego”[DNA-RNA] rybozemu [który dołącza się do 5'-LTR proviral HIV clone – HxBδBg] jest procesem nieefektywnym i wymaga znacznych ulepszeń [przed dalszym jego stosowaniem *in vivo* i *ex vivo*].

Praca [40] rozszerza listę potencjalnych środków użytych w formie LK hamujących replikację wirusów. Tu wymieńmy: 1. inhibitor proteazy HIV-1 [IPH] [był 10x bardziej aktywny w porównaniu z wolnym IPH, 2. inhibitor „odwrotnej transkryptazy” [9-(2-fosforylometylo etylo) adenina: PME] – EC<sub>50</sub> był o rząd wielkości mniejszy niż dla wolnego PME, 3. oligodezoksynukleotyd komplementarny do HIV-1-5' – LTR hamował namnażanie wirusów o 90%.

W dyskusyjno-przeglądowej pracy [41] podsumowano dalsze perspektywy użycia wielkocząsteczkowych substancji anty-HIV [wbudowanych do LK].

Następna praca [42] podkreślała rolę zobojętnienia ujemnego ładunku błony komórek docelowych przez dodatni

ładunek LK. Praca opisuje też kompleksowanie – obudowanych w LK – wirusa białaczki gibbonów [GALV] oraz wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej. Autorzy mocno podkreślają, że wiązanie substancji X [z LK] z błoną to jeszcze nie transfekcja.

#### DALEJ HIV [Z LIPOSOMAMI – ALE I BEZ]

Praca [43] wykazała, że komórki linii komórkowej białaczki monocytów THP-1 ulegały długotrwałemu produktywnemu zakażeniu HiV-1. Jednak działanie estrów forbolu [stymulujących kinazę C – *nota bene* promotorów nowotworów] zapobiegało temu modyfikując „obrót nowych wirusów”. Zakażone monocyty były dalej zdolne do różnicowania się. Nowe wirusy wychodziły z komórek jakby „przez pączkowanie” [egzocytoza], tymczasem w komórkach traktowanych przez PMA – po 21 dniach – obserwowano akumulację wirionów, ale w ... wakuolach wewnątrzkomórkowych.

Praca Krystyny [44] z 1995 roku, wykazała, że syntetyczny hydrofobowy peptyd [Z-D-Phe-L-Phe Gly]-użyty w formie LK-bardzo hamuje tworzenie syncytiów między komórkami A301, Sup-T1 i H-9. Natomiast niemal wcale nie hamuje infekcyjności. Wskazuje to, że mechanizmy interakcji HIV-1 glikoproteiny gp120 z błoną komórkową są inne dla fuzji komórka-komórka niż komórka-wirus. Praca [45] udowodniła, że monoklonalne przeciwciała wobec kompleksu HIV gp120 z białkiem CD4 znacznie hamowało [w komórkach H9 chronicznie zainfekowanych HIV] zarówno mnożenie się wirusów jak i tworzenie syncytiów H9-H9. Tymczasem dla komórek A3.01 i Sup-T<sub>1</sub> było tylko hamowanie tworzenia się syncytiów (jak w pracy [44]).

W pracy [46] badano efekt – na komórki H9 – polienowego antybiotyku amfoterycyny B [AMB] na mnożenie wirusów HIV, ich przechodzenie do komórek Sup-T1 oraz na tworzenie syncytiów. Ale zastosowano dwie drogi „podania” AMB: 1. tzw. „podstępne” [stealth] liposomy [L-AMB], zawierające poli(glikol etylenowy) (PEG) w celu poprawienia czasu krążenia krwi w liposomach, i 2. po prostu razem z zawiesiną koloidalną siarczanu cholesterolu [CD-AMB]. CD-AMB jest dużo mniej toksyczne niż L-AMB, nie hamuje tworzenia syncytiów, a ma bardzo silny efekt hamujący na mnożenie HIV-ale najlepiej przy długotrwałym ciągłym stosowaniu.

Praca Krystyny z 2000 r. [47] badała czy antywirusowy efekt aptameru wiążącego się z genem HIV-1 Rev – AP może być wzmocniony przez dodanie rybozemu – Ryb [aktywnego wobec genu glikoproteiny HIV-odpowiedzialnej za fuzję z błoną komórki docelowej]. Białko kodowane przez gen Rev wchodzi do jądra i tam ma wpływ na eksport mRNA do cytoplazmy. Przy braku produkcji tegoż białka mRNA są zatrzymywane w jądrze i nie dochodzi do translacji. Autorzy [47] wykazali, że dodanie rybozemu nie wpływa na aktywność antywirusową. Komórki HeLa [CD4 plus] – chronicznie zakażone HIV- były inkubowane z „lipopleksami” zawierającymi: 1. AP [lub Ryb], 2. DNA- „HIV proviral clone”, i 3. [!] transferynę. AP i Ryb były wbudowane do plazmidów [pTZU6+27]. Takie zmodyfikowane plazmidy konstruowano używając promotorów dla ludzkiego wirusa cytomegalii [CMV] i/lub wirusa mięsaka Rous [RSV]. Kotransfekcja z liposomami zawierającymi aptamery w plazmidach- skonstruowanych przy użyciu promotora

rów z RSV, ale nie CMV dawała 88% zahamowania produkcji nowych wirusów. Istotnie: praca [48] wykazała, że promotor CMV hamuje ekspresję genów przebiegającą z udziałem HIV-1 LTR, ale też ekspresję genów małego wirusa SV40.

Praca Krystyny [49] udowodniła, że białko powierzchniowe komórek monocytów THP-1 odgrywa podstawową rolę w zakażaniu komórek wirusem HIV, ale użytym w formie... izolatów z wirusów, które mają jako koreceptory CXCR4 i/lub CCRP. Ekspresja tych białek, ale nie CD4, nie była zaburzona podczas transfekcji z użyciem odpowiednich liposomów.

Publikacja – już z 2008 roku – [50] podsumowuje dotychczasowe badania co do komórek zakażonych HIV [i liposomów]. Użyte LK zawierały rozpuszczalną CD4. Antysensowne oligodezoksynucleotydy, ale i inhibitor proteazy HIV-1, były dużo bardziej aktywne „antywirusowo” użyte w liposomach niż w postaci wolnej. Ale dodatkowo okazało się, że antybiotyki [ciprofloksacyna, paromycyna, sparfloksacyna i... streptomycyna] hamowały rozwój bakterii *Mycobacterium* [MA] *avium* i *M. tuberculosis* [MT] wewnątrz makrofagów bardziej, gdy są „otorbione” w liposomach niż w postaci wolnej.

Praca [51] udowadnia, że – opracowana przez zespół – fluorescencyjna metoda jest bardzo przydatna do monitorowania fuzji komórek [ergo tworzenia syncytiów, które wykazują pomarańczową fluorescencję]. Obserwacja, że przeciwciała, które hamują zakażenie HIV, nie hamują tworzenia syncytiów, sugeruje, że [co było stwierdzane już we wcześniejszych pracach] mechanizmy fuzji wirus – komórka i komórka-komórka są inne. Autorzy sugerują też, że przeciwciała nie są w stanie wpływać na przechodzenie wirusowego materiału genetycznego z jednej do drugiej komórki.

Okazało się [52], że lektyny [wiązące reszty cukrowe], przeciwciała anty HIV i peptyd T-20 hamują tworzenie syncytiów. Było to całkowicie eliminowane przez różne aglutyniny wiążące glikoproteiny.

Bardzo ważna jest praca [53] autorzy postanowili użyć promotora odpowiedzialnego za aktywator transkrypcji HIV [Tat], ale nie wiążący się czynnikami transkrypcji komórki docelowej jako takiej. Zdolny do ekspresji lucyferazy wektor zawierał plazmid „kodujący” Tat – a jako promotorów użyto pięć fragmentów HIV-LTR o różnej długości: LTR1, LTR-2,... LTR 5. Miarą transfekcji była aktywność lucyferazy. Największą i najbardziej specyficzną ekspresję Tat, a więc i potencjalnie nasilenie multiplikacji HIV – notowano przy użyciu promotora LTR4. Okazało się [54], że taki promotor jest 100 razy bardziej wydajny od komórkowych czynników transkrypcyjnych.

## **PRACE WAŻNE DLA STOMATOLOGII, ALE I...ONKOLOGII [1997-2012]**

### **TRANSDUKCJA GENÓW PRZY UŻYCIU NIE WIRUSOWYCH WEKTORÓW I „SAMOBÓJCZA” TERAPIA GENOWA [1997-2012]**

W 1996 roku Krystyna postanowiła zająć się nie tylko HIV, ale już bezpośrednio jamą ustną, jej okolicami – w tym ich nowotworami. Ale zaczęła od wnikliwej analizy piśmiennictwa. I efektem tego była praca przeglądowa [55]. Osoby zakażone wirusem HIV często mają zmiany w jamie ustnej, które mogą

powodować krwawienie i uwalnianie wirusa do jamy ustnej. Wirusowe p24 i RNA HIV-1 wykryto w migdałkach, nawet u bezobjawowych osobników seropozytywnych. Potencjalna infekcyjność śliny przez HIV jest niska, chociaż w ślinie wykryto zarówno zakaźny HIV-1, jak i DNA HIV. Spośród ocenianych białek ślinowych inhibitor wydzielniczej proteazy leukocytów (rSLPI) może w stężeniach fizjologicznych hamować zakażenie makrofagów przez HIV-1. Aktywność przeciw HIV inhibitora proteazy serynowej rSLPI jest najprawdopodobniej spowodowana jego interakcją z cząsteczkami na powierzchni komórki innymi niż główny receptor HIV-1 (CD4), i może obejmować (i) hamowanie proteazy serynowej na powierzchni komórki i/lub (ii) hamowanie proteolizy innych kofaktorów, niezbędnych do wnikania wirusa.

Okazało się [56], że indywidualne różnice w działaniu WILPŚ na mnożenie HIV w zakażonych makrofagach nie wynikały z ewentualnych zmian inhibitora w skutek jego proteolizy czy utleniania zachodzących ewentualnie podczas jego izolacji i oczyszczania. Toteż te różnice należy tłumaczyć różną ekspresją genów dla białek wiążących WILPŚ na powierzchni komórki. Ale następna praca [57] wykazała, że dodatkową przyczyną różnic może być jednak jakość handlowego preparatu rekombinowanego WILPŚ.

Publikacja [58] z 2005 roku zaczęła cykl prac o możliwości leczenia raka płaskonabłonkowego głowy i szyi (HNSCC). W roku 2005 oceniano, że metody leczenia go są w dużej mierze niezadowolające, a pięcioletni wskaźnik przeżycia nie poprawił się w ciągu ostatnich dwóch dekad. Autorzy postanowili zastosować terapię genową przy użyciu transfekcji z zastosowaniem wektorów nie-wirusowych, a to LK z DNA [lipopleksy] lub/i kompleksy polimerów kationowych z DNA [polipleksy]. Inkubowano mysie komórki raka płaskonabłonkowego [SCC-7] z polikationowymi liposomami [Metafectene] – LK lub /i odczynnikami poliaminowymi [GeneJammer] GeneJammer-PP. Transfekcję monitorowano przy użyciu plazmidu ekspresyjnego lucyferazy, której poziom w lizatach był miarą transfekcji [choć też, gdy użyto plazmidu kodującego beta-galaktozydazę, to jej aktywność mogła być miarą transfekcji genu kinazy tymidynowej (HSV-tk)]. Inkubowano w obecności dużych stężeń płodowej surowicy bydłowej [co hamowało transfekcję, ale było nieuniknione, jako obecne ew. *in vivo* i korzystne *in vitro*, ponieważ zwiększa żywotność komórek. Cytotoksyczność, która tu była „pozytywna”, bo była miarą zniszczenia komórek nowotworowych, dochodziła po paru dniach do 60–100%, zarówno z plazmidami w LK jak i z PP. Potwierdza to możliwość użycia ich w terapii genowej nowotworów głowy i szyi. Praca [59] z 2006 roku potwierdza wyniki pracy poprzedniej.

Praca [60] potwierdza poprzednie dane dotyczące transfekcji komórek SCC-7 mysiego płaskonabłonkowego mięsaka przy pomocy LK [Mefactene] i układu poliaminowego [GeneJammer] – w obecności surowicy mysiej oraz płodowej surowicy bydłowej. Okazało się, że średnica liposomów i wymiary kompleksów nieliposomowych zmniejszały się w funkcji stężenia surowicy.

W pracy [61] z 2008 roku Krystyna zajęła się surwiwiną. Jest to białko z rodziny inhibitorów apoptozy – związane z transformacją nowotworową i ulegające nadekspresji podczas

rozwoju większości ludzkich nowotworów. Krystyna badała zarówno transfekcję przy użyciu promotora specyficznego dla ekspresji genu surwiwiny, jak i oznaczala poziom endogennej surwiwiny w różnych nienowotworowych i nowotworowych komórkach mysich i ludzkich. Transfekcję prowadzono przy pomocy lipopleksów zawierającym między innymi DNA [„model terapii genowej”]. Ekspresja surwiwiny przez komórki nienowotworowe, zdaniem autorki/ów, może być potrzebna do utrzymania ich zdolności do proliferacji. Poziom ekspresji genu reporterowego był wyższy przy użyciu promotora wirusa cytomegalii niż promotora genu surwiwiny. Ale użycie promotora z CMV nadal dawało nadzieję na ich stosowanie w terapii genowej. Istotnie doprowadziło to do znacznej poprawy transfekcji do komórek ludzkiego raka płaskonabłonkowego głowy i szyi. Okazało się [62], że można bardzo znacznie poprawić wydajność transfekcji genowej – i to nawet komórek bardzo opornych – dodając do plazmidów – z promotorem z CMV – ludzki rekombinowany czynnik wzrostu naskórka EGF [7-15-krotny wzrost] lub ludzką transferynę [7-krotny wzrost dla komórek HSC-3, ale tylko dwukrotny dla komórek H-413] – oczywiście wszystko połączone z kationowym polimerem w zawieszynie [lipopleks]. Prace [63 i 64] wykazały, że zdolne do fluorescencji lipopleksy były pobierane przez komórki płaskonabłonkowego raka jamy ustnej. Komórki H-357 dużo słabiej pobierały lipopleksy [i ich zawartość] niż komórki HSC-3 i KB. Okazało się, że w komórkach H-357 następuje „obróbka” lipopleksów – już po ich wnikięciu do komórek. Błona endosomów ulegała destabilizacji, DNA uciekało do cytoplazmy i... wnikało do jądra. Zostało to potwierdzone badaniem fluorescencji lizosomów i jąder komórek biorców.

Publikacja [65] weryfikowała hipotezę, że peptydy penetrujące przez błonę [jak HIV-Tat peptyd] oraz substancja wywołująca rozpad mikrotubul [winblastyna, cytotoksyczna] bardzo ułatwiają transfekcję, gdy są one składnikami lipopleksów. Okazało się, że lipopleksy kolokalizowały z lizosomami, ale znajdującymi się w rejonie przyjądrowym.

Kompleksy kationowych polimerów z DNA (polipleksy) są internalizowane przez kaweole, a nie przez pęcherzyki powleczone klatryną, jak w przypadku lipopleksów. Dlatego autorzy zbadali [66], czy polipleksy pośredniczą w wydajnym dostarczaniu genów do różnych ludzkich komórek OSCC. I rzeczywiście polipleksy [z polietylenoiminą – i metafektem] okazały się ponad 1000 razy efektywniejszym narzędziem transfekcji genów reporterowych niż lipopleksy.

A oto fragmenty wywiadu z profesorem Nejatem Duzgunesem z 2014 roku [67] m.in. na temat najciekawszych osiągnięć Jego Zespołu-podkreślające rolę Krystyny :

1 (...) „Po otrzymaniu w roku 1992 grantu moja koleżanka Krystyna Konopka (Pacific University) zaczęła wytwarzać plazmidy zdolne do ekspresji fragmentu toksyny błonicy A – pod kontrolą promotorów HIV – do komórek zakażonych wirusem HIV [odnośniki 37, 38 – i te, i następne- cytowane w mojej pracy – Wojciech Antoni Turski {WAT}]. Jednak szybko zdaliśmy sobie sprawę, jak niska jest wydajność transfekcji i jak toksyczne mogą być liposomy kationowe.”

2 [Nejat jako największe osiągnięcia zespołu przed 2014 r. uważa]: „wprowadzenie liposomów do komórek zakażonych wirusem HIV (z Dianą Flasher, Krystyną Konopką i Paulem Dazinem

[31,32]; hamowanie zakaźności HIV przez ujemnie naładowane liposomy (z Chuckiem Larsenem i Krystyną Konopką) [36,39]; hamująca aktywność terapii genowej z promotorem wirusa cytomegalii CMV (z Krystyną Konopką) [47,48]”.

Praca Konopki i Goślińskiego z 2007 roku [68] rozpoczyna cykl prac na temat zastosowań PDT w stomatologii i onkologii. Praca ta rozpoczyna wszczętą przez Krystynę współpracę School of Medicine w Pacific University z uczelniami w Poznaniu [Uniwersytet Medyczny i Politechnika], które zaowocowały szeregiem doktoratów i habilitacji w Polsce [Gośliński, Piskorz, Kryjewski, Bobkowska, Mielcarek, Gdaniec i inni]. Wszystkim tym osobom z Polski Krystyna patronowała, przyjmowała ich w swoim domu w San Bruno, pomagała w pracy, bardzo często inicjowała ich przyjazd do Kalifornii.

Terapia fotodynamiczna (PDT) [67,68], znana również jako terapia fotopromieniowaniem, fototerapia lub fotokemioterapia, polega na zastosowaniu fotoaktywnego barwnika (fotouczulacza), który jest aktywowany przez wystawienie na działanie światła o określonej długości fali w obecności tlenu. Przeniesienie energii z aktywowanego fotosensybilizatora do dostępnego tlenu powoduje powstawanie toksycznych form tlenu, takich jak tlen singletowy i wolne rodniki. Te bardzo reaktywne związki chemiczne mogą uszkadzać białka, lipidy, kwasy nukleinowe i inne składniki komórkowe. Zastosowania PDT w stomatologii szybko rosną: leczenie raka jamy ustnej, terapie infekcji bakteryjnych i grzybiczych oraz diagnostyka fotodynamiczna (PDD) złośliwej transformacji zmian w jamie ustnej. PDT wykazuje potencjał w leczeniu leukoplakii jamy ustnej [tzw. rogowacenie białe, zmiana przednowotworowa], liszaja płaskiego jamy ustnej oraz raka głowy i szyi (też [70]).

Fotodynamiczna chemioterapia przeciwdrobnoustrojowa (PACT) jest skuteczna w leczeniu infekcji bakteryjnych, grzybiczych, pasożytniczych i wirusowych. Brak genotoksycznego i mutagennego działania PDT jest ważnym czynnikiem długoterminowego bezpieczeństwa podczas leczenia. PDT reprezentuje również nowe podejście terapeutyczne w leczeniu biofilmów jamy ustnej. Zakłócenie struktury płytki nazębnej ma ważne konsekwencje dla homeostazy w biofilmie. Badania prowadzą obecnie do selektywnych fotouczulaczy, ponieważ zabicie całej flory naraża pacjentów na infekcje oportunistyczne.

Praca Goślińskiego i Konopki została opublikowana w Polsce w „Postęпах Mikrobiologii” [69]. Omówiono w niej niektóre z istotnych perspektywnych zastosowań klinicznych terapii fotodynamicznej, w tym w stomatologii. PDT polega na zastosowaniu fotouczulacza, który jest aktywowany przez oświetlenie w obecności tlenu. Ekspozycja fotosensybilizatora na światło powoduje powstawanie toksycznych form tlenu, powodujących miejscowe fotouszkodzenia i śmierć komórki. Gośliński, Konopka i wsp. [69] bliżej charakteryzują PDT, zabieg medyczny, który wykorzystuje światło do aktywacji czynnika fotouczulającego (fotouczulacza) w obecności tlenu. Większą uwagę zwraca się również na fotodynamiczną chemioterapię przeciwdrobnoustrojową (PACT), która może stanowić alternatywę leczenia organizmów lekoopornych. PACT jest skuteczny w leczeniu infekcji bakteryjnych, grzybiczych, pasożytniczych i wirusowych. Rozwój oporności na PACT

wyduje się mało prawdopodobny, ponieważ w komórkach drobnoustrojów tlen singletowy i wolne rodniki oddziałują z kilkoma strukturami komórkowymi i różnymi szlakami metabolicznymi. PACT jest równie skuteczny wobec bakterii opornych na antybiotyki, jak i podatnych na antybiotyki, a wielokrotne fotouczulanie nie wywołało selekcji szczepów opornych. Bakterie rozwijające się w biofilmach, związane z chorobami takimi jak mukowiscydoza (*Pseudomonas aeruginosa*) lub zapalenie przyzębia (*Porphyromonas gingivalis*), są również podatne na PDT. Opracowanie nowych fotouczulaczy i bardziej wydajnych systemów dostarczania światła oraz dalsze badania na zwierzętach są niezbędne do ustalenia optymalnych parametrów leczenia dla PACT przed przystąpieniem do badań klinicznych i ewentualnym zastosowaniem.

Oprócz stosowania terapii fotodynamicznej w pracach Krystyny [i jej zespołu] często pojawiają się dwa inne elementy związane ze stanem jamy ustnej, głównie przyzębia, a mianowicie grzybice [a ściślej zakażenie drożdżakami *Candida albicans* i *Candida glabrata*] oraz zakażenie bakteriami *Porphyromonas gingivalis*, będące istotną przyczyną powstawania przyzębicy. Czasami w pracach Krystyny mamy „nałożenie się” tych trzech zagadnień-dodatkowo splecione z zastosowaniem liposomów.

W pracy [71] badano przywieranie drożdżaków do powierzchni błony śluzowej, które jest uważane za pierwszy krok w patogenezie kandydozy jamy ustnej. Zbadano wpływ polienów przeciwgrzybiczych, amfoterycyny B, nystatyny i natamycyny w subletalnych i minimalnych stężeniach hamujących (MIC) na przyleganie *Candida albicans* i *Candida glabrata* do komórek raka szyjki macicy HeLa i raka płaskonabłonkowego jamy ustnej HSC-3. Komórki albo inkubowano z *Candida* w obecności leku, albo wstępnie inkubowano z drożdżami i następnie eksponowano na lek. Cztery szczepy *Candida* wyizolowano od pacjentów z udokumentowanym zapaleniem jamy ustnej. Przyleganie badanych szczepów *Candida* było znacznie zmniejszone, gdy badane polieny były obecne już podczas „fazy przylegania”. Sugeruje to, że subterapeutyczne poziomy polienów, które prawdopodobnie utrzymują się w jamie ustnej po leczeniu miejscowym, mogą modulować kolonizację drożdżakową, gdy są obecne w „fazie przylegania”. Natomiast – co jest bardzo istotne – użyte środki przeciwgrzybicze nie powodowały odklejenia drożdżaków od powierzchni komórek.

Kontynuacja wymienionej publikacji to cztery lata później – z 2007 roku – praca [72]. Celem badania było określenie wrażliwości „izolatów” *Candida* uzyskanych od pacjentów ze związanym z *Candida* zapaleniem jamy ustnej na 4 leki przeciwgrzybicze. Zidentyfikowano łącznie 120 szczepów *Candida*. Amfoterycyna B, 5-fluorocytozyna, flukonazol i itrakonazol były skuteczne odpowiednio wobec 100%, 98,6%, 88,7% i 87,3% *C. albicans* oraz 79,6%, 77,6%, 71,4% i 79,6% innych szczepów *Candida*.

Celem pracy [73] było ustalenie, czy prostaglandyna E(2) (PGE(2)) w płynie dziąsłowym (GCF) może stanowić czynnik ryzyka zapalenia przyzębia u pacjentów zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV(+)). Pomiary kliniczne, w tym ustalenie poziomu wskaźnika dziąsłowego (GI), wskaźnika płytki nazębnej, wskaźnika krwawienia, utraty przyzycz-

pu (AL) i badanie próbki płynu dziąsłowego [GCF] wykonano z dwóch zdrowych miejsc, trzech miejsc zapalenia dziąseł i trzech miejsc zapalenia przyzębia. Średnie ilości PGE(2) były znacząco wyższe w miejscach zapalenia dziąseł i przyzębia niż w miejscach zdrowych ( $p < 0,0001$ ). Poziomy PGE(2) w GCF były istotnie skorelowane z utratą przyzęcia, ilością komórek CD4(+), wiramią, wiekiem i „paczkolatami” palenia papierosów na początku badania i po 6 miesiącach ( $0,001 < p < 0,05$ ).

Celem pracy [74] było zbadanie związku między transformującym czynnikiem wzrostu beta 1 (TGF-beta1) w płynie dziąsłowym (GCF), a stanem przyzębia osób, u których wykryto wirusa ludzkiego niedoboru odporności (HIV-1). Poziomy TGF-beta1 w płynie dziąsłowym określono przy pomocy testów immunoenzymatycznych. Średnie ilości GCF TGF-beta1 były większe w miejscach zapalenia dziąseł i przyzębia niż w miejscach zdrowych ( $p < 0,0001$ ). Analiza wielokrotnych pomiarów 18 miejsc aktywnych, w porównaniu do 182 miejsc nieaktywnych wykazała, że poziomy GCF TGF-beta1 były wyższe w miejscach aktywnych niż w miejscach nieaktywnych ( $p < 0,0001$ ). U osobników, którzy są HIV-1(+), miejsca z wysokimi poziomami GCF TGF-beta1 mają znacznie większe ryzyko progresji zapalenia przyzębia.

Następne prace to cykl badań nad wpływem bakterii *Porphyromonas gingivalis* [Pg] na wydzielanie cytokin przez zróżnicowane makrofagopodobne komórki THP-1 [75-78] po ekspozycji na żywą i zabita termicznie Pg i LPS-[endotoksynę *E. coli*]. Praca [75] poświęcona była wpływowi Pg na wydzielanie interleukiny-18 [IL-18]. Interleukina-18 jest cytokiną prozapalną, która odgrywa zasadniczą rolę w odpowiedzi komórek T i jest podwyższona w chorobach zapalnych, takich jak choroba przyzębia. Pg jest jednym z najważniejszych patogenów bakteryjnych biorących udział w patogenezie przewlekłego zapalenia przyzębia. Komórki THP-1 zróżnicowano z 12-mirystrynianem 13-octanem forbolu (PMA) przez 5 dni w 37°C. Pg hodowane na pożywce z siekanego mięsa w warunkach beztlenowych dodano do zróżnicowanych komórek THP-1 w stosunku 2-100 bakterii/komórkę i inkubowano w 37°C przez 24 godziny. IL-18 oznaczono metodą ELISA. Praca udowodniła, że Pg [ale też – choć słabiej – LPS *E. coli*] istotnie zwiększał wydzielanie IL-18 przez zróżnicowane komórki makrofagopodobne THP-1.

Praca [76] badała wpływ Pg na wydzielanie IL-8. Pg przylega, atakuje i replikuje w ludzkich komórkach nabłonka jamy ustnej. Prozapalna cytokina IL-8 jest silnym chemoatraktantem indukującym napływ neutrofilów do zaatakowanego przyzębia. Określano poziom IL-8 wydzielanej przez ludzkie komórki płaskonabłonkowe jamy ustnej HSC-3 po ekspozycji na żywą i inaktywowaną termicznie Pg oraz na lipopolisacharyd (LPS) *E. coli*. Analiza wykazała stymulację wydzielania IL-6 i IL-8. Na wydzielanie IL-8 wpływała liczba i zabijanie ciepłem bakterii oraz czas inkubacji. Pg indukował znaczące wydzielanie IL-8 przez komórki HSC-3. Częściowa degradacja IL-8 przez proteiny cysteinowe (gingipainy) wytwarzane przez żywą Pg może być odpowiedzialna za wyższą regulację w górę IL-8 obserwowaną w przypadku bakterii zabitych termicznie.

Publikacja [77] zajmuje się wyżej opisywanym zjawiskiem dla interleukiny-6 (IL-6). IL-6 stymuluje wydzielanie immunoglobulin i odgrywa ważną rolę w regulacji odpowiedzi immu-

nologicznej na patogeny przyzębia. Ponieważ IL-6 promuje osteoklastogenezę i indukuje resorpcję kości, nadmierne wydzielanie IL-6 w odpowiedzi na Pg może odgrywać rolę w indukowaniu utraty kości wyrostka zębodołowego. Toteż celem badania było porównanie odpowiedzi IL-6 trzech ludzkich linii komórek nabłonka jamy ustnej na zjadliwe i niezjadliwe szczepy. Użyto dwa szczepy Pg, awirulentny 2561 i wysoce wirulentny W83 [hodowane na płytkach agarowych z krwią]. Ekspozycja komórek HSC-3 i GSM-K na Pg-2561 i Pg-W83 przez 24 h spowodowała odpowiednio 6- i 8-krotny wzrost wydzielania IL-6. W komórkach H413 Pg-2561 obniżył poziom IL-6 o 30%, podczas gdy Pg-W83 obniżył poziom IL-6 tylko o 50%. Ilość IL-6 wydzielanej przez niezainfekowane komórki silnie zależała od typu komórki. Oba szczepy Pg indukowały wydzielanie IL-6 na podobnym poziomie w komórkach HSC-3 i GSM-K.

Praca [78] jest kontynuacją pracy [75]. Zbadano, czy Pg wpływa na wydzielanie prozapalnej cytokiny interleukiny-18 (IL-18) w komórkach makrofago-podobnych THP-1 oraz w monocytowych komórkach THP-1 w zawiesinie. Inaktywacja cieplna Pg znacznie zmniejszyła stymulację IL-18. Żywe Pg wywoływały efekt cytotoksyczny, który został znacznie zmniejszony przez inaktywację termiczną.

Praca [79] badała wpływ środków przeciwwgrzybiczych, ale i histatyny-5 na biofilmy *Candida albicans*. Protezowe zapalenie jamy ustnej związane z *Candida* ma wysoki wskaźnik nawrotów. Biofilmy *Candida* powstające na akrylu protez są bardziej odporne na działanie środków przeciwwgrzybiczych niż drożdżaki w hodowli. Histatyny, rodzina podstawowych peptydów wydzielanych przez główne gruczoły ślinowe człowieka, zwłaszcza histatyna 5, mają silne właściwości przeciwwgrzybicze. Zbadano [79] przeciwwgrzybicze działanie histatyny 5 na *Candida* w hodowli lub biofilm *Candida albicans* i *Candida glabrata*.

Histatyny [80] to białka odkryte w ślinie, które mają działanie obronne przed patogenami. Są stosowane jako leki przeciwwgrzybicze, a od innych odróżniają się niską toksycznością. Ich mechanizm działania opiera się na agregacji w błonie komórkowej i błonie mitochondrium. Potrafią także generować reaktywne formy tlenu. Histatyny hamują także aktywność (LPS), który odpowiada za zlepianie się komórek bakterii gram-ujemnych.

Biofilmy otrzymywano [79] na krążkach z poli(metakrylanu metylu) zanurzonych w zawiesinach komórek *C. albicans*. Płytkę inkubowano przez 90 min w 37°C (faza przylegania). Po usunięciu nieprzylegających komórek, krążki zanurzono w pożywce z glukozą i inkubowano przez 48 godzin w 37°C (faza tworzenia biofilmu). Środki przeciwwgrzybicze były obecne albo podczas tworzenia biofilmu, albo dodane już po utworzeniu biofilmu. Okazało się, że flukonazol, inhibitor syntezy ergosterolu, był skuteczniejszy podczas tworzenia biofilmu, najprawdopodobniej dlatego, że proliferacja grzybów jest zależna od syntezy błony komórkowej. Natomiast polieni były skuteczne dopiero po utworzeniu biofilmu, ponieważ niszczą już zsyntetyzowane błony komórkowe. Histatyna może również wpływać na biofilm *Candida* poprzez internalizację i działanie w kierunku „zubożenia” ATP [np. działanie rozprężające].

Praca [81] łączy dwie linie badawcze: badanie biofilmów [z protez zębowych] i stosowanie...liposomów. Biofilmy *Candida* o zmniejszonej wrażliwości na konwencjonalne leki przeciwwgrzybicze są wrażliwe na lipidowe preparaty amfoterycyny B (AMB). Zbadano wpływ liposomalnego preparatu AMB, AmBisome i wolnego AMB na przyleganie *C. albicans* do komórek raka szyjki macicy HeLa i komórek raka płaskonabłonkowego jamy ustnej HSC-3. Komórki HeLa i HSC-3 inkubowano z trzema doustnymi izolatami *C. albicans* albo w obecności AmBisome lub AMB, albo wstępnie inkubowano z drożdżami, a następnie eksponowano na lek. AmBisome hamował przywieranie drożdżaków, gdy był obecny podczas „fazy przylegania”, ale nie powodował odłączania drożdżaków związanych z komórkami. Przyleganie drożdżaków do komórek nabłonka jest znacznie zmniejszone, gdy polieni przeciwwgrzybicze są obecne w „fazie przylegania”.

Praca [82] wskazuje, że histatyna-5 wykazuje działanie przeciwwgrzybicze wobec biofilmów *C. albicans* i *C. glabrata* wytworzonych na akrylu protez dentystycznych. *C. glabrata* jest znacznie mniej wrażliwa na histatynę-5 niż *C. albicans*. Autorzy zbadali, czy zmienność wynika z wewnątrzkomórkowego losu lipopleksów. W komórkach odpornych na transfekcję etapem ograniczającym skuteczność wydaje się być „obróbka” lipopleksu prawdopodobnie obejmująca ucieczkę DNA do cytoplazmy i transport do jądra.

Praca [83] badała związki między kandydozą [drożdżakowicą – grzybicą], cukrzycą typu 2 i poziomem białka reaktywnego C [CRP]. Zapalenie jamy ustnej związane z *Candida* (CaDS) jest częstą chorobą u osób noszących protezy całkowite z cukrzycą typu 2 (T2DM). Białko C-reaktywne, reagent ostrej fazy, jest czułym markerem stanu zapalnego związanego z cukrzycą. Pacjenci z T2DM mieli istotnie podwyższone średnie poziomy CRP w porównaniu do pacjentów z prawidłowym metabolizmem glukozy. Stwierdzono dodatnią korelację między stężeniem CRP, a glikemią na czczo wyniki sugerują, że stężenia CRP mogą być wykorzystywane jako niespecyficzny wskaźnik trwającego stanu zapalnego u pacjentów z T2DM.

Praca [84] badała terapię fotodynamiczną i parametry fotofizyczne dwóch nowo zsyntetyzowanych ftalocyanin cynku (II) zawierających podstawniki estrowo-alkiloksyłowe (Pc-4 i Pc-5) [zsyntetyzowane w dwuetapowej procedurze, z 2,3-dicyjanohydrochinonu]. Oba sensybilizatory wykazują obiecujące właściwości fotofizyczne, w tym jakościową ocenę emisji, agregacji i wytwarzania tlenu singletowego. Wykazano, że aktywność fotodynamiczna badanych związków zależy od poziomu tlenu cząsteczkowego. Stwierdzono, że fotodekompozycja Pc-4 i Pc-5 w roztworach DMSO przebiega zgodnie z kinetyczną reakcją pierwszego rzędu w dwóch etapach. Na skuteczność Pc-4 w fotozabijaniu hodowanych komórek wpływa hydrofobowość i stan agregacji fotouczulacza.

Praca [85] poświęcona była nowym fluoropochodnym porfirazyny zawierającym podstawniki fluoroalkilolii i dietertio. Dwie porfirazyny poddano pomiarom wytwarzania tlenu singletowego przy użyciu 1,3-difenyloizobenzofuranu jako wychwytywacza tlenu singletowego i zbadano *in vitro* komórki raka jamy ustnej. Badania biologiczne przeprowadzone na dwóch ludzkich liniach komórkowych raka płaskonabłonko-



wego wywodzącego się z języka (HSC-3) i błony śluzowej policzka (H413) wykazały umiarkowaną aktywność i selektywność nowej porfirazy magnezu(II) posiadającej obwodowe podstawniki 4-fluorobutyliotio.

Praca [86] to praktycznie ostatnia praca Krystyny przed jej przejściem na „oficjalną emeryturę”. Nawiązuje ona do głównej strategii badań zespołu Nejata i Krystyny nad HIV. Idealna terapia zakażenia wirusem HIV wymaga metody eliminacji wszystkich komórek „będących potencjalnymi nosicielami” wirusa HIV u osoby zakażonej. Autorzy opracowali promotor specyficzny dla wirusa HIV, aby sterować ekspresją genów „samobójczych”, które indukują śmierć komórki w szczególności w komórkach zakażonych wirusem HIV. Ten promotor jest 100-krotnie bardziej wrażliwy na aktywator transkrypcji HIV, Tat, niż komórkowe czynniki transkrypcyjne [stosując plazmid ekspresyjny lucyferazy pod kontrolą zmutowanego promotora LTR].

#### PRACE Z LAT 2013–2021 [TZN. NA JEJ EMERYTURZE] [87–98] [OD 2013 DO ŚMIERCI W 2021]

Krystyna przeszła na „formalną” emeryturę w jesieni 2012 roku [mając lat 74]. Ale nadal pracowała naukowo [nie mówiąc już o chodzeniu po górach]. Do samej śmierci była na etacie tzw. *adjunct professor* w Department of Biomedical Sciences, University of the Pacific, School of Dentistry, San Francisco.

Już w 1994 roku zaczęły się dużo częstsze, niż dotąd bliskie kontakty z Jej wielką miłością, Andrzejem Sławińskim [zwanym Negro], doktorem geologii, którego poznała w 1959 roku w Tatrach, gdzie był Jej pierwszym instruktorem wspinaczki. W 1994 r. Andrzej znalazł się z żoną i synem w Kanadzie w Calgary. Dość często się spotykali z Krystyną, a to w Kalifornii, a to w Kanadzie. W 2009 roku po długiej chorobie zmarła żona Andrzeja. Krystyna coraz więcej czasu spędzała w Calgary. Postanowili się pobrać. Ślub wzięli 25 lipca 2014 roku w Canmore, w Kanadyjskich Górach Skalistych. *Nota bene* ślubu udzieliła im stara Indianka [burmistrz], która [zbieg okoliczności] dzień przedtem informowała ich, jak dojechać do miasteczka [z opowieści Krystyny i Andrzeja].

A teraz fragmenty ze „świeżych” wspomnień Andrzeja: „*We wrześniu 2020, już w czasie pandemii Covid, przyleciała do Calgary, gdzie razem odbyliśmy kwarantannę. Niestety następnego roku przyniósł zdiagnozowanie raka trzustki, skomplikowaną operację i ciężkie zmagania z chorobą, z którą nie można było wygrać. Krystyna, tak jak w życiu, była twarda i nieustępliwa w chorobie, miała jasny umysł i do końca była sobą... A teraz pozostały już tylko wspomnienia.*”

W pracy [87] badano fotodynamiczną aktywność fotouczulacza TMP-1363 na bazie porfiryny wobec biofilmów *Candida*, tworzonych na akrylowych krążkach protez, w nieobecności i obecności azolowego środka przeciwwrzybiczego, mikonazolu. Wpływ TMP-PDT ± mikonazol na biofilmy *Candida* określono dla czterech izolatów klinicznych: *C. albicans* 6122/06, *C. tropicalis* 8122/06, *C. parapsilosis* 11375/06 i *C. glabrata* 7531/66. Promieniowanie podczerwone zostało zminimalizowane przy użyciu 1 cm filtra wodnego. Mikonazol zwiększał wrażliwość biofilmów *Candida* na aktywność fotodynamiczną fotouczulacza TMP-1363 opartego na porfirynach.

Publikacja [88] badała właściwości fotochemiczne i aktywność fotodynamiczną trzech porfirazyn (Pzs) zawierających pierścienie diazepinowe. Porfirazy oceniano pod kątem ich elektronowej absorpcji i emisji, skłonności do agregacji i fotodegradacji oraz sprawności generowania tlenu singletowego. Aktywność fotodynamiczną porfirazy *in vitro* i ich preparatów/kompleksów liposomalnych zbadano przy użyciu dwóch linii komórkowych raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Tribenzodiazepinoporfirazy magnezowa(II) (1) wykazała najwyższy efekt fototoksyczny w obu zastosowanych liniach komórkowych, H413 i HSC-3. Zamknięcie Pz 1 w liposomach [z L- $\alpha$ -fosfatydylo-d,l-glicerolo:1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny] spowodowało prawie trzykrotny wzrost fotocytotoksyczności w porównaniu z roztworem Pz 1 (wartości IC50 odpowiednio 45 i 129 nM).

W pracy [89] badano fotouczulacze porfiryńoidowe, które są wysoce lipofilne i są zwykle podawane w liposomach, aby ułatwić ich skuteczne dostarczenie do komórek docelowych. Kilka związków było wysoce fototoksycznych dla komórek raka jamy ustnej, zarówno w postaci wolnej, jak i zamkniętej w liposomach, z nanomolarnymi wartościami IC50. Najniższe wartości IC50 (7–13 nM) otrzymano dla PS zamkniętego w liposomach kationowych.

Praca [90] wykazała, że inkubacja komórek nabłonkowych jamy ustnej z Pg stymuluje wydzielanie interleukiny 8 i interleukiny 6.

Samobójcza terapia genowa raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (OSCC) może być realnym podejściem do leczenia tego raka. Jednak ludzkie komórki OSCC są stosunkowo odporne na wydajną transfekcję wektorami niewirusowymi. Aby zidentyfikować optymalny wektor do dostarczenia genów, porównano aktywność i wydajność transfekcji Glycofect, Metafectene, Metafectene Pro, Metafectene Easy i FuGENE HD, stosując linię komórkową OSCC, HSC-3 i linię komórkową raka szyjki macicy, HeLa [91]. Metafectene Easy i FuGENE HD pośredniczyły w najwyższej aktywności transfekcyjnej (mierzonej jako ekspresja lucyferazy) i wydajności (mierzonej jako procent komórek transfekowanych  $\beta$ -galaktozydazą). Wektory te zastosowano do dostarczenia plazmidu kodującego kinazę tymidynową wirusa opryszczki pospolitej, a następnie potraktowano gancyklowirem. Do dnia 9 żywotność komórek HeLa wynosiła 22±3% kontroli z FuGENE HD i 26±3% z Metafectene Easy. Żywotność komórek HSC-3 wynosiła 42±25% z FuGENE HD i 58±28% z Metafectene Easy. Zmniejszenie żywotności było statystycznie istotne w obu przypadkach ( $p < 0,005$ ; średnia z 3 niezależnych eksperymentów), chociaż istniała znaczna zmienność między eksperymentami z komórkami HSC-3.

Transfekcja komórek HeLa za pomocą TransfeX wykazała najwyższą aktywność transfekcyjną [92] – była prawie 5-krotnie wyższa niż uzyskana za pomocą TransIT-LT1. W komórkach HSC-3 wydajność transfekcji TransfeX była 29 razy wyższa niż TransIT-LT1. Bardzo wysokie poziomy aktywności lucyferazy uzyskano w komórkach H357 z TransfeX. TransfeX prawdopodobnie będzie korzystny w różnych podejściach do terapii genowej raka i innych terapiach genowych obejmujących wektory nie wirusowe.

Indukowana kinazą tymidynową/gancyklowirem (HSV-tk/GCV) terapia genami samobójczymi wirusa opryszczki pospolitej jest stosowana do skutecznego leczenia różnych nowotworów [93]. Transfekcja z promotorem z CMV [lucyferazy] Luc za pośrednictwem TransfeX do raka szyjki macicy HeLa oraz linii komórkowych raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (OSCC) HSC-3, FaDu i H357 w obecności 10% surowicy okazała się bardzo skuteczna, przy niskiej nieswoistej cytotoksyczności. Plazmid pNGVL1-tk kodujący HSV-tk pod kontrolą promotora CMV dostarczono do komórek *in vitro* przez nowy kationowy odczynnik liposomalny, TransfeX, a następnie potraktowano gancyklowirem. Okazało się, że terapia genowa [„samobójcza”] jest najskuteczniejsza przeciwko HSC-3 OSCC. Episomalne systemy wektorów mogą potencjalnie zapobiegać tym niepożądanym skutkom ubocznym, ponieważ zachowują się one jak oddzielne elementy pozachromosomalne w jądrze komórki docelowej [94]. Rak szyjki macicy jest trzecią najczęstszą przyczyną raka u kobiet. Przeżycie 5-letnie w raku płaskonabłonkowym części ustnej gardła wynosi około 50% i nie uległo poprawie w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat [95]. Zbadano zdolność TransfeX, do dostarczania genu samobójczego HSV-tk do komórek raka szyjki macicy i jamy ustnej oraz indukowania cytotoksyczności po podaniu proleku, gancyklowiru. Około 5-krotnie wyższą ekspresję transgenu uzyskano z plazmidem EEV [koński wirus zapalenia mózgu i rdzenia] niż z plazmidem CMV. Jednak żywotność komórek HeLa po leczeniu genem samobójczym [+ gancyklowirem] była zmniejszona tylko o 35% w porównaniu do 70% w przypadku plazmidu CMV. Tak więc poziomy ekspresji transgenu nie przekładają się jednak bezpośrednio na cytotoksyczność. Praca [96] potwierdziła wyniki pracy poprzedniej, co wskazywałoby na wysoką efektywność stosowania liposomów kationowych [TransfeX] w „samobójczej” terapii genowej [STG].

Praca [97] stanowi przegląd możliwości wykorzystania STG do zabijania zakażonych komórek, wycinania zintegrowanego z chromosomem DNA HIV-1 i kierowania cytotoksycznych liposomów do komórek zakażonych HIV-1. Podkreśla, że wcześniejsze prognozy dotyczące potencjalnej eliminacji rezerwuaru komórkowego wirusa HIV-1 u zakażonych osób były zbyt optymistyczne.

Bardzo istotna jest praca przeglądowa o peptydach hamujących fuzję wirusów z błoną komórki docelowej – w tym również wirusa SARS CoV-2 [98] – z roku 2020. Wirusy z otoczką lipidową, w tym HIV-1 i SARS-CoV-2, infekują swoje komórki gospodarza przez fuzję bezpośrednio z błoną plazmatyczną lub błoną endosomową po endocytozie. Biofizyczny wgląd w zmiany konformacyjne wirusowych białek fuzyjnych doprowadził do opracowania peptydowych inhibitorów tych zmian, a tym samym fuzji błonowej.

Peptyd T-20 (enfuwirtyd) hamuje fuzję komórek HIV-1 i jest stosowany klinicznie. Peptyd C34 sprzężony z cholesterolem ma IC50 dla hamowania zakaźności HIV-1 wynoszące 4 pM, znacznie niższe niż w przypadku zwykłego C34 i T-20. Peptyd (P155-185-chol) odpowiadający segmentowi struktury po fuzji hemaglutyniny wirusa grypy, również sprzężony z cholesterolem, hamuje infekcję podtypem A/H3N2 z IC50 0,4 μM. Myrcludex B, mirystoilowany lipopeptyd, hamuje wnikanie wirusa zapalenia wątroby typu B i wirusa zapale-

nia wątroby typu D do hepatocytów z IC50 wynoszącym 80 pM. Peptydy dimeryczne (HRC2 i HRX4) pochodzące z białka F wirusa odry i sprzężone z cholesterolem hamują zakażenie wirusem odry przy wartościach IC50 mniejszych niż 1 nM do 2 nM. Peptydy pochodzące z białka E wirusa japońskiego zapalenia mózgu hamują infekcję przy nanomolarnych wartościach IC50.

Pandemia COVID-19 zainicjowała liczne badania mające na celu zaprojektowanie peptydowych inhibitorów fuzji błonowej SARS-CoV-2 za pośrednictwem białek kolców. Sprzężenie kotwicy/tratwy lipidowej bogatej w cholesterol, z niektórymi z tych peptydów wzmacnia działanie przeciwwirusowe peptydów, obniżając IC50 do niskich stężeń nanomolowych. Jest bardzo prawdopodobne, że peptydy przeciwko SARS-CoV-2 zostaną wkrótce ocenione w badaniach klinicznych. I tak doszliśmy do ostatniej opublikowanej pracy Krystyny [Duzgunes, Fernandez-Fuentes, Konopka] [99] – na miesiąc przed śmiercią Krystyny. Fuzja wirusów z otoczką lipidową z komórkową błoną plazmatyczną lub błoną endosomu odbywa się za pośrednictwem białek otoczki wirusa, które ulegają dużym zmianom konformacyjnym po związaniu z receptorami. Białko fuzyjne HIV-1 gp41 ulega przekształceniu w „wiązkę sześciu helis” po związaniu powierzchniowego białka gp120 z receptorem CD4 i koreceptorem. Peptydy syntetyczne, które „naśladują” część tej struktury, zakłócają tworzenie struktury helisy i hamują fuzję błon. Podobną sytuację obserwujemy również z białkiem S kolców [„spike protein”] wirusa SARS-CoV-2. W pracy [99] dokonano przeglądu peptydowych inhibitorów fuzji błon biorących udział w infekcji wirusem grypy, koronawirusami, HIV-1, MERS i SARS, wirusami zapalenia wątroby, paramyksowirusami, flawowirusami, herpeswirusami i filowirusami. Opisano również najnowsze metody obliczeniowe stosowane do identyfikacji sekwencji peptydowych, które mogą silnie oddziaływać z białkami wirusów i białkami „okolice ich receptorów”, ze szczególnym uwzględnieniem SARS-CoV-2, wykorzystując bazę danych PePI-Covid19.

Ostatnia praca, a właściwie dwie ostatnie [98 i 99] są swoim podsumowaniem całej drogi badawczej Krystyny, ale i wyrazem jej [i Nejata Duzgunesa] poglądów na temat zakażenia wirusem, i dalszego rozwoju – wynikających z tego – schorzeń, nie tylko HiV [i nie tylko RNA wirusów], ale i ostatniej ponad dwuletniej pandemii Covid19. W omawianym przeze mnie wcześniej wywiadzie Duzgunesa [67] dominowało planowanie/dążenie do opracowania metod zniszczenia wszystkich komórek zakażonych HIV [tzn. mających DNA – komplementarny do RNA wirusa zintegrowany w chromosomach gospodarza]. Akurat z SARSCoV-2 nie ma tego problemu, ale .... jest inny [a dotyczący wszystkich wirusów]. Jest nim dylemat: czy ograniczyć się do hamowania „wczesnej” translacji wirusowego RNA [a w konsekwencji powielania/duplikacji wirusowego RNA i późnej translacji, ergo montażu nowych wirusów i ich egzocytozy]? Czy może lepiej/alternatywnie: nie dopuszczać do wnikania genomu wirusa [tu RNA] poprzez hamowanie fuzji otoczki lipidowej wirusa z błoną komórkową komórek docelowych? Czyli w istocie z całą okolicą „funkcjonalnego receptora” wirusa [a więc w przypadku SARSCoV-2 nie tylko ACE2 błonowym, ale i enzymami torującymi – jak TRPSS- i ew. koreceptorami, ale i „mikrośrodowiskiem błonowym”, w tym szczególnie bogatymi w cholesterol i sfingolipidy rafts [tratwy/kotwice]. I tu pamiętam, co Krystyna

już ponad 15 lat temu mówiła [do mnie, w Polsce] „gdyby koncerny farmaceutyczne bardziej zajęły się pracami nad hamowaniem fuzji wirusa/jego wnikania do komórek docelowych – przez wpływ na „okolicę receptora” – zamiast działań nad hamowaniem powielania się RNA wirusa – to już dawno nie było by problemu AIDS, a szerzej chorób wywołanych przez wirusy”.

Te poglądy Krystyny, które konsekwentnie zaprezentowała w dwóch ostatnich w życiu publikacjach, zainspirowały mnie. Znalazło to wyraz w mojej publikacji [niestety nie w topowym czasopiśmie; trudno!, wszak obserwujemy istną powódź prac na temat pandemii] o tym, że zakazić się może praktycznie tylko osoba mająca funkcjonalne jego receptory [100].

Niestety nie ma już Krystyny. Szkoda, bo jej wnikliwość, pracowitość i twórcza osobowość bardzo by się przydały w wyjaśnianiu szeregu zagadek związanych z pandemią Covid-19 i z innymi pandemiemi, które mogą się w przyszłości pojawić ponownie.

## PIŚMIENNICTWO

1. Konopka K, Gross-Bellard M, Turski W (1972) The influence of detergents on the activity of 5'-nucleotidase /EC3.1.3.5/ in rat liver homogenates. *Enzyme*(Basel) 13:269-277
2. Konopka K, Turski W (1974) Studies on the stability of rat liver D-glucose-6-phosphate phosphohydrolase /EC 3.1.3.9/. *Enzyme* (Basel) 18:206-217
3. Turski W, Turska E, Konopka K, Szuklarczyk J, Filipowicz B (1972) Różne sposoby otrzymywania i oczyszczania frakcji mitochondrialnej z homogenatu wątroby szczura. *Ann Acad Med Lodzensis* 13:83-95
4. Turska E, Konopka K, Turski W (1977) The effect of chloramphenicol and cycloheximide on the activity of enzymes „markers” of mitochondrial substructures of the rat liver. *Acta Biol Med Germanica* 36(9): 1231-1236
5. Konopka K, Turski W, Turska E, Szuklarczyk J (1974) Studies on the ribosomal fraction from rat liver mitochondria. 9th FEBS Meeting, Budapeszt, Abstracts, p.285
6. Konopka K (1978) Differential effects of metal-binding agents on the uptake of iron from transferrin by isolated rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 92(2): 308-12
7. Konopka K, Turska E (1979) Submitochondrial localization of transferrin and iron accumulated by isolated rat liver mitochondria, *FEBS Lett* 105(1): 85-89
8. Konopka K, Romslo I (1980) Uptake of iron from transferrin by isolated rat-liver mitochondria mediated by phosphate compounds. *Eur J Biochem* 107(2): 433-99
9. Konopka K, Romslo I (1981) Studies on the mechanism of pyrophosphate-mediated uptake of iron from transferrin by isolated rat-liver mitochondria. *Eur J Biochem* 117(2): 239-44
10. Konopka K, Mareschal JC, Crichton RR (1980) Iron transfer from transferrin to ferritin mediated by pyrophosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 96(3):1408-13
11. Konopka K, Mareschal JC, Crichton RR (1981) Iron transfer from transferrin mediated by polyphosphate compounds. *Biochim Biophys Acta General Subjects* 677: 417-423
12. Konopka K, Bindereif A, Neilands JB (1982) Aerobactin-mediated utilization of transferrin iron. *Biochemistry* 21(25): 6503-6508
13. Konopka K, Neilands JB (1984) Effect of serum albumin on siderophore-mediated utilization of transferrin iron. *Biochemistry* 23(10): 2122-2127
14. Neilands JB, Konopka K, Schwyn B, et al. (1987) Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. W: Winkelmann G, Van der Helm D, Neilands JB (Red), *Iron transport in microbes, plants, and animals*. VCH, Weinheim, Federal Republic of Germany, str. 3-33.
15. Lesuisse E, Raguzzi F, Crichton RR (1987) Iron uptake by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of a reduction step. *J General Microbiol* 133: 3229-3236
16. Waskell L, Hoffman J, Konopka K, Chiang JYL (1986) Enflurane metabolism by cytochrome p-450 3a requires cytochrome b 5. *Anesthesiology*. doi: 10.1097/00000542-198609001-00232
17. Waskell L, Konopka K, Kroenke L, Koop DR (1987) Characterization of halothane oxidation by liver microsomes and purified cytochrome P-450 using a gas chromatographic-mass spectrometry assay. *Anesthesiology* 67: A314-A314
18. Hoffman J, Konopka K, Buckhorn C, Koop DR, Waskell L (1989) Ethanol-inducible cytochrome p450 in rabbits metabolizes enflurane. *Br J Anaesth* 63:103-108
19. Gruenke LD, Konopka K, Koop DR, Waskell LA (1988) Characterization of halothane oxidation by hepatic microsomes and purified cytochromes P-450 using a gas chromatographic mass spectrometric assay. *J Pharmacol Exp Ther* 246(2): 454-459
20. Konopka K, Waskell L (1988) Chemical modification of cytochrome b5, cytochrome c and myoglobin with diethylpyrocarbonate. *Biochim Biophys Acta Protein Structure* 954: 189-200
21. Konopka K, Waskell L (1988) Modification of trypsin-solubilized cytochrome b5, apocytochrome b5, and liposome-bound cytochrome b5 by diethylpyrocarbonate. *Arch Biochem Biophys* 261: 55-63
22. Hoffman J, Konopka K, Buckhorn C, et al. (1986) Ethanol-inducible cytochrome p450 in rabbits metabolizes enflurane. *Anesthesiology* 65:A232
23. Koblin DD, Eger EI, Johnson BH, Brynte H, Konopka K, Waskell L (1988) I-653 Resists Degradation in Rats. *Anesth Analg* 67(6): 534-538
24. Koblin DD, Weiskopf RB, Holmes MA, Konopka K, et al. (1989) Metabolism of I-653 and Isoflurane in Swine. *Anesth Analg* 68(2): 147-149
25. Gauntlett IS, Koblin DD, Fahey MR, Konopka K, et al. (1989) Metabolism of isoflurane in patients receiving isoniazid. *Anesth Analg* 69: 245-249
26. Gruenke LD, Konopka K, Waskell LA (1992) Cytochrome b5 decreases the production of reactive oxygen species by cytochrome P-450. *Anesthesiology* 77: A458
27. Gruenke LD, Konopka K, Waskell LA (1994) Cytochrome b5 improves the efficiency of anesthetic metabolism by decreasing the production of side products. *Anesthesiology* 81: A463
28. Konopka K, Davis BR, Larsen CE, Alford DR, Debs RJ, Düzgünes N (1990) Liposomes modulate human immunodeficiency virus infectivity. *J Gen Virol* 71: 2899-907
29. Larsen CE, Alford DR, Young LJ, McGraw TP, Düzgünes N (1990) Fusion of simian immunodeficiency virus with liposomes and erythrocyte ghost membranes: effects of lipid composition, pH and calcium. *J Gen Virol* 71: 1947-55. Erratum in: *J Gen Virol* 72: 473
- 29A. Konopka K, Davis BR, Duzgunes N (1991) HIV-1 infection of a non-CD4-expressing variant of HUT-78 cells: lack of inhibition by Leu3A antibodies and enhancement by cationic DOTMA liposomes. *Adv Exp Med Biol* 300 :97-110,
30. Duzgunes N, Larsen CE, Konopka K, Alford DR (1991) Fusion of HIV-1 and SIVmac with liposomes and modulation of HIV-1 infectivity. *Adv Exp Med Biol* 300:167-89
31. Konopka K, Davis BR, Larsen CE, Duzgunes N (1991) Cardiolipin liposomes specifically inhibit HIV1 infectivity. *Antiviral Res* 15. doi:10.1016 / 0166 -3542(91)90131-A
32. Konopka K, Stamatas L, Larsen CE, Davis BR (1991) Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by cationic liposomes: The role of CD4, serum and liposome-cell interactions. *J Gen Virol* 72(11): 2685-96
33. Konopka K, Davis BR, Larsen CE, Duzgunes N (1993) Anionic Liposomes Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Infectivity in CD4+ A3.01 and H9 Cells. *Antiviral Chem Chemother* 4(3):179-187
34. Flasher D, Konopka K, Chamow SM, Dazin P (1994) Liposome targeting to human immunodeficiency virus type 1-infected cells via re-

- combinant soluble CD4 and CD4 immunoadhesin (CD4-IgG). *Biochim Biophys Acta* 1194(1): 185-196
35. Konopka K, Rossi JJ, Felgner P, Duzgunes N (1995) Cationic liposome-mediated delivery of anti-HIV-1 ribozyme to chronically infected cells. *Antiviral Res* 26(3): 266-266
  36. Konopka K, Pretzer E, Felgner PL, et al. (1996) Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1312: 186-96
  37. Konopka K, Harrison GS, Felgner PL, Duzgunes N (1997) Cationic liposome-mediated expression of HIV-regulated luciferase and diphtheria toxin A genes in HeLa cells infected with or expressing HIV. 1997, *Biochim Biophys Acta* 1356(2): 185-97
  38. Konopka K, Duzgunes N, Rossi JJ (1998) Receptor Ligand-Facilitated Cationic Liposome Delivery of Anti-HIV-1 Rev-Binding Aptamer and Ribozyme DNAs. *J Drug Target* 5(4): 247-59
  39. Konopka K, Rossi JJ, Swiderski P, Slepishkin VA, Duzgunes N, Delivery of an anti-HIV-1 ribozyme into HIV-infected cells via cationic liposomes,1998, *Biochimica et Biophysica Acta* 1372(1):55-68,DOI:10.1016/S0005-2736(98) 00046-7
  40. Duzgunes N, Pretzer E, Simoes S, Slepishkin V, Konopka K,Flasher D,Pedroso de Lima M, Liposome-mediated delivery of antiviral agents to human immunodeficiency virus-infected cells,1999, *Molecular Membrane Biology*16(1) : 111-8, DOI:10.1080/096876899294832
  41. Duzgunes N, Simões S, Konopka K,Delivery of novel macromolecular drugs against HIV-1,2001Expert Opinion on Biological Therapy 1(6):949-70,DOI: 10. 1517/14712598.1.6.949
  42. Konopka K, Enhancement of Retroviral Transduction by Cationic Liposomes, 2003, *Methods in Enzymology* 373:493-506, DOI:10.1016/S0076-6879 (03) 73031- 6
  43. Konopka K, Pretzer E, Plowman B, Duzgunes N, Long-Term Noncytopathic Productive Infection of the Human Monocytic Leukemia Cell Line THP-1 by Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1III<sub>B</sub>) 1993, *Virology* 193(2):877-87, DOI:10.1006/viro.1993.1197
  44. Nejat Duzgunes, Krystyna Konopka, Differential Effects of a Hydrophobic Tripeptide on Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Induced Syncytium Formation and Viral Infectivity,1995, *Biochemical and Biophysical Research Communications*,208 (1):75-81, DOI:10.1006/bbrc.1995.1307
  45. Konopka K, Pretzer E, Celada F, Duzgunes N, A monoclonal antibody to the gp120-CD4 complex has differential effect on HIV-induced syncytium formation and viral infectivity , 1995, *Journal of General Virology* 76 ( Pt 3):669-79, DOI:10.1099/0022-1317-76-3-669
  46. Konopka K, Guo LSS, Duzgunes N, Anti-HIV activity of amphotericin Research 42(3):197-209,DOI:10.1016/S0166-3542(99)00028-5
  47. Konopka K, Lee NS, Rossi JJ, Duzgunes N,Rev-binding aptamer and CMV promoter act as decoys to inhibit HIV replication,2000, *Gene* 255 (2):235-44,DOI:10.1016/S0378-1119(00)00334-6
  48. Konopka K, Lee NS, Rossi JJ,Duzgunes N,The CMV promoter inhibits HIV-1 LTR- and SV40-driven gene expression,2000, *Molecular Biology of the Cell* 11: 10A-10A
  49. Konopka K, Duzgunes N, Expression of CD4 Controls the Susceptibility of THP-1 Cells to Infection by R5 and X4 HIV Type 1 Isolates,2002, *AIDS Research and Human Retroviruses* 18(2):123-31, DOI:10.1089/08892220252779665
  50. Duzgunes N, Flasher D, Pretzer E, Konopka K, Liposome-mediated therapy of human immunodeficiency virus type-1 and mycobacterium infections ,2008, *Journal of Liposome Research* 5(4):669-691
  51. Yee M, Konopka K, Balzarini J, Duzgunes N, HIV1 Env-Mediated Membrane Fusion Monitored by Fluorescence Microscopy of Syncytium Formation Between Clone69T1RevEnv and SupT1 Cells,2010, *Biophysical Journal*98(3),DOI:10.1016/j.bpj.2009.12.3683
  52. Yee M, Konopka K, Balzarini J, Düzgünes N. Inhibition of HIV-1 Env-Mediated Cell-Cell Fusion by Lectins, Peptide T-20, and Neutralizing Antibodies. *Open Virol J.* 2011;5:44-51. doi:10.2174/1874357901105010044
  53. King J,Gebremedhin S,Konopka K, Milnes M, HIV-Specific Transgene Expression via Progressively Truncated Tat-Responsive LTR Promoters ,2011, Conference: IADR General Session 2011
  - 54.Gebremedhin S, Au A, KonopkaK, Milnes M, A gene therapy approach to eliminate HIV-1-infected cells,2012, *Journal of the California Dental Association* , 40(5): 402-406
  55. 15. Shine N, Konopka K, Duzgunes N. The anti-HIV-1 activity associated with saliva. *J Dent Res.* 1997;76:634-640. [PubMed] [Google Scholar]
  56. 31. Konopka K, Shine N, Pretzer E, Duzgunes N. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI): oxidation of SLPI does not explain its variable anti-HIV activity. *J Dent Res.* 1999;78:1773-1776. [PubMed] [Google Scholar]
  57. Shine NR, Wang SC, Konopka K, Burks EA, Duzgunes N, Whitman CP. Secretory leukocyte protease inhibitor: inhibition of human immunodeficiency virus-1 infection of monocytic THP-1 cells by a newly cloned protein. *Bioorg Chem.* 2002;30:249-263. [PubMed] [Google Scholar]
  58. Konopka, K., Overlid, N., Nagaraj, A. C., & Düzgünes, N. (2006). Serum decreases the size of Metafectene-and GeneJammer-DNA complexes but does not affect significantly their transfection activity in SCCVII murine squamous cell carcinoma cells. *Cellular & molecular biology letters*, 11(2), 171-190. <https://doi.org/10.2478/s11658-006-0015-5>
  59. Young M, Overlid N, Konopka K, Duzgunes N, Gene Therapy for Oral Cancer: Efficient Delivery of a 'Suicide Gene' to Murine Oral Cancer Cells in Physiological Milieu,2006, *Journal of the California Dental Association* 33 (12):967-71
  60. Konopka K, Overlid N, Nagaraj AC,Duzgunes N,Serum decreases the size of Metafectene- and GeneJammer-DNA complexes but does not affect significantly their transfection activity in SCCVII murine squamous cell carcinoma cells,2006, *Cellular&Molecular Biology Letters* 11(2):171-90,DOI : 10. 2478 /s11658-006-0015-5
  61. Konopka K, Spain C, Yen A, Overlid N, Gebremedhin S, Düzgünes N. Correlation between the levels of survivin and survivin promoter-driven gene expression in cancer and non-cancer cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2009;14(1):70-89. doi:10.2478/s11658-008-0034-5
  62. Ouellette J, Gebremedhin S, Konopka K, Duzgunes N, Enhancing Gene Delivery to Cancer Cells by Transferrin and EGF, 2009, Conference: IADR General Session 2009
  63. Lavorini-Doyle C, Gebremedhin S, Duzgunes N, Konopka K, Intracellular Fate of Non-Viral Vectors in Oral Cancer Cells,2009, Conference: IADR General Session 2009
  64. Lavorini-Doyle C, Gebremedhin S, Konopka K, Duzgunes N, Gene delivery to oral cancer cells by nonviral vectors: why some cells are resistant to transfection, 2009, *Journal of the California Dental Association* 37(12):855-8
  65. Fountain J, Gebremedhin S, Konopka K, Duzgunes N, Cell-Penetrating Peptides Enhance Gene Delivery by Lipid-DNA Complexes,2010, Conference: AADR Annual Meeting 2010
  66. Gebremedhin S, Martinez F, Fountain J, Konopka K, Efficient Gene Delivery to Oral Cancer Cells by Polyethylenimine-DNA Complexes ,2010, Conference: AADR Annual Meeting 2010
  67. Interview with Nejat Düzgünes: liposomal carriers for gene delivery- ,*Ther Deliv.*, 2014 Jan;5(1):25-8, doi: 10.4155/tde.13.127.
  68. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007 Aug;86(8):694-707. doi: 10.1177/154405910708600803. Erratum in: *J Dent Res.* 2007 Nov;86(11):1126. PMID: 17652195.
  69. Goslinski T, Konopka K, Piskorz J, Kryjewski M, Wierzychowski M, Prospects for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy - PACT,2008, *Postępy Mikrobiologii* 47(4):447-456
  70. Konopka K, Goslinski T, Prospects for photodynamic therapy in,2008, *Biophotonics International* 15(7):32-35
  71. Dorocka-Bobkowska B, Konopka K, Duzgunes N, Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells in vitro,2003, *Archives of Oral Biology* 48(12):805-14,DOI: 10.101 /S0003-9969(03)00174-2

72. Dorocka-Bobkowska B, Konopka K, Susceptibility of *Candida* isolates from denture-related stomatitis to antifungal agents *in vitro*, 2007, *The International journal of prosthodontics* 20(5):504-6
73. Alpagot T, Remien J, Bhattacharyya M, Konopka K, Lundergan W, Duzgunes N. Longitudinal evaluation of prostaglandin E2 (PGE2) and periodontal status in HIV+ patients. *Arch Oral Biol.* 2007;52(11):1102-1108. doi:10.1016/j.archoralbio.2007.04.013
74. Alpagot T, Konopka K, Bhattacharyya M, Gebremedhin S, Duzgunes N, The Association Between Gingival Crevicular Fluid TGF- $\beta$ 1 Levels and Periodontal Status in HIV-1 + Patients, 2008, *Journal of Periodontology* 79(1):123-30. DOI: 10.1902/jop.2008.070312
75. Kim S, Yee M, Alpagot T, Duzgunes N, Konopka K, Inflammatory Cytokine Secretion by THP-1 cells exposed to *Porphyromonas gingivalis*, 2009, Conference: IADR General Session 2009
76. Kim S, Yee M, Alpagot T, Duzgunes N, Konopka K Cytokine Responses of Oral Epithelial Cells Exposed to *Porphyromonas gingivalis*, 2010, Conference: AADR Annual Meeting 2010
77. Yee M, Alpagot T, Duzgunes N, Konopka K, Epithelial Cell Type Affects Interleukin-6 Response to *Porphyromonas gingivalis*, 2011, Conference: IADR General Session 2011
78. Kim A, Yee M, Duzgunes N, Alpagot T, Konopka K, Inflammatory Cytokine Secretion by THP-1 cells exposed to *Porphyromonas gingivalis*, 2009, Conference: IADR General Session 2009
79. Konopka K, Dorocka-Bobkowska B, Gebremedhin S, Duzgunes N, Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole, 2010, *Antonie van Leeuwenhoek* 97(4):413-7, DOI:10.1007/s10482-010-9417-5
80. van Dijk A, Histatin 1 Enhances Cell Adhesion to Titanium in an Implant Integration Model, „*Journal of Dental Research*”, 2016, s. 2034516681761 DOI : 10.1177/0022034516681761, PMID: 27941125.
81. Dorocka-Bobkowska B, Duzgunes N, Konopka K, AmBisome and Amphotericin B inhibit the initial adherence of *Candida albicans* to human epithelial cell lines, but do not cause yeast detachment, 2009, *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 15(9):BR262-9
82. Konopka K, Dorocka-Bobkowska B, Gebremedhin S, Duzgunes N, Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole, 2010, *Antonie van Leeuwenhoek* 97(4):413-7 DOI:10.1007/s10482-010-9417-5
83. Dorocka-Bobkowska B, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Wierusz-Wysocka B, Duzgunes N, Konopka K, C-reactive protein in type 2 diabetes and denture stomatitis, 2011, Conference: IADR General Session 2011
84. Gośliński T, Osmałek T, Konopka K, Wierzchowski M, Photophysical properties and photocytotoxicity of novel phthalocyanines – Potentially useful for their application in photodynamic therapy, 2011, *Polyhedron* 30(9):1538-1546
85. Piskorz J, Skupin-Mrugalska P, Lijewski S, Korpusinski M, Sciepora M, Konopka K, Sobiak S, Goslinski T, Mielcarek J, Synthesis, physical-chemical properties and *in vitro* photodynamic activity against oral cancer cells of novel porphyrans possessing fluoroalkylthio and dietherthio substituents, 2012, *Journal of Fluorine Chemistry* 135:265-271, DOI:10.1016/j.jfluchem. 2011.12.003
86. Gebremedhin S, Au A, Konopka K, Milnes M, A gene therapy approach to eliminate HIV-1-infected cells, 2012, *Journal of the California Dental Association* 40(5):402-6
87. Davies A, Gebremedhin S, Yee M, Padilla RJ, Duzgunes N, Konopka K, Dorocka-Bobkowska B, Cationic porphyrin-mediated photodynamic inactivation of *Candida* biofilms and the effect of miconazole, *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 2016 67(5):777-783
88. Piskorz J, Konopka K, Düzgüneş N, et al. Diazepinoporphyrazines containing peripheral styryl substituents and their promising nanomolar photodynamic activity against oral cancer cells in liposomal formulations. *Chem Med Chem.* 2014;9:1775-82. [PubMed] [Google Scholar]
89. Duzgunes N, Piskorz J, Skupin-Mrugalska P, Goslinski T, Mielcarek J, Konopka K, Photodynamic therapy of cancer with liposomal photosensitizers, 2018, *Therapeutic Delivery* 9(11):823-832, DOI: 10.4155 / tde-2018-0050
90. Yee M, Kim S, Sethi P, Duzgunes N, Konopka K, *Porphyromonas gingivalis* stimulates IL-6 and IL-8 secretion in GSM-K, HSC-3 and H413 oral epithelial cells, 2014, 28, DOI:10.1016/j.anaerobe.2014.05.011
91. Gebremedhin S, Singh A, Koons S, Bernt W, Konopka K, Duzgunes N. Gene delivery to carcinoma cells via novel non-viral vectors: nanoparticle tracking analysis and suicide gene therapy. *Eur J Pharm Sci.* 2014 Aug 18;60:72-9. doi: 10.1016/j.ejps.2014.03.003. Epub 2014 Apr 19. PMID: 24751674.
92. Cheung J, Konopka K, Chino T, Duzgunes N, Transfex and TransIT-LT1 Mediated Gene Delivery to Cervical and Oral Squamous Cell Carcinoma Cells, 2015, *Molecular Therapy* 23(1):S68, DOI: 10.1016 / S1525-0016(16)33775-3
93. Cheung J, Konopka K, Duzgunes N, Transfex-Mediated HSV-tk/ Ganciclovir Suicide Gene Therapy in HeLa Cervical Carcinoma and HSC-3, FaDu, and H357 Oral Cancer Cells, 2016, *Molecular Therapy* 24(1):S268-S269, DOI: 10.1016 / S1525-0016 (16)33488-8
94. Ehrhardt A, Haase R, Schepers A, Deutsch MJ, Lipps HJ, Baiker A. Episomal vectors for gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2008 Jun;8(3):147-61. doi: 10.2174/156652308784746440. PMID: 18537590.
95. Duzgunes N, Cheung J, Konopka K, Non-viral suicide gene therapy in cervical, oral and pharyngeal carcinoma cells with CMV- and EEV-plasmids, 2018, *The Journal of Gene Medicine* 20(10-11):e3054 DOI:10.1002/jgm.3054
96. Cheung J, Konopka K, Duzgunes N, Transfex-Mediated HSV-tk/ Ganciclovir Suicide Gene Therapy in HeLa Cervical Carcinoma and HSC-3, FaDu, and H357 Oral Cancer Cells, *Molecular Therapy*, 2016, 24(1):S268-S269 DOI: 10.1016 / S1525-0016(16)33488-8
97. Düzgüneş N, Konopka K. Eradication of Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)-Infected Cells. *Pharmaceutics.* 2019;11(6):255. Published 2019 Jun 1. doi:10.3390/pharmaceutics11060255
98. Duzgunes N, Konopka K, Peptide Inhibitors of Viral Membrane Fusion, 2020, DOI:10.18103/mra.v8i9.2244, *Medical Research Archives* vol 8 issue 9. September 2020 Page 33 of 33/ Projects: Development of peptide inhibitors of SARS-CoV-2 membrane fusion
99. Düzgüneş N, Fernandez-Fuentes N, Konopka K. Inhibition of Viral Membrane Fusion by Peptides and Approaches to Peptide Design. *Pathogens.* 2021;10(12):1599. Published 2021 Dec 9. doi:10.3390/pathogens10121599
100. Turcki WA, Hypotheses on Need of Functional Receptor System for SARSCoV-2, Not Just ACE2, for Infectivity and on Binding of SARSCoV-2 in Blood Mainly with Serum ACE2, *EC Microbiology* 17.11 (2021): 30-51.