



**UMCS**

WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

**UNIWERSYTET MARII CURIE-  
SKŁODOWSKIEJ  
W LUBLINIE  
Wydział Biologii i Biotechnologii**

Kierunek: **Biotechnologia**

**Ewa Grela**

nr albumu: 984100

**Mechanizmy molekularne związane  
z toksycznością amfoterycyny B  
w świetle badań  
mikrospektroskopowych**

(Molecular mechanisms of toxicity of amphotericin B  
in the microspectroscopy studies)

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

wykonana w Katedrze Fizjologii Roślin i Biofizyki  
pod kierunkiem

**dr. hab. Rafała Luchowskiego, prof. UMCS**

**LUBLIN 2020**

***Dziękuję,***

***dr. hab. Rafałowi Luchowskiemu***

*za opiekę naukową, ogromną pomoc w redagowaniu pracy,  
poświęcony cenny czas, przekazaną wiedzę oraz zaangażowanie.*

***prof. dr. hab. Wiesławowi I. Gruszeckiemu,***

***dr. hab. Wojciechowi Grudzińskiemu***

*za cenne uwagi, wsparcie naukowe oraz poświęcony czas.*

*Wszystkim pracownikom **Katedry Biofizyki** Instytutu Fizyki oraz  
**Katedry Fizjologii Roślin i Biofizyki** Instytutu Nauk Biologicznych  
za ogromną pomoc.*

***Najbliższym, w szczególności Rodzicom***

*za wsparcie oraz wyrozumiałość, za wszystko.*

## Publikacje

Rozprawa doktorska zawiera wyniki badań, zawarte w poniższych publikacjach:

1. **Grela, E. et al.** Mechanism of Binding of Antifungal Antibiotic Amphotericin B to Lipid Membranes: An Insight from Combined Single-Membrane Imaging, Microspectroscopy, and Molecular Dynamics. *Mol. Pharm.* **15**, 4202–4213 (2018).
2. **Grela, E. et al.** Imaging of human cells exposed to an antifungal antibiotic amphotericin B reveals the mechanisms associated with the drug toxicity and cell defence. *Sci. Rep.* **8**, 1–7 (2018).
3. Wu, A., **Grela, E. et al.** ABCA1 transporter reduces amphotericin B cytotoxicity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* (2019) doi:10.1007/s00018-019-03154-w.
4. **Grela, E. et al.** Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against *Candida albicans*. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).

Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki w programie OPUS 2015/19/B/NZ7/02159.

## Spis treści

Streszczenie.....	6
Abstract.....	8
Wykaz skrótów .....	9
1. Wstęp.....	11
1.1 Grzybice układowe .....	11
1.1.1 Leki przeciwgrzybicze .....	12
1.2 Amfoterycyna B.....	17
1.2.1 Struktura cząsteczki.....	19
1.2.2 Własności spektroskopowe .....	20
1.1.2 Mechanizm działania AmB.....	23
1.3 Techniki spektroskopowe .....	25
1.3.1 Fluorescencja.....	25
1.3.2 Anizotropia fluorescencji .....	27
1.3.3 Zanik anizotropii fluorescencji.....	29
1.3.4 Czasowo skorelowane zliczanie pojedynczych fotonów (TCSPC).....	30
1.3.5 Mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM)31	
1.3.6 Spektroskopia ramanowska.....	32
1.4 Oddziaływania molekularne .....	33
2. Cel pracy .....	35
3. Materiały i metody .....	36
3.1 Materiały.....	36
3.2 Metody.....	38
3.2.1 Wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC.....	38
3.2.2 Spektroskopia absorpcyjna UV-VIS .....	39
3.2.3 Spektroskopia fluorescencyjna.....	40
3.2.4 Spektroskopia czasów życia fluorescencji .....	40
3.2.5 Mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM)41	

3.2.6	Mikrospektroskopia fluorescencji .....	43
3.2.7	Spektroskopia obrazowania ramanowskiego .....	43
3.2.8	Elektroformacja liposomów .....	44
3.2.9	Synteza nanocząstek srebra pokrytych AmB .....	45
4.	Wyniki badań .....	47
4.1	Stabilność AmB .....	47
4.2	Amfoterycyna B w działaniu na modelowe błony lipidowe.....	49
4.3	Amfoterycyna B w działaniu na ludzkie linie komórkowe .....	61
4.4	Amfoterycyna B w działaniu na linie komórkowe zawierające transportery lipidowe .....	69
4.5	Amfoterycyna B w działaniu na komórki <i>Candida albicans</i> .....	73
4.6	Transport jonów wodorowych .....	80
5.	Wnioski .....	85
5.1	Stabilności AmB .....	85
5.2	Amfoterycyna B w działaniu na modelowe błony lipidowe.....	85
	.....	87
5.3	Amfoterycyna B w działaniu na ludzkie linie komórkowe .....	87
5.4	Amfoterycyna B w działaniu na linie komórkowe zawierające transportery lipidowe .....	88
5.5	Amfoterycyna B w działaniu na komórki <i>Candida albicans</i> .....	90
5.6	Transportu jonów wodorowych .....	91
6.	Perspektywy dalszych badań- obniżenie toksyczności AmB .....	92
6.1	Oddziaływanie AmB z białkiem BSA .....	92
6.2	Nanocząstki AmB .....	96
7.	Bibliografia .....	101

## Streszczenie

Na przestrzeni ostatnich lat grzybnice stały się jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. Wewnątrzustrojowe zakażenia grzybicze, ze względu na trudną diagnostykę oraz proces leczenia stanowią bardzo poważny problem narastający w ostatnich czasach. Każdego roku ponad milion osób umiera z powodu powikłań wywołanych przez patogeny grzybicze<sup>1</sup>. Przyczyną gwałtownego wzrostu zachorowań na mikozyzy wewnętrzne jest obniżenie odporności organizmu oraz wzrastająca lekooporność grzybów chorobotwórczych<sup>2</sup>. Najbardziej na zakażenia grzybicze narażone są osoby chore na nowotwory, cukrzycę, AIDS czy przyjmujące leki immunosupresyjne<sup>3</sup>.

Amfoterycyna B (AmB) jest antybiotykiem polienowym stosowanym w leczeniu grzybnic wewnętrznych. Ze względu na szerokie spektrum działania oraz rzadko spotykaną oporność patogenów, AmB stosowana jest w leczeniu ciężkich oraz przewlekłych chorób grzybiczych. Nazywana jest „złotym standardem” w terapii przeciwgrzybiczej<sup>4</sup>. Od ponad 60 lat wykorzystywana jest w medycynie, mimo iż wykazuje silne efekty toksyczne m.in. nefrotoksyczne, hepatotoksyczne, łącznie z przypadkami śmierci pacjentów<sup>5</sup>. Molekularny mechanizm działania antybiotyku nie został jak dotąd szczegółowo poznany, dlatego AmB jest przedmiotem badań wielu laboratoriów na całym świecie. Zrozumienie procesów molekularnych odpowiadających za aktywność cząsteczki pozwoliłoby zminimalizować skutki uboczne stosowania antybiotyku, jednocześnie zachowując jego wysoką efektywność.

W pracy doktorskiej podjęto badania, których celem było poznanie molekularnych mechanizmów toksyczności AmB. Stwierdzono, że za jej efekty terapeutyczne bądź toksyczne odpowiada stopień organizacji molekularnej cząsteczek. Zastosowano techniki pozwalające określić organizację oraz orientację przestrzenną antybiotyku, w skład których wchodziły spektroskopia absorpcyjna, emisyjna, a także mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji oraz rozpraszania ramanowskiego. Badania prowadzono na modelowych błonach lipidowych, komórkach grzybiczych oraz zwierzęcych liniach komórkowych.

Wyniki doświadczalne, potwierdzone badaniami dynamiki molekularnej wskazały także, że skład błony lipidowej wpływa na organizację molekularną AmB. Ponadto, obecność steroli warunkuje wbudowywanie się antybiotyku w membranę w postaci form zagregowanych, odpowiadających za tworzenie kanałów jonowych.

Zaobserwowano mechanizmy obronne komórek grzybiczych oraz ludzkich przed działaniem antybiotyku, polegające na usuwaniu AmB odpowiednio poprzez struktury typu „gąbek” lub egzosomów. Rezultaty badań wskazują, że obniżenie szkodliwości antybiotyku, powinno polegać na przeciwdziałaniu jego agregacji. Regulacja ekspresji białek odpowiedzialnych za dystrybucję sterolu w komórkach ludzkich oraz zapobieganie agregacji AmB, poprzez łączenie jej z białkami transportującymi czy nanocząstkami obniżały toksyczność antybiotyku.

## **Abstract**

In recent years, fungal diseases have become a major medical problem. Invasive fungal infections due to their difficult diagnostics and treatment are a serious problem, which has been growing lately. Over a million people die every year because of complications of fungal diseases<sup>1</sup>. Increase in mycosis is caused by weakened immunity and increasing fungal drug resistance<sup>2</sup>. People with cancer, diabetes, AIDS or those taking immunosuppressive drugs are the most vulnerable to these infections<sup>3</sup>.

Amphotericin B (AmB) is a polyene antibiotic used to treat endemic mycoses. AmB is used in the treatment of severe and chronic fungal diseases due to the broad spectrum of activity and rare pathogen resistance. It is called the "gold standard" in antifungal therapy<sup>4</sup>. For over 60 years, it has been used in treatment of fungal infections although it has severe side effects including nephrotoxicity, hepatotoxicity or even death<sup>5</sup>. The molecular mechanisms of action of antibiotic has not been fully understood, that is why AmB is being examined in many laboratories around the world. Understanding the molecular processes responsible for the activity of the molecule would minimize the side effects of antibiotic while maintaining its high efficiency.

The dissertation involved studies aimed at understanding the molecular mechanisms of toxicity of AmB. It has been stated that therapeutic and toxic effects of antibiotic depend on the molecular organization of AmB molecules. Techniques used to determine the organization and orientation of the antibiotic included: absorption and emission spectroscopy as well as fluorescence lifetime imaging microscopy and Raman scattering microscopy. Studies were carried out on model lipid membranes, fungal cells and animal cell lines.

Results of experiments confirmed by molecular dynamic studies indicate that the composition of the lipid membrane affects the molecular organization of AmB. In addition, the presence of sterols determines the incorporation of an antibiotic into the lipid membrane in the form of aggregates that could create ion channels. Mechanisms of defense of fungal and human cells against the antibiotic have been observed and based on removal of AmB by structures called "sponges" or exosomes. The results of studies indicate that reducing the toxicity of an antibiotic should prevent its aggregation. It has been deduced that reduction of the toxicity of an antibiotic should be based on regulation of expression of proteins responsible for sterol distribution in human cells, combining antibiotic with transporting proteins and nanoparticles.



## Wykaz skrótów

- A1G – ABCA1-GFP – komórki CHO-K1 zawierające aktywny transporter ABCA1 wyznakowany białkiem GFP
- ABCA1 – transporter zawierający kasetę wiążącą ATP (*ang.* ATP-binding cassette transporter)
- AIDS – zespół nabytego niedoboru odporności (*ang.* acquired immune deficiency syndrome)
- AmB – amfoterycyna B
- ATP – adenozyno-5'-trifosforan
- BSA – wołowa albumina surowicza (*ang.* bovine serum albumin)
- CCD 841 CoTr – ludzkie prawidłowe komórki nabłonka jelita grubego
- CHO-K1 – komórki jajnika chomika chińskiego (*ang.* Chinese hamster ovary K1 cells)
- Chol – cholesterol
- DMPC – 1,2-dimirystoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
- DMSO – dimetylosulfotlenek
- DPPC – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
- Ergo – ergosterol
- FLIM – mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (*ang.* Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)
- GFP – białko zielonej fluorescencji (*ang.* green fluorescent protein)
- GUV – gigantyczne liposomy (*ang.* giant unilamellar vesicles)
- HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (*ang.* high-performance liquid chromatography)
- HSA- ludzka albumina surowicza (*ang.* human serum albumin)
- HT-29 – ludzkie nowotworowe komórki nabłonka jelita grubego
- MMG – ABCA1MM-GFP – komórki CHO-K1 zawierające nieaktywny transporter ABCA1 wyznakowany białkiem GFP
- NP-AmB- nanocząstki otoczone AmB
- PBS – bufor soli fizjologicznej (*ang.* phosphate-buffered saline)
- POPC – 1-palmitoilo-2-oleilo-glicero-3-fosfocholina

- SD – odchylenie standardowe (*ang.* Standard Deviation)
- TCSPC – technika skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów (*ang.* time-correlated single-photon counting)
- UV-VIS- spektroskopia w zakresie światła widzialnego i bliskiego ultrafioletu (*ang.* Ultraviolet-Visible Spectroscopy)

# 1. Wstęp

## 1.1 Grzybice układowe

Na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat odnotowuje się znaczny wzrost zachorowań na układowe choroby grzybicze. Jest to skutek zachodzącego postępu w medycynie, szczególnie chirurgii, transplantologii czy onkologii. Leczenie immunosupresyjne, radioterapia, chemioterapia, choroby obniżające odporność takie jak AIDS czy cukrzyca sprzyjają zapadalności na mikozyzy wewnętrzne<sup>6</sup>. Szacuje się, że ponad miliard osób na całym świecie dotkniętych jest chorobami grzybiczymi<sup>7</sup>.

Co niepokojące, wraz ze wzrostem zakażeń grzybiczych obserwowany jest również wzrost lekooporności wywołujących je patogenów. Efekt ten spowodowany jest głównie działalnością człowieka. Lata stosowania środków przeciwgrzybiczych w rolnictwie oraz medycynie doprowadziły do zmian w otaczającym nas mikrobiomie (wyparcie pierwotnych szczepów przez te odporne na leki)<sup>8</sup>.

Ponad 600 gatunków grzybów jest chorobotwórczych dla ludzi<sup>9</sup>, z czego bezwzględnie tylko z rodzaju *Histoplasma*, i *Blastomyces*. Pozostałe zakażenia występują u osób z obniżoną odpornością, najczęściej wywoływane są przez grzyby z rodzaju *Candida* oraz *Aspergillus*. Choroby grzybicze dzielone są na: grzybice powierzchniowe oraz grzybice głębokie (wewnętrzne, układowe).

Śmiertelność w przypadku wewnętrznych chorób grzybiczych sięga 30–90%. Czynnikiem najczęściej wywołującym zakażenia są grzyby z rodzaju *Candida* oraz *Aspergillus*, a w ostatnim czasie wzrasta liczba zakażeń wywoływanych przez inne grzyby m.in. *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Scedosporium spp.*, rzadziej *Cryptococcus spp.* czy *Malassezia spp.*<sup>10-12</sup>.

*Candida spp.* wywołują grzybice powierzchniowe (skórne) jak również zagrażające życiu wielonarządowe zakażenia obejmujące płuca, serce, nerki czy wątrobę. *C. albicans* *C. tropicalis* oraz *C. parapsilosis* są najczęstszymi czynnikami etiologicznymi chorób wywoływanych przez te drożdżaki. Dodatkowo, na skutek szerokiego zastosowania w leczeniu środków przeciwgrzybiczych z grupy tzw. „azoli” (pochodnych imidazolu i triazolu), doszło do selekcji szczepów lekoopornych *C. krusei* i *C. glabrata*. *C. albicans* jest składnikiem naturalnej mikroflory m.in. układu pokarmowego i moczowo-płciowego, nie dając objawów chorobowych, jednak obniżenie odporności oraz zaburzenie homeostazy ludzkiej mikroflory może

prowadzić do rozwoju kandydoz. Patogeny te potrafią również upośledzać działanie układu odpornościowego swojego gospodarza, poprzez produkcję enzymów, które niszczą białka przeciwmikrobiowe<sup>13</sup>. Śmiertelność w przypadku układowych zakażeń wywołanych drożdżakami *Candida* sięga nawet 40–80%<sup>14–16</sup>.

Grzyby pleśniowe *Aspergillus spp.* są drugą grupą patogenów, która najczęściej po *Candida spp.* wywołuje mikozy wewnątrzne tzw. kropidlakowice (aspergillosis). Najbardziej chorobotwórczymi patogenami z tej grupy są *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*<sup>17</sup>. Zakażenia obejmują głównie płuca oraz występują w postaci uogólnionej, zazwyczaj zapadają na nie osoby z obniżoną odpornością, po przebytych chorobach płuc (gruźlica, pylica), pacjenci po przeszczepach oraz chorzy na nowotwory i AIDS<sup>18</sup>. Śmiertelność w wyniku powikłań po układowych zakażeniach wywołanych *Aspergillus spp.* wynosi aż 60–90%<sup>19</sup>.

Rozwój medycyny spowodował także wzrost zachorowań na grzybice wywoływane przez patogeny uważane dotąd za nieinwazyjne m.in. z rodzaju *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Acremonium*, czy *Alternatia*. Do wewnętrznych zakażeń wywołanych tymi patogenami dochodzi u osób z upośledzoną odpornością, a grzyby zasiedlają najczęściej płuca oraz mózg. *Fusarium spp.* powoduje zgon 70–100% biorców przeszczepów<sup>14,20–22</sup>.

Objawy układowych zakażeń grzybiczych są mało specyficzne, podobne do zakażeń bakteryjnych czy wirusowych, dlatego diagnostyka chorób grzybiczych jest bardzo trudna (statystycznie prawidłowa w 12-60% przypadków)<sup>21</sup>. Obecnie do identyfikacji mikozy wewnętrznych stosowane są metody mikroskopowe, mikrobiologiczne, serologiczne oraz genetyczne, co i tak nie zawsze pozwala lekarzom postawić prawidłową diagnozę i wdrożyć skuteczne leczenie<sup>23</sup>.

### **1.1.1 Leki przeciwgrzybicze**

Mimo ogromnego postępu medycyny, leczenie grzybic wciąż nastęrcza wielu trudności. Możliwości swoistej chemioterapii są nadal bardzo ograniczone ze względu na podobieństwo procesów biochemicznych zachodzących w komórkach ludzkich i grzybiczych. Wiele antymikotyków, mimo swojej skuteczności terapeutycznej, zostało wycofanych z lecznictwa ze względu na dużą toksyczność dla organizmu człowieka. Skuteczność terapii w grzybicach uogólnionych zależy w dużej mierze od właściwego rozpoznania mikrobiologicznego (badania mikroskopowe, serologiczne, hodowla), określenia wrażliwości patogenu na chemioterapeutyki oraz utrzymania

odpowiednio dużych stężeń leku w surowicy przy jednoczesnym monitorowaniu działań niepożądanych.

Preparaty stosowane w leczeniu klinicznym grzybic, można sklasyfikować według mechanizmu działania na<sup>24</sup>:

- zakłócające syntezę ściany komórkowej
- zakłócające syntezę błony komórkowej
- blokujące syntezę kwasów nukleinowych
- blokujące syntezę białek
- o złożonym mechanizmie aktywności

Ściana komórkowa, jako element niewystępujący w ludzkich komórkach, jest specyficznym celem działania leków przeciwgrzybiczych<sup>7</sup>. Stosowane preparaty ukierunkowane są na zaburzenie syntezy elementów ściany komórkowej takich jak: chityna (nikkomycyna, polioksyna, allosamidyna), mannoproteiny (tunikamycyna) oraz glukany (echinokandyny)<sup>25</sup>.

Ze względu na wysoką tolerancję wśród pacjentów oraz wysoką efektywność w leczeniu mikoz, najczęściej wybieraną grupą leków są inhibitory syntetazy glukanów. Echinokandyny (kaspofungina, mikafungina, anidulafungina) należą do grupy lipopeptydów, które są niekompetywnymi inhibitorami 1,3-β-D-syntetazy glukanu (Rys.1.1). Zahamowanie syntezy glukanów prowadzi do zaburzenia integralności ściany komórkowej oraz uwrażliwia ją na zmiany ciśnienia osmotycznego<sup>26,27</sup>. Stosowane są m.in. w leczeniu chorób wywołanych gatunkami *Candida*, *Aspergillus*, *Histoplasma* czy *Blastomyces*. Echinokandyny wykorzystywane są w pierwszej linii zwalczania inwazyjnych kandydoz, jednak odnotowuje się coraz więcej przypadków oporności na te preparaty<sup>28</sup>. Mechanizm oporności patogenów na echinokandyny polega na modyfikacji celu działania leku poprzez punktową mutację w genach *FKS1* lub/i *FKS2*, które kodują kompleks 1,3-β-D-syntetazy glukanu (Rys. 1.2).

Środki przeciwgrzybicze oddziałujące na błonę biologiczną można podzielić na cztery grupy: azole, polieny, allilolaminy oraz tiokarbaminiany. Mechanizm działania wyżej wymienionych preparatów opiera się na hamowaniu syntezy ergosterolu lub bezpośredniej interakcji z jego cząsteczkami.

Azole to jedne z najskuteczniejszych syntetycznych antymikotyków, w skład których wchodzi: pochodne imidazolu (mikonazol, ekonazol, klotrimazol,

ketokonazol) oraz pochodne triazolu (flukonazol, itraconazol, worykonazol, posakonazol)<sup>26</sup>. Mechanizm działania azoli polega na inhibicji 14- $\alpha$ -demetylasy lanosterolu, enzymu zależnego od cytochromu P-450, który jest niezbędny do syntezy ergosterolu. Związanie się cząsteczki azolu z hemem cytochromu P-450 blokuje usuwanie grupy metylowej w położeniu węgla 14 sterolu, przez co szlak biosyntezy ergosterolu zostaje zahamowany. W błonie komórkowej gromadzą się prekursorzy ergosterolu, co niekorzystnie wpływa na jej strukturę oraz prawidłowe funkcjonowanie (Rys.1.1). Azole stosowane są w zwalczaniu większości patogenów grzybiczych m. in. *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Zygomycetes*<sup>29</sup>.

Zaobserwowano różnorodne mechanizmy oporności grzybów chorobotwórczych wobec aktywności azoli. Zmniejszenie stężenia leku wewnątrz komórek grzybiczych jest jednym z możliwych mechanizmów. Mutacje w czynnikach transkrypcyjnych *TAC1* oraz *MRR1*, powodują wzmożenie ekspresji białek transportowych, kodowanych przez geny *CDR1*, *CDR2* oraz *MDR1*. Białka transportowe aktywnie usuwają lek z wnętrza komórek grzybów<sup>30</sup>. Kolejnym mechanizmem oporności jest zmniejszenie ilości celu molekularnego azoli, spowodowane punktowymi mutacjami w genie *ERG11* kodującym 14- $\alpha$ -demetylazę lanosterolu. Przeciwnym mechanizmem jest zwiększona synteza białka docelowego, która następuje poprzez duplikację genu *ERG11* oraz regulację czynników transkrypcyjnych. Rzadko spotykanym mechanizmem jest zmiana ostatniego etapu syntezy ergosterolu poprzez inaktywację genu *ERG3*, co prowadzi do akumulacji w błonie komórkowej innych steroli, nie będących celem działania azoli (Rys. 1.2)<sup>26</sup>.

Antybiotyki polienowe (amfoterycyna B, natamycyna, nystatyna) oddziałują ze sterolami, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej i śmierci komórki<sup>31</sup>. Prawdopodobny mechanizm działania antybiotyków polega na tworzeniu kanałów transbłonowych w obecności steroli, efektem czego jest zaburzenie równowagi jonowej komórek (Rys.1.1). Preparaty polienowe stosowane są w leczeniu zakażeń wywołanych przez grzyby z rodzaju: *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Aspergillus* oraz *Fusarium*.

Oporność patogenów grzybiczych na polieny związana jest z modyfikacją steroli, przez co mają one mniejsze powinowactwo do antybiotyków<sup>27,32</sup>. Obniżenie zawartości ergosterolu, poprzez mutacje w genach *ERG3* oraz *ERG6* kodujących

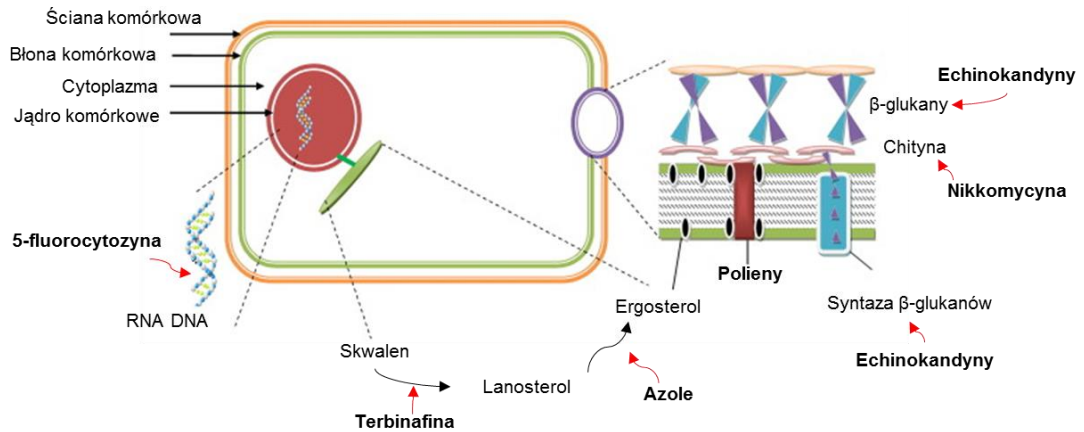
enzymy zaangażowane w jego biosyntezę, również powoduje obniżenie skuteczności działania antybiotyków polienowych (Rys. 1.2)<sup>33</sup>.

Kolejne preparaty zaburzające prawidłowe funkcjonowanie błony komórkowej to allilolaminy (terbinafina, naftyfina, amorolfina) oraz tiokarbaminiany (tolnaftat), które są odpowiedzialne za inhibicję epoksydazy skwalenowej, enzymu uczestniczącego we wczesnym etapie biosyntezy ergosterolu (Rys.1.1). Zahamowanie tego szlaku skutkuje gromadzeniem się w błonie komórkowej skwalenu, co zwiększa jej przepuszczalność<sup>27</sup>. Leki należące do tej grupy antymikotyków stosowane są głównie w zwalczaniu zakażeń wywołanych przez: *Trichophyton spp.*, *Microsporium spp.*, *Epidermophyton spp.* czy *Candida spp.*

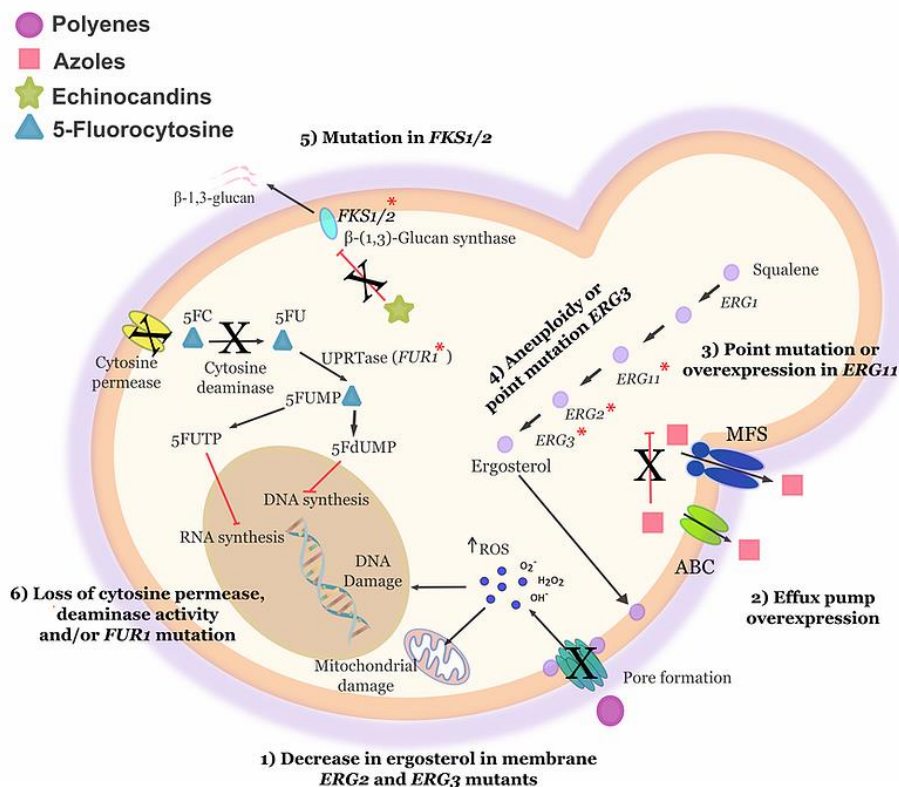
Mechanizm oporności grzybów na allilolaminy oraz tiokarbaminiany najprawdopodobniej polega na aktywnym usuwaniu leków poprzez pompy białkowe<sup>27</sup>.

Aktualnie w leczeniu grzybic jako preparat blokujący syntezę kwasów nukleinowych stosowana jest 5-fluorocytozyna. Częsteczka transportowana jest za pomocą permeazy cytozyny do komórek grzyba, gdzie ulega deaminacji do 5-fluorouracylu, a następnie fosforylacji do monofosforanu 5-fluorodeoksyurydyny. Powstała cząsteczka blokuje działanie syntazy tymidylanowej, przez co interferuje z procesem syntezy DNA. Monofosforan 5-fluorodeoksyurydyny może ulec dalszej fosforylacji, a następnie inkorporacji do RNA, co prowadzi do zaburzenia syntezy białek<sup>34</sup>(Rys.1.1). 5-fluorocytozyna wykazuje aktywność przeciwko patogenom z rodzaju *Candida* oraz gatunku *Cryptococcus neoformans*, jest jednak rzadko stosowana w monoterapii ze względu na często spotykaną oporność patogenów.

Oporność na działanie 5-fluorocytozyny związana jest z mutacjami prowadzącymi do zmiany metabolizmu cząsteczki w komórce grzyba. Punktowa mutacja genu *FCY2* prowadzi do inaktywacji permeazy cytozyny, przez co lek nie jest transportowany do wnętrza komórek patogenu. Zmieniony metabolizm cząsteczki powoduje, że traci ona swoją aktywność przeciwgrzybiczą. Mutacje w genach *FCY1* oraz *FUR1* prowadzą odpowiednio do inaktywacji deaminazy cytozyny oraz uracylowej transferazy fosforybozylowej, odpowiedzialnych za przemianę leku do formy hamującej syntezę kwasów nukleinowych (Rys. 1.2)<sup>35,36</sup>.



**Rysunek 1.1:** Obraz przedstawiający mechanizmy działania wybranych leków przeciwgrzybiczych. Na rysunku schematycznie została przedstawiona komórka grzybicza oraz część szlaku biosyntezy ergosterolu. Strzałka czerwona wskazuje cel molekularny preparatów stosowanych w leczeniu grzybic<sup>37</sup>.



**Rysunek 1.2:** Mechanizmy lekooporności patogenów grzybiczych wobec antybiotyków polienowych (polyenes), azoli (azoles), echinokandyn (echinokandins) oraz 5-fluorocytozyny (5-fluorocytosine)<sup>38</sup>. 1 – spadek zawartości ergosterolu w błonie komórkowej w wyniku mutacji genów *ERG2*, *ERG3*, 2 – wzmożona ekspresja białek transportowych (pomp), 3 – punktowe mutacje lub duplikacje genu *ERG11*, 4 – punktowa mutacja genu *ERG3*, 5 – mutacje genów *FKS1*, *FKS2*, 6 – mutacja genu *FUR1* oraz utrata aktywności permeazy cytozyny, deaminazy.



Sordaniny to cząsteczki, które hamują syntezę białek poprzez blokowanie translacyjnego czynnika elongacyjnego 2 (EF2)<sup>39</sup>, natomiast gryzeofulwina zaburza podział mitotyczny u grzybów poprzez zakłócanie produkcji mikrotubul, niezbędnych do wytworzenia wrzeciona kariokinetycznego. Gryzeofulwina stosowana jest głównie w leczeniu zakażeń wywołanych dermatofitami<sup>40</sup>.

Wykształcane przez grzyby mechanizmy lekooporności zmuszają ludzi do poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych. Przyszłość terapii przeciwgrzybiczej wymaga wprowadzania nowych, naturalnych oraz syntetycznych farmaceutyków, tworzenia nowych formuł (kompleksy lipidowe, nanocząstki, dendrymery)<sup>1</sup> oraz pochodnych stosowanych już leków. Wprowadzanie terapii skojarzonych, gdzie stosowane są leki z różnych grup także powoduje wzrost skuteczności w zwalczaniu chorób grzybiczych<sup>41</sup>. Duże nadzieje w walce z grzybicami wiązane są także ze stosowaniem immunoterapii, która wspomaga działanie preparatów przeciwgrzybiczych oraz odpowiedź immunologiczną organizmu na zakażenia<sup>42</sup>.

## 1.2 Amfoterycyna B

Amfoterycyna B należy do grupy antybiotyków polienowych, jest metabolitem wtórnym syntetyzowanym przez bakterie glebowe *Streptomyces nodosus*. Historia leku sięga lat sześćdziesiątych XX wieku, kiedy to po raz pierwszy został on wyizolowany z bakterii zasiedlających dorzecze Orinoko w Wenezueli<sup>43</sup>. W roku 1959 pierwsza formuła leku została wprowadzona na rynek farmaceutyczny, była to AmB zawieszona w deoksyholanie sodu, z przeznaczeniem do zwalczania ciężkich, zagrażających życiu infekcji grzybiczych<sup>4</sup>.

Amfoterycyna B jest lekiem pierwszego wyboru stosowanym w leczeniu inwazyjnych zygomikoz oraz kryptokokowego zapalenia opon mózgowych. Jest skuteczna w terapii aspergilozy, kandydozy, histoplazmozy, blastomykozy, sporotrichozy, fuzariozy czy kokcidiomykozy, zwłaszcza w przypadku gdy patogeny je wywołujące są odporne na działanie echinokandyn oraz azoli. AmB wykorzystywana jest także w zwalczaniu pasożytów: *Naegleria fowleri*, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni* czy *Leishmania spp*<sup>43-46</sup>. Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują także potencjalne zastosowanie AmB w leczeniu mukowiscydozy<sup>47</sup> oraz

hamowaniu replikacji enterowirusa 71<sup>48</sup> wywołującego m.in. aseptyczne zapalenie opon mózgowych.

Szerokie spektrum działania oraz rzadko spotykana lekooporność grzybów na AmB łączy się niestety z wysoką toksycznością tego antybiotyku. Niska selektywność działania AmB względem komórek grzybiczych oraz ludzkich wynika z ich podobieństwa biochemicznego oraz metabolicznego. Do efektów ubocznych powodowanych przez AmB należą: gorączka, dreszcze, nudności, niedobory wapnia oraz magnezu, nadmiar sodu w organizmie oraz kwasica metaboliczna<sup>49</sup>. Antybiotyk powoduje także zmniejszenie przepływu nerkowego krwi, a co najgorsze dla pacjentów wykazuje właściwości hepatotoksyczne, nefrotoksyczne oraz prowadzi do śmierci<sup>50,51</sup>. Jednym z powodów wysokiej toksyczności AmB może być utlenienie cząsteczki<sup>52</sup>, które prowadzi do zmniejszenia jej aktywności przeciwgrzybiczej przy nieznacznym spadku jej toksyczności<sup>53</sup>.

Odmienny stopień powinowactwa antybiotyku wobec ergosterolu oraz cholesterolu pozwala dominować jego właściwościom leczniczym nad toksycznymi, przez co nadal jest stosowany w zwalczaniu ciężkich zakażeń grzybiczych. Oddziaływanie AmB ze sterolem grzybiczym, głównie poprzez oddziaływania van der Waalsa oraz wiązania wodorowe jest kilkukrotnie stabilniejsze oraz silniejsze niż z cholesterolem, co wynika z różnic w strukturze obu steroli<sup>54,55</sup>. Usunięcie reszty aminocukrowej z cząsteczki AmB powoduje utratę jej właściwości przeciwgrzybiczych, ponieważ traci ona powinowactwo do steroli<sup>56</sup>.

Lekooporność patogenów na działania AmB jest zjawiskiem rzadko spotykanym, bardzo często dotyczy ona grzybów, które nie są chorobotwórcze dla człowieka<sup>57</sup>. Najczęstszym mechanizmem oporności wobec aktywności antybiotyku jest zmiana składu błony lipidowej poprzez obniżenie zawartości ergosterolu lub jego chemiczną modyfikację, a także nadekspresja białek transportowych ABC<sup>58</sup>. Odmienny mechanizm polega na niwelowaniu skutków stresu oksydacyjnego występującego w obecności AmB<sup>59</sup> poprzez zwiększenie aktywności katalazy rozkładającej reaktywne formy tlenu<sup>60</sup>. Zaobserwowano również lekooporność w przypadku komórek *Candida tropicalis*, które posiadały większą zawartość  $\beta$ -1,3-glukanów w ścianie komórkowej<sup>61</sup>.

Wysiłki wielu grup badawczych skupione są na opracowywaniu zarówno pochodnych AmB jak i nowych formuł leku, które wykazywałyby niższą toksyczność

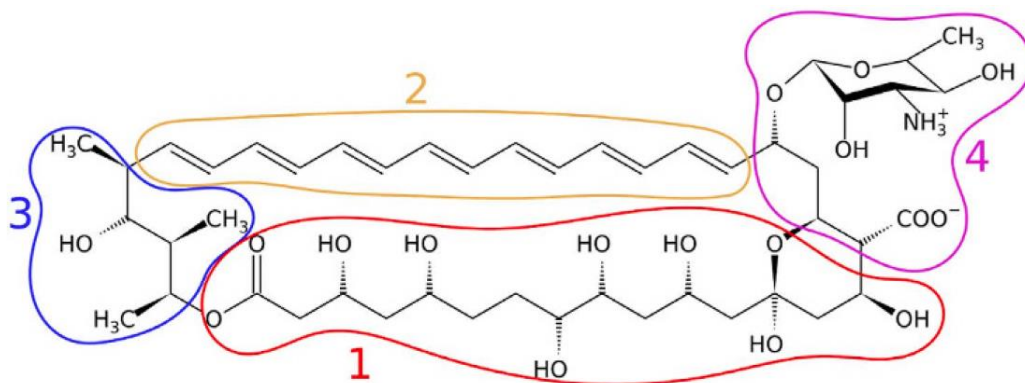
niż obecnie stosowane preparaty. W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku opracowano lipidowe formy AmB, które wykazywały mniej efektów niepożądanych, niż antybiotyków zawieszony jedynie w rozpuszczalniku<sup>62</sup>. Połączenie leku z lipidami pozwalało zwiększyć podawaną pacjentom dawkę AmB, a jednocześnie obserwowano u nich mniej skutków ubocznych wywołanych jej działaniem<sup>63</sup>. Badania kliniczne wykazały, że AmB podawana w roztworze deoksycholenu jest gorzej metabolizowana przez ludzki organizm, przez co wymagane jest wyższe stężenie antybiotyku w tej formule, niż w postaci liposomalnej<sup>64</sup>. Badania *in vitro* oraz *in vivo*, porównujące aktywność obu form preparatów wobec *Aspergillus spp.* potwierdziły wyższą penetrację komórkową AmB w liposomach<sup>65,66</sup>.

Badania ukierunkowane na minimalizację efektów ubocznych antybiotyku obrały różnorodne kierunki. Począwszy od wprowadzenia technik inżynierii genetycznej, gdzie naukowcy sugerują modyfikacje genetyczne *S. nodosus* skutkujące syntezą AmB o wyższej aktywności, lepszej biodostępności oraz niższej toksyczności niż naturalnie wytwarzana<sup>67</sup>. Poprzez tworzenie kompleksów antybiotyku z jonami miedzi, które zapobiegają agregacji AmB, obniżając jej toksyczność z zachowaniem wysokiej aktywności przeciwgrzybiczej<sup>68,69</sup>, czy też arabinogalaktanem<sup>70</sup>. Obiecujące jest też tworzenie różnorodnych nanocząstek, micelarnych struktur zawierających niezagregowaną AmB, które zwiększają dostępność antybiotyku podawanego doustnie oraz zwiększają jego tolerancję wśród pacjentów<sup>71-73</sup>. Pozytywne współdziałanie preparatów wykorzystywanych w terapii skojarzonej, inspiruje badaczy do poszukiwania nowych cząsteczek synergistycznie oddziałujących ze stosowanymi lekami. Badania przeprowadzone m.in. na szczepach *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *Trichophyton rubrum* oraz *A. niger* wykazały, że połączenie AmB z pochodnymi tiadiazoli wzmacnia jej aktywność, dzięki czemu efektywna dawka antybiotyku jest mniejsza niż w przypadku stosowania samej AmB<sup>74</sup>. Opracowywane są także metody ochrony antybiotyku przed działaniem światła UV oraz procesem utleniania. Takie pożądane właściwości zaobserwowano w przypadku AmB połączonej z pęcherzykami fosfolipidowymi oraz apolipoproteiną A-I<sup>75</sup>.

### 1.2.1 Struktura cząsteczki

Struktura chemiczna AmB została określona na podstawie badań rentgenowskich kryształu N-jodoacetyloamfoterycyny B w roku 1971. Cząsteczka antybiotyku zbudowana jest z makrocyklicznego pierścienia laktonowego

połączonego wiązaniem  $\beta$ -glikozydowym z resztą aminocukru mykozaminy<sup>76</sup>. Molekuła ma charakter amfifilowy, dzięki obecności łańcucha hydrofilowego z licznymi grupami hydroksylowymi i grupą ketonową oraz hydrofobowego łańcucha polienowego, stanowiącego chromofor cząsteczki (Rys. 1.3)<sup>77</sup>.



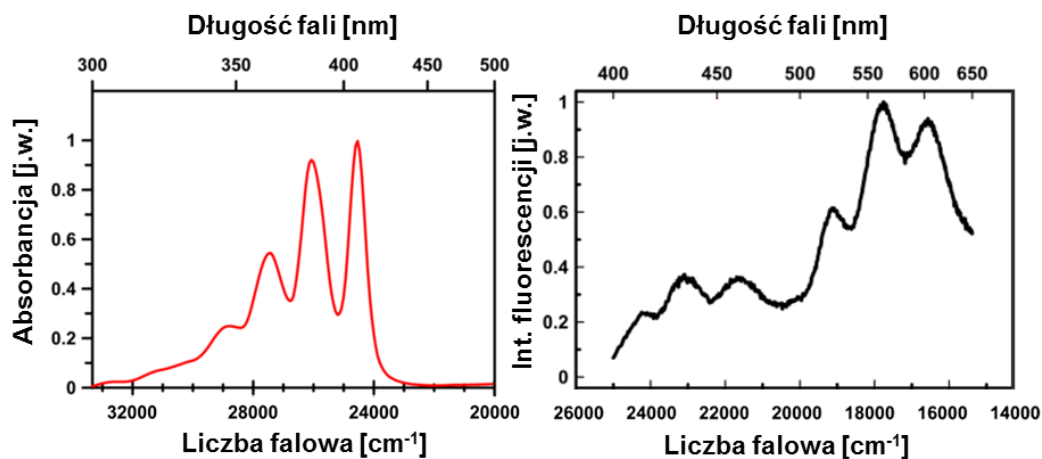
**Rysunek 1.3:** Struktura chemiczna cząsteczki AmB z zaznaczonymi: 1 – łańcuch hydrofilowy, 2 – łańcuch polienowy - chromofor, 3 – hydrofilowy ogon, 4 – głowa polarna z resztą mykozaminy oraz resztą grupy karboksylowej<sup>78</sup>.

Przestrzenna orientacja grup funkcyjnych cząsteczki (szczególnie reszty aminocukrowej) wpływa na jej oddziaływanie ze sterolami, fosfolipidami, organizację molekularną, a w konsekwencji na jej aktywność biologiczną<sup>79</sup>. AmB występuje głównie w postaci jonu obojnaczonego, a obecność grupy karboksylowej oraz aminowej sprawiają, że oddziałuje ona zarówno z kwasami jak i zasadami. Antybiotyk dobrze rozpuszcza się w roztworach zasadowych oraz DMSO, gdzie zachowuje postać monomeryczną, natomiast agreguje w roztworach wodnych, co determinuje jej mechanizm działania<sup>80,81</sup>. Zwiększoną rozpuszczalność AmB w wodzie uzyskano łącząc ją z poli(kwasem metakrylowym). Kompleksy te, co istotne, posiadały niskie właściwości hemolityczne oraz utrzymywały aktywność przeciw *Leishmania donovani*<sup>82</sup>.

### 1.2.2 Własności spektroskopowe

Za własności spektroskopowe amfoterycyny B odpowiada w głównej mierze chromofor złożony z liniowego układu siedmiu naprzemiennych wiązań pojedynczych i podwójnych (tzw. wiązań sprzężonych). Jak można się domyślać, taka budowa determinuje położenie i kształt widma absorpcji usytuowanego w krótkofalowym obszarze spektralnym z wyraźną progresją oscylacyjną i maksimum przy ok. 400 nm

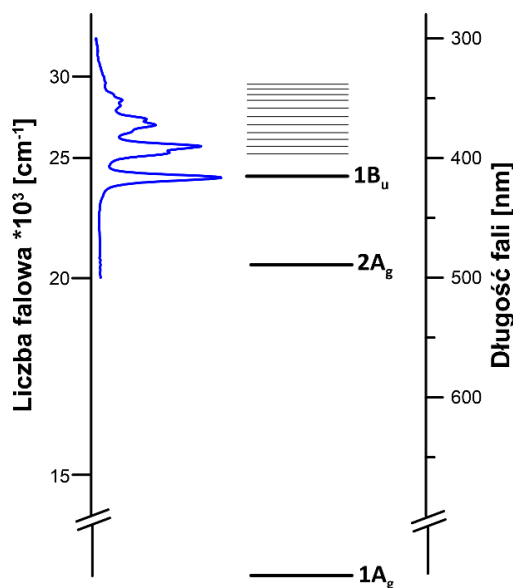
zależnym od zastosowanego rozpuszczalnika (Rys. 1.4, panel lewy). Widmo fluorescencji AmB zarejestrowane w roztworze zalkalizowanym charakteryzuje się obecnością pasma 400-500 nm odpowiadającego przejściu ze stanu wzbudzonego  $S_2$ , natomiast pasmo w zakresie długości fal 500-800 nm odpowiada emisji ze stanu  $S_2$ , co zaprezentowano w prawym panelu na rysunku 1.4.



**Rysunek 1.4:** Widmo absorpcji (panel lewy) oraz emisji fluorescencji (panel prawy) AmB. Absorbancja AmB (kolor czerwony) w roztworze glicerol:etanol (1:1) zmierzona w temperaturze pokojowej. Widmo fluorescencji AmB jako średnia z widm emisji zarejestrowanych przy wzbudzeniu 395 nm, 400 nm oraz 405 nm (kolor czarny) zarejestrowane w roztworze wodnym o pH 12<sup>83</sup>.

Pomimo stosunkowo prostej struktury molekularnej AmB (i w ogólności polienów), silna korelacja elektronowa sprawia, że sekwencja elektronowych stanów wzbudzonych jest bardzo zależna od długości łańcucha. Powoduje to trudności w opisie procesów fizycznych obejmujących stany wzbudzone, takich jak fluorescencja, konwersja wewnętrzna i bezpromienisty transfer energii wzbudzenia w obrębie sąsiadujących cząsteczek.

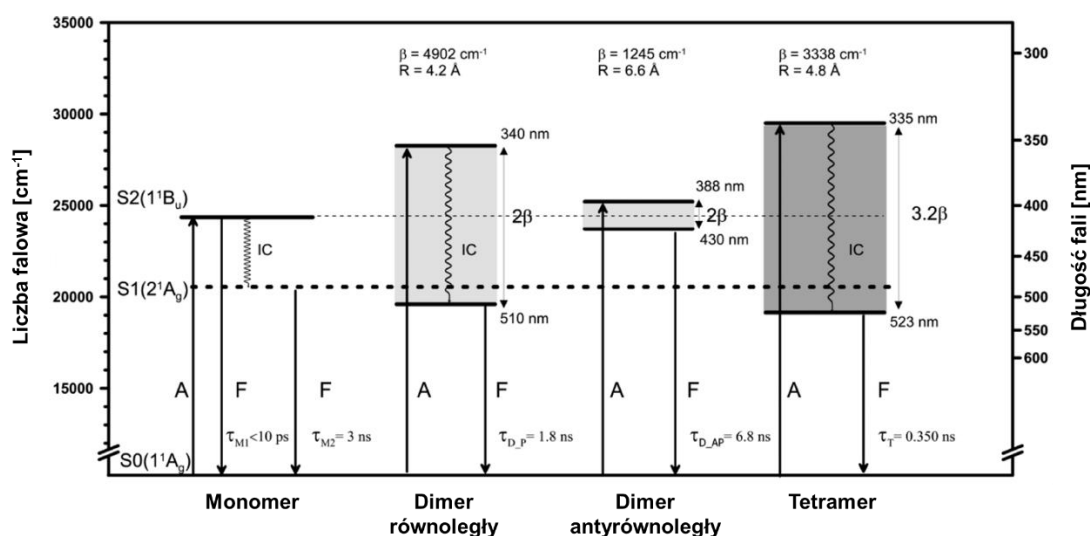
Absorbpcja światła do elektronowych stanów wzbudzonych AmB może odbywać się jedynie do ograniczonej liczby poziomów, co wynika z reguł wyboru dotyczących symetrii. W polienach możemy wyróżnić stany elektronowe różniące się symetrią, które w literaturze naukowej przyjęło się oznaczać symbolami:  $A_g$  (poziomy symetryczne) oraz  $B_u$  (antysymetryczne) z cyfrą umieszczaną przed oznaczeniem literowym odnoszącą się do numeru kolejnego poziomu elektronowego. Pierwsze dwa stany elektronowe AmB, położone najniżej na skali energii, podstawowy i pierwszy wzbudzony to stany symetryczne typu  $A_g$ , stąd przejścia elektronowe pomiędzy nimi są wzbronione (Rys. 1.5)<sup>84</sup>.



**Rysunek 1.5:** Schemat poziomów energetycznych monomeru AmB, wraz z wykresem absorpcji AmB zmierzonej w temperaturze ciekłego azotu, w roztworze glicerol:etanol (1:1)<sup>83</sup>.

Co ciekawe, obecność poziomu wzbronionego w tym właśnie obszarze spektralnym, w większości przypadków uniemożliwia wręcz pomiary tej cząsteczki technikami emisji fluorescencji właśnie ze względu na znikomą wydajność kwantową emisji. Najniższe przejście dozwolone ze względu na reguły wyboru, które jednocześnie odpowiada za żółtą barwę amfoterycyny, to intensywne przejście z poziomu podstawowego  $A_g$  do elektronowego poziomu  $B_u$ . Przejście to jest bardzo charakterystyczne dla cząsteczek polienów. Posiada ono bardzo wyraźną progresję oscylacyjną, która w obniżonej temperaturze (np. ciekłego azotu) uwidacznia dodatkowo strukturę subtelną z tonami, nadtonami oraz tonami mieszanymi jak zaprezentowano to na tym samym rysunku. Charakterystyczna postać widma antybiotyku jest czuła na oddziaływanie chromoforu z innymi cząsteczkami i ulega natychmiastowej zmianie w przypadku asocjacji cząsteczek do wyższych form zagregowanych. W takim przypadku pojawia się wyraźne pasmo przy długości fal 320-340 nm, któremu towarzyszy zanik struktury oscylacyjnej. Ostatni z efektów jest spowodowany pojawianiem się szeregu przekrywających się poziomów ekscytonowych zależnych od siły oddziaływania, odległości pomiędzy cząsteczkami oraz wzajemnej orientacji oddziaływujących chromoforów. Amfifilowy charakter cząsteczki jest w szczególności odpowiedzialny za samoasocjację AmB. Badania tego typu były już oczywiście przedmiotem eksperymentów prowadzonych technikami fluorescencji stacjonarnej oraz czasowo-rozdzielczej, przez co umożliwiły

rozdzielenie form organizacyjnych AmB, które wykorzystywano później w dalszych etapach analizy danych, a prezentowanych w następnych rozdziałach rozprawy (Rys. 1.6). Analiza opierała się jak widać na identyfikacji poziomów energetycznych przy użyciu technik spektroskopowych: absorpcji i emisji światła, a także synchronicznego skanowania światłem rozproszonym. Kolejnym strukturom organizacyjnym antybiotyku przypisane zostały wartości czasów życia fluorescencji oraz odległości pomiędzy chromoforami tworzących je cząsteczek zaznaczone na tym samym rys. <sup>83,85</sup>.



Rysunek 1.6: Diagram poziomów energetycznych różnych form molekularnych AmB. β – energia oddziaływania dipol – dipol, τ – czas życia fluorescencji, R – odległość pomiędzy chromoforami, S<sub>0</sub> – podstawowy stan energetyczny, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> -singletowe stany wzbudzone, A – absorpcja, F – fluorescencja<sup>83</sup>.

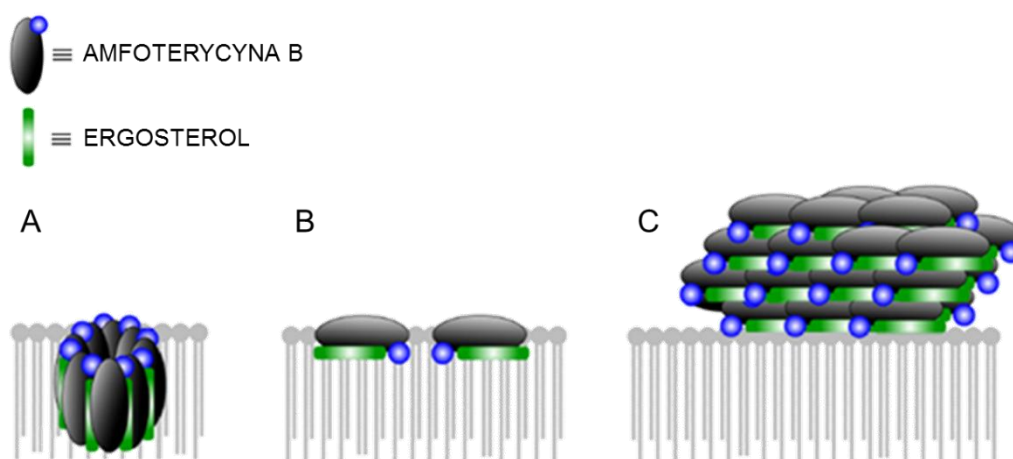
### 1.1.2 Mechanizm działania AmB

AmB stosowana jest w medycynie od ponad 60 lat, mimo iż molekularny mechanizm aktywności antybiotyku nie został jak dotąd szczegółowo wyjaśniony. Aktywność AmB powiązana jest z błonami lipidowymi, co nasuwa pytanie jak antybiotyk penetruje ścianę komórkową grzybów, dążąc do swojego celu molekularnego. Stosunkowo niedawno możliwość transportu AmB w postaci liposomalnej oraz połączonej z nanocząstkami złota do membrany, przypisano właściwościom lepkosprężystym ściany komórkowej<sup>86</sup>.

W literaturze znane są wyniki badań wskazujące na indukowanie stresu oksydacyjnego komórek, pod wpływem działania AmB. Antybiotyk po związaniu się z ergosterolem powoduje wytwarzanie reaktywnych form tlenu, które uszkadzają

białka, DNA, mitochondria oraz błonę, przez co prowadzą do śmierci komórkowej. W zależności od formuły, AmB oddziałuje także na układ immunologiczny, powodując ekspresję mediatorów zapalnych lub cytokin przeciwzapalnych<sup>43</sup>.

Najpowszechniejszą hipotezą molekularnego mechanizmu działania AmB jest model transbłonowych kanałów jonowych, które formowane są przez cząsteczki antybiotyku w obecności ergosterolu (Rys. 1.7A)<sup>87</sup>. Poprzez wytworzone pory w błonie komórkowej przedostają się jony oraz małe cząsteczki, co prowadzi do utraty potencjału elektrochemicznego komórki oraz zachwiania równowagi metabolicznej. Zaburzona integralność błony biologicznej prowadzi do śmierci komórki<sup>88</sup>. Struktura kanału nie została jeszcze wyznaczona doświadczalnie.



**Rysunek 1.7: Mechanizmy działania AmB. A – model kanałów błonowych, B – model adsorpcyjny na powierzchni błony, C – model „gąbki”.**

Kolejny postulowany mechanizm aktywności antybiotyku to model adsorpcyjny, w którym cząsteczki AmB lokują się na powierzchni błony, sekwestrując z niej ergosterol (Rys. 1.7B). Najnowszy proponowany mechanizm, oparty na wynikach badań spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, wskazuje na formowanie się zewnątrzkomórkowych agregatów amfoterycynowych odsysających sterol, czyli tzw. „gąbek”. Sekwestracja steroli, podobnie jak formowanie porów błonowych zaburza prawidłowe funkcjonowanie błony komórkowej prowadząc do jej śmierci<sup>5</sup>. Niewykluczone, że mechanizm działania AmB jest złożony, gdzie antybiotyk może formować kanały błonowe oraz ekstrahować sterole.



## 1.3 Techniki spektroskopowe

Podrozdział zawiera przegląd technik spektroskopowych, które zostały wykorzystane w niniejszej pracy doktorskiej. Obejmują one spektroskopię absorpcyjną, emisyjną oraz rozpraszania światła. Metody te, poprzez oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z materią oraz interpretację rejestrowanych widm pozwalają uzyskać informacje o budowie i własnościach badanego układu.

Absorpcja kwantów światła powoduje przejście cząsteczek z elektronowego stanu podstawowego do wzbudzonego, w którym są one niestabilne. Cząsteczki mogą powrócić do swojego stanu podstawowego wypromieniowując foton (fluorescencja, fosforescencja), poprzez emisję ciepła (konwersja wewnętrzna, relaksacja wibracyjna) lub transfer energii. Zjawisko rozpraszania ramanowskiego polega na zmianie częstotliwości promieniowania rozproszonego w stosunku do częstotliwości padającego na cząsteczki. Wymienione powyżej zjawiska fizyczne są wykorzystywane w spektrometrii.

Interpretacja wyników uzyskanych metodami spektroskopowymi w połączeniu z technikami mikroskopowymi, pozwala wnioskować o strukturze, organizacji molekularnej, przestrzennej orientacji, a także oddziaływaniach międzycząsteczkowych badanych molekuł.

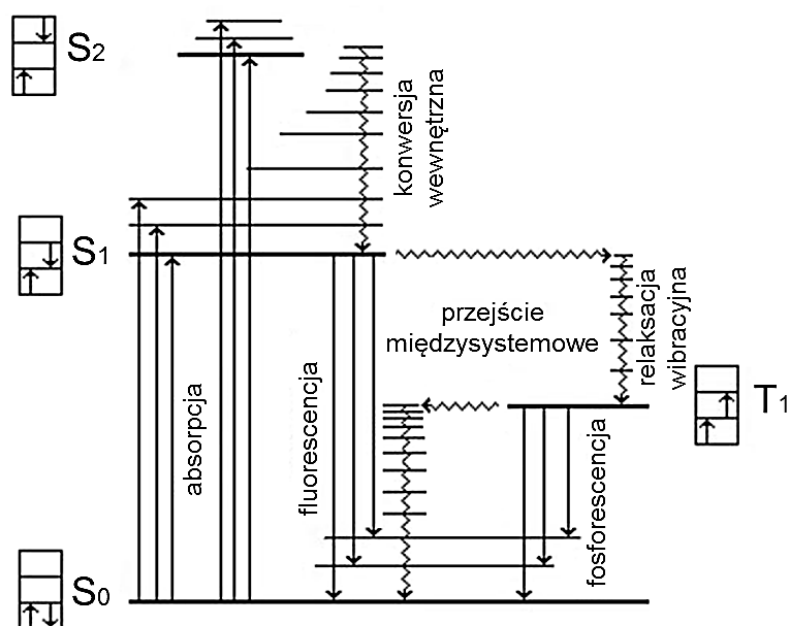
### 1.3.1 Fluorescencja

Zjawisko fluorescencji jest powszechnie wykorzystywane w naukach biologicznych, chemicznych oraz fizycznych. Dzięki swojej wysokiej selektywności oraz czułości detekcji, fluorescencja znalazła zastosowanie m.in. w diagnostyce medycznej, sekwencjonowaniu DNA, analizach genetycznych czy biotechnologii<sup>89</sup>.

Fluorescencja to emisja (uprzednio zabsorbowanego) fotonu, przez cząsteczkę przechodzącą z singletowego stanu wzbudzonego do stanu podstawowego. Obok fosforescencji, polegającej na emisji światła ze stanu tripletowego (elektrony posiadają zgodny zwrot spinu), zaliczana jest do zjawisk luminescencji, wywołanych pochłonięciem światła z obszaru UV-VIS oraz podczerwieni.

Kinetykę procesów pomiędzy absorpcją, a emisją światła szczegółowo opisuje diagram poziomów i przejść kwantowych opracowany przez Aleksandra Jabłońskiego w roku 1933 (Rys. 1.8)<sup>90</sup>. Chromofor cząsteczki absorbuje światło w wyniku czego, następuje przejście elektronowe do wzbudzonego poziomu

singletowego. Elektron na drodze przejścia międzysystemowego może znaleźć się w stanie tripletowym. Obniżenie energii może odbywać się na drodze radiacyjnej (fluorescencja, fosforescencja) lub poprzez zjawiska bezpromieniste: konwersję wewnętrzną lub relaksację wibracyjną. Konwersja wewnętrzna to przejście bezpromieniste pomiędzy stanami oscylacyjnymi przynależącymi do różnych poziomów elektronowych, natomiast relaksacja wibracyjna odbywa się pomiędzy stanami oscylacyjnymi tego samego poziomu elektronowego. W tabeli 1.1 przedstawiono skalę czasową opisanych procesów.



Rysunek 1.8: Diagram Jabłońskiego. S<sub>0</sub> - stan podstawowy, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> - singletowe stany wzbudzone, T<sub>1</sub> - tripletowy stan wzbudzony<sup>90</sup>.

Tabela 1.1: Średnia skala czasowa zjawisk promienistych i bezpromienistych.

Absorpcja	$10^{-15}$ s
Fluorescencja	$10^{-10}$ - $10^{-7}$ s
Konwersja wewnętrzna	$10^{-11}$ - $10^{-9}$ s
Przejście międzysystemowe	$10^{-10}$ - $10^{-8}$ s
Relaksacja wibracyjna	$10^{-12}$ - $10^{-11}$ s
Fosforescencja	$10^{-6}$ s - kilka min

Fluorescencję charakteryzuje niższa energia niż proces absorpcji, ponieważ energia wzbudzenia tracona jest poprzez przejścia bezpromieniste oraz wynika z faktu, że emisja najczęściej następuje z najniższego pasma oscylacyjnego stanu  $S_1$  do wyższych poziomów oscylacyjnych  $S_0$ . Przesunięcie maksimum pasma absorpcji względem pasma emisji, dla tego samego stanu wzbudzonego, nazywane jest przesunięciem Stokesa. Długości fali wzbudzającej nie wpływa na widmo emisji fluorescencji (reguła Kasy), a także na wydajność kwantową zjawiska<sup>89</sup>.

Do ważniejszych parametrów opisujących fluorescencję należą: czas życia fluorescencji oraz wydajność kwantowa. Wydajność kwantowa to stosunek liczby kwantów wyemitowanych w procesie emisji do zaabsorbowanych i opisuje ją wzór:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{pb}} \quad 1$$

gdzie,

$Q$ - wydajność kwantowa

$\Gamma$ - stała szybkości fluorescencji

$k_{pb}$ - stała szybkości procesów bezpromienistych

Czas życia fluorescencji ( $\tau$ ) to średni czas, przez jaki cząsteczka przebywa w stanie wzbudzonym i opisuje go następujący wzór:

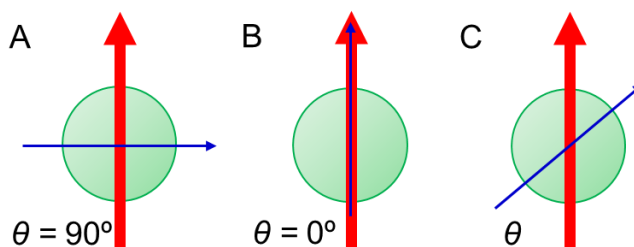
$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{pb}} \quad 2$$

### 1.3.2 Anizotropia fluorescencji

Pomiary anizotropii fluorescencji pozwalają uzyskać informacje o kształcie i rozmiarze molekuł, a także o sztywności badanego układu. Technika ta pozwala badać m.in. oddziaływania międzycząsteczkowe, płynność błon biologicznych oraz przestrzenną orientację cząsteczek dzięki znakowaniu tych podjednostek fluoroforami lub wykorzystaniu naturalnej fluorescencji.

Anizotropia fluorescencji opiera się na zjawisku fotoselekcji, polegającym na wzbudzaniu cząsteczek, których dipolowy moment przejścia posiada składową równoległą do orientacji wektora elektrycznego wzbudzającego światła spolaryzowanego (Rys. 1.9). Prawdopodobieństwo absorpcji jest proporcjonalne do  $\cos^2\theta$ , czyli kąta pomiędzy dipolowym momentem absorpcji cząsteczki, a kierunkiem

polaryzacji światła. Kwadrat dipolowego momentu przejścia określa prawdopodobieństwo wzbudzenia elektronu, stąd największe będzie charakteryzowało te cząsteczki, których moment przejścia jest równoległy do kierunku polaryzacji światła<sup>91</sup>.



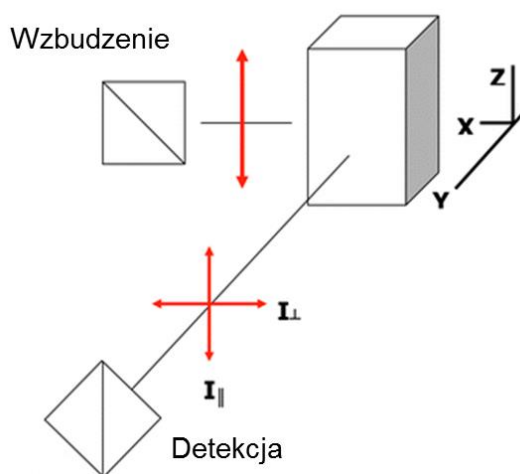
**Rysunek 1.9: Zjawisko fotoselekcji. Czerwona strzałka - kierunek polaryzacji światła wzbudzającego, strzałka niebieska - kierunek dipolowego momentu przejścia cząsteczki. A - brak absorpcji, B - absorpcja, C - absorpcja proporcjonalna do  $\cos^2\theta$ .**

Pomiar anizotropii fluorescencji, polega na detekcji intensywności fluorescencji, spolaryzowanej prostopadle ( $I_{\perp}$ ) oraz równoległe ( $I_{\parallel}$ ), względem polaryzacji światła wzbudzającego (Rys. 1.10). Wartość anizotropii obliczana jest za pomocą poniższego wzoru:

$$r = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2GI_{\perp}} \quad 3$$

$G$  - jest czynnikiem aparaturowym, korygującym czułość detektora na kierunek polaryzacji rejestrowanego światła

Wartość  $r$  dla ośrodków izotropowych zawarta jest w przedziale  $-0,2 \leq r \leq 0,4$ .



**Rysunek 1.10: Schemat przedstawiający układ pomiarowy anizotropii fluorescencji<sup>92</sup>.**

Wartość anizotropii może ulec zmniejszeniu w wyniku dyfuzji rotacyjnej molekuł. Taka rotacja cząsteczek przebywających w stanie wzbudzonym powoduje zmianę kierunku dipolowego momentu emisji fotonu, co skutkuje obniżeniem wartości anizotropii.

### 1.3.3 Zanik anizotropii fluorescencji

Pomiary depolaryzacji fluorescencji pozwalają także kontrolować proces wiązania się molekuł, np.: łączenia się receptora z ligandem czy białek<sup>89,93</sup>.

Zaniki anizotropii fluorescencji są wyznaczone pośrednio, poprzez pomiar zaników wertykalnie oraz horyzontalnie spolaryzowanej emisji fluorescencji. Oświetlenie próbki światłem spolaryzowanym powoduje wzbudzenie cząsteczek, których dipolowy moment absorpcji jest zorientowany równoległe do polaryzacji światła. Wzbudzone cząsteczki tracą swoją równoległą orientację przestrzenną, na skutek ruchów rotacyjnych Browna, jednocześnie powracając do podstawowego stanu energetycznego na drodze emisji<sup>91,94</sup>. Kierunek polaryzacji fluorescencji jest losowy w miarę upływu czasu, co określane jest mianem kinetyki anizotropii fluorescencji  $r(t)$ , opisywanej wzorem:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - GI_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2GI_{\perp}(t)} \quad 4$$

gdzie,

$I_{\parallel}(t)$  - zanik emisji fluorescencji spolaryzowanej równoległe do wektora elektrycznego światła wzbudzającego

$I_{\perp}(t)$  - zanik emisji fluorescencji spolaryzowanej prostopadle do wektora elektrycznego światła wzbudzającego

Zanik anizotropii fluorescencji informuje po jakim czasie (t), w badanym układzie anizotropia osiągnie wartość minimalną, według wzoru:

$$r(t) = r_0 e^{\frac{-t}{\tau_r}} \quad 5$$

gdzie,

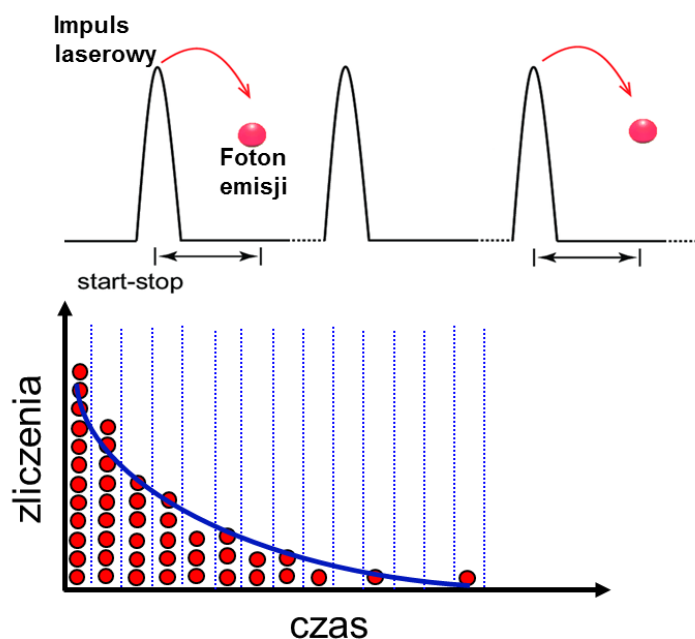
$r_0$  - początkowa wartość anizotropii układu

$\tau_r$  - czas korelacji rotacyjnej

### 1.3.4 Czasowo skorelowane zliczanie pojedynczych fotonów (TCSPC)

Czasowo rozdzielcza spektroskopia jest ważnym narzędziem badawczym, pozwalającym uzyskać o wiele więcej informacji o analizowanym układzie, niż zapewniają to badania stacjonarne fluorescencji.

Metoda pomiarowa w domenie czasowej (*ang.* time-domain) pozwala rejestrować krzywe zaniku fluorescencji, czyli spadek intensywności emisji w czasie. Technika TCSPC (*ang.* time-correlated single-photon counting) polega na wielokrotnym wzbudzeniu próbki impulsowym laserem, a następnie pomiarze czasu, po którym emitowany jest kwant fluorescencji przez cząsteczkę. Moment wysłania impulsu laserowego rozpoczyna pomiar (start) czasu, po którym zostanie zarejestrowany pierwszy foton emisji (stop). Na tej podstawie tworzony jest histogram, przedstawiający liczbę zliczeń fotonów pojawiających w konkretnym przedziale czasowym (Rysunek 1.11)<sup>89,95</sup>.



Rysunek 1.11: Schemat ilustrujący zasadę pomiaru w modzie TCSPC.

Do otrzymanego wykresu, wpisywana jest krzywa zaniku fluorescencji o charakterze eksponencjalnym, a na jej podstawie wyliczany jest średni czas życia fluorescencji według wzoru:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad 6$$

gdzie,

$I(t)$  - intensywność fluorescencji w czasie  $t$ ,  
 $\alpha_i$  - amplituda  $i$ -tej składowej danego czasu życia,  
 $\tau_i$  -  $i$ -ta składowa czasu życia

W przypadku gdy zanik intensywności fluorescencji ma charakter wieloeksponencjalny, średni czas życia fluorescencji  $\langle \tau \rangle$  można wyliczyć dwoma sposobami<sup>96</sup>. Według definicji średniego czasu życia po intensywnościach:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i} \quad 7$$

lub definicji średniego czasu życia, liczonego po amplitudach:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i} \quad 8$$

Ostatni ma zastosowanie w szczególnych przypadkach (np. transfer energii).

W pracy posługiwano się wzorem nr 8.

### 1.3.5 Mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM)

W ciągu ostatnich 60 lat większość odkryć naukowych bazowało na metodach obrazowania molekularnego. Zaawansowane techniki mikroskopii fluorescencyjnej miały szczególny wpływ na rozwój nauk przyrodniczych, a także medycyny<sup>97</sup>. Techniki mikroskopowe coraz śmielej wkraczają w obszar detekcji tych samych zjawisk na poziomie pojedynczych cząsteczek<sup>98-100</sup>. Detekcja tego typu należy do najwyższego poziomu precyzji przeprowadzonych eksperymentów.

FLIM (*ang.* Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) jest techniką, która obrazuje przestrzenne rozmieszczenie czasu życia fluorescencji w badanej próbce. Jako metoda nieinwazyjna, z powodzeniem stosowana jest w badaniach na żywych komórkach. Pierwsze wyniki uzyskane tą techniką zostały opublikowane w 1989 roku<sup>101</sup>.

Czas życia fluorescencji w sensie fizycznym, to czas potrzebny fluoforowi na zmniejszenie natężenia fluorescencji do wartości  $1/e$ , jego początkowej intensywności. Parametr ten nie zależy od: wydajności transmisji mikroskopu,

stężenia fluoroforu, intensywności światła wzbudzającego, co pozwala technikom bazującym na nim przewyższać te opierające się na pomiarze intensywności fluorescencji. Czas życia fluorescencji jest natomiast czuły na: zmiany pH, polarności, współczynnika załamania światła czy temperaturę środowiska, dzięki czemu znalazł bardzo szerokie zastosowanie w badaniach molekularnych<sup>102-104</sup>.

Wraz ze wzrostem liczby znaczników fluorescencyjnych dostępnych komercyjnie, czy bioindykatorów różnych procesów molekularnych, techniki obrazowania fluorescencyjnego ulegają dalszemu rozwojowi. Dotyczy to szczególnie metody FLIM, jako jednej z najważniejszych, służących do obrazowania fluorescencyjnego. Ogromne możliwości tej metody otworzyły się również wraz z pokonaniem granicy rozdzielczości optycznej co w roku 2014 zostało uhonorowane nagrodą Nobla. Obecnie coraz częściej w laboratoriach naukowych można spotkać mikroskopy oparte na technice 4Pi<sup>105,106</sup> oraz STED (*ang.* stimulated emission depletion)<sup>107</sup> lub komplementarnych PALM (*ang.* Photo-activated localization microscopy)<sup>108</sup> oraz STORM (*ang.* stochastic optical reconstruction microscopy)<sup>109</sup>.

### 1.3.6 Spektroskopia ramanowska

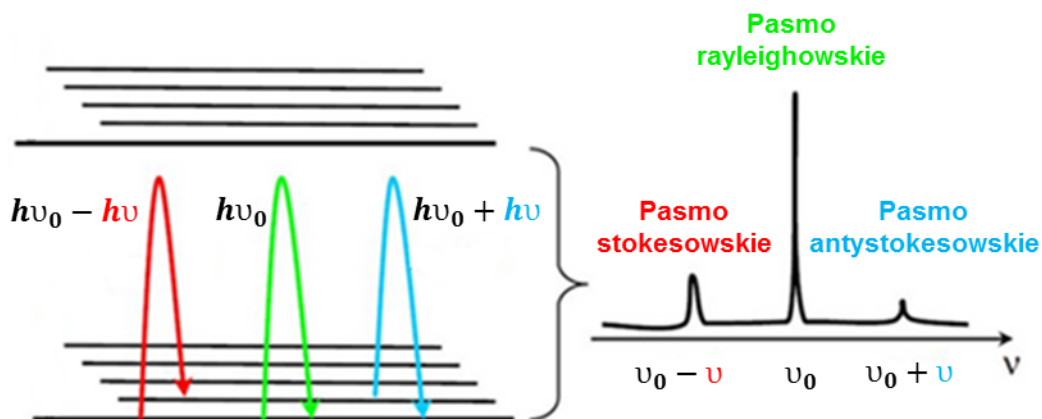
Spektroskopia ramanowska opiera się na nieelastycznym rozpraszaniu światła monochromatycznego. W technice tej częstotliwość fotonów światła wzbudzającego ulega zmianie po oddziaływaniu z badaną próbką. Częstotliwość światła rozproszonego jest przesunięta względem częstotliwości padającego na próbkę, co określane jest efektem Ramana. To przesunięcie niesie informację o przejściach oscylacyjnych oraz rotacyjnych zachodzących w cząsteczkach.

Monochromatyczne światło wzbudzające molekuly o częstotliwości  $\nu_0$ , zamienia je w oscylujące dipole, które mogą rozpraszać światło o różnych częstotliwościach<sup>110</sup>. W widmie światła rozproszonego można zaobserwować następujące pasma:

- pasma rayleighowskie - gdy foton (o częstotliwości  $\nu_0$ ) wzbudza cząsteczkę, która powraca do tego samego poziomu oscylacyjnego rozpraszając foton z niezmienną częstotliwością,
- pasma stokesowskie - gdy cząsteczka po wzbudzeniu przenosi się na wyższy poziom oscylacyjny, a foton rozproszony ma energię niższą o różnicę energii poziomów oscylacyjnych  $h\nu$ ,



- pasma antystokesowskie - gdy cząsteczka przed wzbudzeniem znajdowała się już na wzbudzonym poziomie oscylacyjnym, a powraca ona do niższego poziomu. Energia fotonu rozproszonego jest wyższa o różnicę energii poziomów oscylacyjnych  $h\nu$  (Rysunek 1.12).



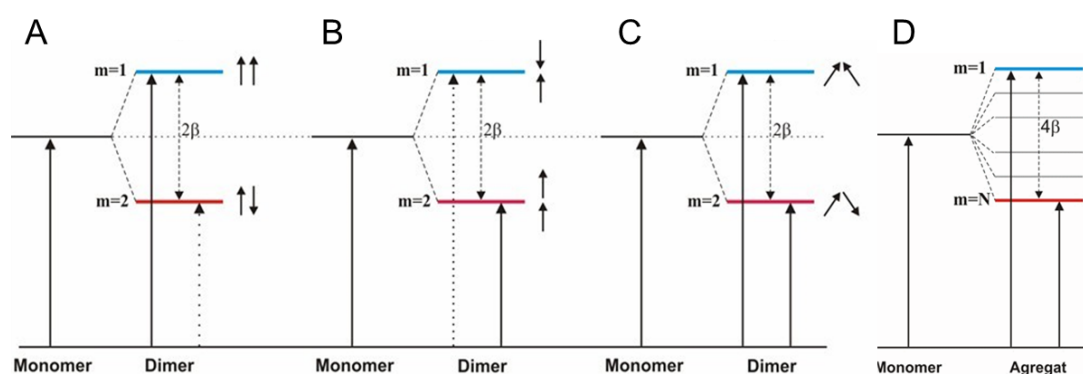
Rysunek 1.12: Rozpraszanie ramanowskie. Kolor czerwony - pasmo stokesowskie, kolor zielony - pasmo rayleighowskie, kolor niebieski - pasmo antystokesowskie<sup>111</sup>.

Konfokalna mikroskopia rozpraszania ramanowskiego pozwala zobrazować przestrzenne rozmieszczenie widm Ramana z charakterystycznymi pasmami oscylacyjnymi. Jako technika nieinwazyjna znalazła zastosowania w badaniach *in situ* oraz *in vivo*, w medycynie, chemii, czy badaniach archeologicznych<sup>112</sup>.

## 1.4 Oddziaływania molekularne

Oddziaływania między cząsteczkami, prowadzące do powstawania struktur wyżej zorganizowanych (typu dimery, trimery, tetrametry, itd.), powodują delokalizację energii wzbudzenia monomeru tworzącego wspomniane agregaty. W strukturach tych następuje sprzężenie stanów elektronowych, co powoduje rozszczepienie energii elektronowego stanu wzbudzonego i powstawanie nowych poziomów tzw. ekscytonowych. Teoria ta uwzględnia zazwyczaj rozpatrywanie energii oddziaływań międzycząsteczkowych w jej pierwszym przybliżeniu, jako oddziaływanie chwilowych momentów dipolowych monomerów<sup>113</sup>. Jest ono słuszne dla molekuł znajdujących się na tyle daleko od siebie, że nie występuje wzajemne przekrywanie się orbitali elektronowych oddziaływujących cząsteczek. W przeciwnym wypadku stosuje się oddziaływanie monopoli przejść, ale opis takich układów wymaga już obliczeń numerycznych.

Reguła Kasy zakłada, że orientacja dipolowych momentów przejść powodująca ich odpychanie, odpowiada przesunięciu poziomu wzbudzonego w stronę wyższych energii (kolor niebieski), natomiast wzajemne przyciąganie się dipolowych momentów przejść cząsteczek, prowadzi do przesunięcia w stronę niższych energii (kolor czerwony). Przejście zabronione (przerywana linia) występuje wtedy, gdy wektorowa suma dipoli wynosi zero. Struktury pasm ekscytonowych form zagregowanych przedstawia rysunek 1.13<sup>114</sup>.



**Rysunek 1.13:** Pasma ekscytonowe A - dimerów „typu H”, B - dimerów „typu J”, C- dimerów ułożonych ukośnie, D - wyższych agregatów.  $m=1$  - wyższy poziom ekscytonowy,  $m=2$  - niższy poziom ekscytonowy,  $\beta$  - energia oddziaływania dipoli. Linia przerywaną oznaczono przejścia zabronione.

Agregacja cząsteczek prowadzi do zmian w widmie absorpcji cząsteczek. W przypadku dimerów „typu H”, gdzie dipolowe momenty przejścia są ułożone względem siebie równolegle (Rys. 1.13, panel A), maksimum widma absorpcji ulega przesunięciu w stronę fal krótszych, jest to efekt hipsochromowy. Efekt batochromowy, czyli przesunięcie widma absorpcji w stronę fal dłuższych, obserwowany jest w przypadku dimerów „typu J”, w których dipolowe momenty przejścia są ułożone liniowo (jeden za drugim). W przypadku ukośnych orientacji dipoli lub oddziaływania ich większej liczby, obserwowane jest poszerzenie pasma absorpcji oraz występowanie szeregu przejść elektronowych jak to zaznaczono na rysunku w panelu D<sup>115</sup>.

## 2. Cel pracy

Celem przedłożonej pracy doktorskiej było poznanie mechanizmów molekularnych odpowiadających za toksyczne efekty antybiotyku przeciwgrzybiczego AmB. Podjęte badania miały na celu zrozumienie procesów zachodzących w komórkach grzybiczych oraz ludzkich wywołanych działaniem AmB, co potencjalnie pozwoliłoby zmniejszyć toksyczność tego antybiotyku, zachowując jednocześnie jego wysoką skuteczność terapeutyczną.

Liczne wyniki dotychczasowych badań potwierdzają, że miejscem działania antybiotyku jest membrana lipidowa. Z tego też powodu zdecydowano się przeprowadzić badania oddziaływania leku z modelowymi i naturalnymi błonami lipidowymi. Zrozumienia mechanizmów toksyczności antybiotyku poszukiwano poprzez eksperymenty przeprowadzone na gigantycznych liposomach oraz ludzkich liniach komórkowych. Ponadto, badano mechanizmy aktywności AmB wobec komórek drożdżaka *Candida albicans*.

W badaniach zastosowano metody mikroskopowe obejmujące techniki fluorescencyjne oraz rozpraszania ramanowskiego, zbierające informacje o lokalizacji i orientacji przestrzennej AmB względem błony biologicznej oraz jej organizacji molekularnej. Wykorzystano również techniki spektroskopowe i obliczenia metodami dynamiki molekularnej, a ostatnie przeprowadzono we współpracy z zespołem prof. J. Czuba z Politechniki Gdańskiej.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1 Materiały

W tabeli poniżej przedstawiono odczynniki chemiczne, które zostały wykorzystane w badaniach.

**Tabela 3.1: Spis odczynników chemicznych. Symbol % - oznacza czystość substancji (za wyjątkiem wyszczególnionych).**

Amfoterycyna B 80% Ergosterol 99% Cholesterol 99% Polilizyna o stężeniu 0,01% Tricine 99% DMSO 99,8% Fluoresceina 95% Surowicza albumina wołowa 98%	Sigma - Aldrich (USA)
DMPC >99% DPPC >99% POPC >99%	Avanti Polar Lipids (USA)
Chlorek potasu cz.d.a. Chloroform cz.d.a. Etanol 96% cz.d.a. Propan-2-ol 99,7% cz.d.a. Wodorotlenek potasu 98,8% cz.d.a. Kwas chlorowodorowy cz.d.a. Aceton 99,5% cz.d.a. Metanol 99,8%	POCH (Polska)
Ultraczysta bidestylowana woda Mili-Q (Oporność 18,2 MΩ×cm Przewodność 0,055 μS/cm)	Mereck Milipore (USA)

W preparatyce próbek zastosowano następujące roztwory chemiczne (Tabela 3.2.).

**Tabela 3.2: Wykaz roztworów chemicznych.**

Bufor Tricine pH 7,6	20 mM Tricine 10 mM KCl
Bufor PBS pH 7,4	10 mM PBS 137 mM NaCl 2,7 mM KCl
Faza ruchoma wysokosprawnej chromatografii cieczowej	propan-2-ol:woda (4:6 v/v)

Eksperymenty prowadzone były z zastosowaniem:

- modelowych błon lipidowych w postaci gigantycznych jednowarstwowych liposomów GUV (*ang.* giant unilamellar vesicles) formowanych w zależności od celu badawczego z fosfolipidów: DPPC, DMPC, POPC oraz ergosterolu i cholesterolu,
- linii komórkowych:
  - ludzkich komórek nabłonka jelita grubego, prawidłowych CCD 841 CoTr (ATCC No. CRL-1807) oraz I stadium nowotworowego HT-29 (ATCC No. HTB-38), dzięki uprzejmości dr. M. Pięta oraz prof. R. Paducha z Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS,
  - komórek jajnika chomika chińskiego CHO-K1 (RCB0285) zawierających transporter ABCA1, dzięki uprzejmości dr. T. Trombika z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego,
- drożdży *Candida albicans* (typ dziki), dzięki uprzejmości prof. A. Kędzia z Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku oraz prof. A. Zdybickiej-Barabas z Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS.

## 3.2 Metody

W badaniach dotyczących mechanizmów toksyczności AmB wykorzystano następujące techniki:

- wysokosprawną chromatografię cieczową,
- spektroskopię absorpcyjną UV-VIS,
- stacjonarną spektroskopię fluorescencyjną,
- spektroskopię czasów życia fluorescencji,
- mikroskopię obrazowania czasów życia fluorescencji,
- anizotropię fluorescencji,
- mikrospektroskopię fluorescencji,
- spektroskopię obrazowania ramanowskiego,
- elektroformację liposomów,
- syntezę nanocząstek srebra pokrytych AmB.

### 3.2.1 Wysokosprawną chromatografię cieczową HPLC

Izolat AmB (80%) pozyskany z bakterii *Streptomyces nodosus* wstępnie oczyszczano z produktów jej rozpadu oraz amfoterycyny A. W tym celu, 50 mg antybiotyku zawieszano w 200 ml mieszaniny chloroform:woda (stosunek objętościowy 1:1), po czym wytrząsano go przez 30 minut. Następnie, zbierano AmB zgromadzoną na granicy faz obu roztworów. Czynność powtarzano trzykrotnie. Kolejnym etapem było osuszenie leku za pomocą gazowego azotu. Tak przygotowaną próbkę zawieszano w roztworze DMSO (w przypadku badań na liniach komórkowych) lub poddawano dalszym etapom oczyszczania zawieszając AmB w fazie (izopropanol:woda). Następnie, do 2 ml roztworu AmB w fazie HPLC dodawano 20  $\mu$ l KOH o pH 12 (gwarantującego utrzymanie formy monomerycznej antybiotyku), próbkę wirowano z prędkością 14 000 obr/min przez 5 min oraz filtrowano (w celu usunięcia ewentualnych pozostałości agregatów AmB). W dalszych fazach oczyszczania, AmB rozdzielano przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (*ang.* high-performance liquid chromatography).

HPLC była ostatnim etapem oczyszczania antybiotyku. W tym celu, użyto HPLC-DAD Prominence Shimadzu (Japonia) z detektorem diodowym SPD-M20A. Do rozdzielania zastosowano kolumnę Thermo Scientific ODS C18 (250 mm $\times$ 4,6 mm, o uziarnieniu 5  $\mu$ m) oraz fazę ruchomą, którą stanowiła mieszanina izopropanolu

z odgazowaną wodą w stosunku objętościowym 4:6. Rozdziały przeprowadzono przy ciśnieniu 200–230 mBar, gdzie przepływ fazy ruchomej wynosił 0,6-0,7 ml/min. Antybiotyk oczyszczano w warunkach ciągłego pomiaru widma absorpcji oraz monitorowania poziomu absorbancji AmB (przy długości fali 408 nm), a także amfoterycyny A (przy 320 nm).

### 3.2.2 Spektroskopia absorpcyjna UV-VIS

Pomiary widm absorpcji amfoterycyny B, fluoresceiny oraz białka BSA wykonano przy użyciu spektrofotometru Cary 60 UV-VIS Agilent Technologies (Australia). Pomiary prowadzone były w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 1 cm, w temperaturze pokojowej.

Stężenia poszczególnych substancji określone były na podstawie wykładnika prawa Lamberta-Beera wyrażonego wzorem:

$$A = cx\varepsilon \quad 9$$

gdzie,

$A$  - absorbancja

$c$  - stężenie molowe [M]

$x$  - droga optyczna [cm]

$\varepsilon$  - molarny dziesiętny współczynnik ekstynkcji [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]

Tabela poniżej zawiera wartości współczynników ekstynkcji  $\varepsilon$  wyszczególnione dla badanych substancji.

**Tabela 3.3: Wartości molarnych dziesiętnych współczynników ekstynkcji.**

Substancja	Roztwór	$\varepsilon$ ( $\lambda$ ) [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]
Amfoterycyna B	izopropanol:woda (4:6, v/v)	130 000 (408 nm) <sup>116</sup>
	DMSO	121 400 (416 nm) <sup>117</sup>
Fluoresceina	woda	76 000 (490 nm) <sup>118</sup>
Białko BSA	bufor PBS	43 824 (280 nm) <sup>119</sup>

### 3.2.3 Spektroskopia fluorescencyjna

Widma emisji fluorescencji AmB rejestrowano z zastosowaniem spektrofotometru fluorescencyjnego Cary Eclipse Varian (Australia). Próbkę wzbudzana była przy długości fali 408 nm, a szerokość szczelin na drodze wzbudzenia oraz emisji fluorescencji wynosiła 5 nm.

### 3.2.4 Spektroskopia czasów życia fluorescencji

Pomiary zależności czasów życia fluorescencji fluoresceiny w funkcji wartości pH roztworu, czasów życia AmB zawieszanej w metanolu oraz AmB połączonej z białkiem BSA wykonano przy pomocy czasowo rozdzielczego spektrometru fluorescencyjnego FluoTime 300 PicoQuant (Niemcy). We wszystkich tych przypadkach stosowano laser półprzewodnikowy LDH-P-C-405 pracujący z częstotliwością 20 MHz, oraz filtry dichroiczne typu Notch 405 nm oraz transmitujące długości fal powyżej 430 nm. Rozdzielczość czasowa pomiarów wynosiła 4 ps. W pomiarach wykorzystano detektory typu płytka mikrokanalowa-fotopowielacz MCP-PMT (ang. microchannel plate-photomultiplier tube). Zaniki intensywności fluorescencji mierzono w zakresie długości fal 510-530 nm, przy kącie magicznym dla obserwacji emisji, a krzywe zaników dopasowywane były składowymi eksponencjalnymi.

Zaniki anizotropii fluorescencji rejestrowano przy wertykanej (V) oraz horyzontalnej (H) polaryzacji światła fluorescencyjnego. Czynniki aparaturowe (tzw. G-factor) korygowano stosując horyzontalnie spolaryzowane światło wzbudzające. W metodzie tej, obie orientacje polaryzatora emisyjnego są prostopadłe względem polaryzacji lasera wzbudzającego. Czynniki G wyliczono na podstawie wzoru:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad 10$$

gdzie,

$I_{HV}$  - intensywność fluorescencji przy horyzontalnej polaryzacji światła wzbudzającego oraz wertykalnej polaryzacji światła emisyjnego,

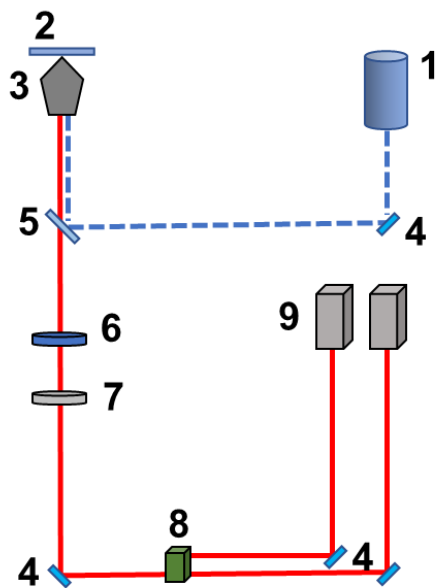
$I_{HH}$  - intensywność fluorescencji przy horyzontalnej polaryzacji światła wzbudzającego oraz światła emisyjnego



Czasy życia fluorescencji badano w modzie pomiarowym czasowo skorelowanego zliczania pojedynczych fotonów TCSPC – przy użyciu modułu PicoHarp 300. Uzyskane wyniki analizowane były przy pomocy programu EasyTau.

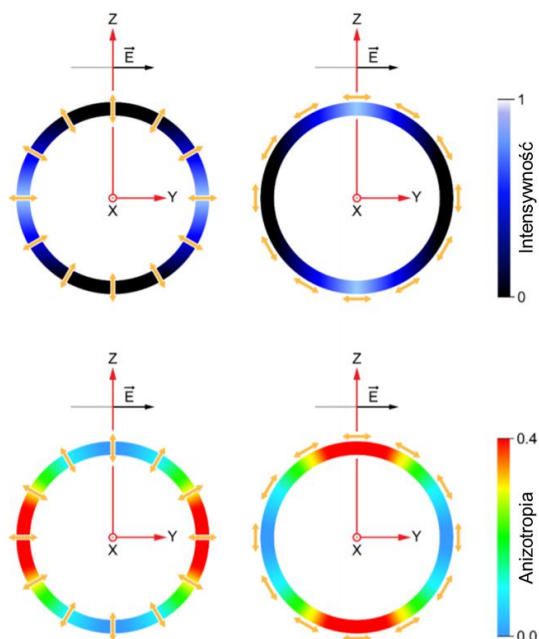
### **3.2.5 Mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM)**

Badania prowadzono przy użyciu system MicroTime 200 PicoQuant (Niemcy) połączonego z odwróconym mikroskopem Olympus IX71 (Japonia). Do pomiarów stosowano obiektyw wodny Olympus (o aperturze numerycznej (NA) 1.2, 60×) lub silikonowy obiektyw z immersją olejkową (NA 1.3, 60×). Próbki wzbudzano laserem o długości fali 405 nm (obserwacja emisji pochodzącej od AmB) lub o długości fali 440 nm (obserwacja emisji pochodzącej od fluoresceiny). Impulsy laserowe generowane były z częstotliwością 10 MHz. Rozdzielczość czasowa pomiarów wynosiła 16 ps. Obserwacje prowadzone były z wykorzystaniem następujących elementów optycznych: dichromatycznego filtra ZT 405RCD odbijającego światło wzbudzające w kierunku próbki, filtra typu Notch ZET405 StopLine oraz filtra transmitującego sygnał dla długości fal powyżej 430 nm (detekcja sygnału pochodzącego od AmB). Obrazowanie czasów życia fluoresceiny prowadzono z zastosowaniem dichromatycznego filtra SDDC440 oraz filtra pasmowego 520/35 nm. Wszystkie zastosowane filtry pochodziły z firmy Chroma-AHF Analysentechnik (Niemcy). W pomiarach stosowano przesłonę typu „pinhole” o średnicy 50  $\mu\text{m}$  lub 100  $\mu\text{m}$ . Fotony fluorescencyjne rejestrowano za pomocą detektorów, które stanowiły fotodiody lawinowe SPCM-AQRH-14-TR Excelitas Technologies. Schemat wykorzystywanego układu pomiarowego przedstawia rysunek 3.1. Otrzymane wyniki analizowano za pomocą dedykowanego oprogramowania SymPhoTime 64 v. 2.4 PicoQuant.



Rysunek 3.1: Schemat układu pomiarowego FLIM. 1 - laser, 2 - próbka, 3 - obiektyw, 4 - lustro, 5 - lustro dichromatyczne, 6 - filtr, 7 - przesłona typu „pinhole”, 8 - kostka polaryzacyjna, 9 - detektory.

Duża część badań oraz ich analiza dotyczyła polaryzacji fluorescencji. Metoda ta dostarcza informacji o orientacji przestrzennej molekuł, opisywanej parametrem anizotropii. W badaniach anizotropii emisji sygnał fluorescencyjny rozdzielano przy pomocy kostki polaryzacyjnej kierując go na dwa detektory, rejestrujące światło spolaryzowane prostopadłe  $I_{\perp}$  oraz równoległe  $I_{\parallel}$  względem światła wzbudzającego próbkę. Analizując intensywność fluorescencji oraz anizotropię fluorescencji można określić orientację AmB. Układy modelowe typu GUV pozwalają określić, czy cząsteczki antybiotyku wbudowują się do dwuwartstwy lipidowej, czy też lokują się na jej powierzchni. Zgodnie z zasadą fotoselekcji, z największym prawdopodobieństwem wzbudzone są cząsteczki zorientowane równoległe do wektora elektrycznego światła ( $\vec{E}$ ), z którym oddziałują. W przedstawionym układzie badawczym największa intensywność oraz anizotropia fluorescencji, występująca po bokach liposomów, wskazuje na wbudowywanie się AmB do błony lipidowej. Natomiast maksymalna wartość tych dwóch parametrów w górnej i dolnej części liposomu wskazuje na lokowanie się antybiotyku na powierzchni błony (Rysunek 3.2).



Rysunek 3.2: Schemat przedstawiający zjawisko fotoselekcji w układzie modelowych błon lipidowych typu GUW. Panel górny przedstawia przekroje przez liposomy zaprezentowane w skali intensywności fluorescencji, natomiast dolny, w skali anizotropii fluorescencji. Cząsteczki AmB (strzałki żółte) wbudowane w dwuwarstwę lipidową (strona lewa) oraz ułożone na powierzchni błony (strona prawa). Kierunek polaryzacji wektora światła wzbudzającego przedstawiono czarną strzałką oraz oznaczono jako  $\vec{E}$ .

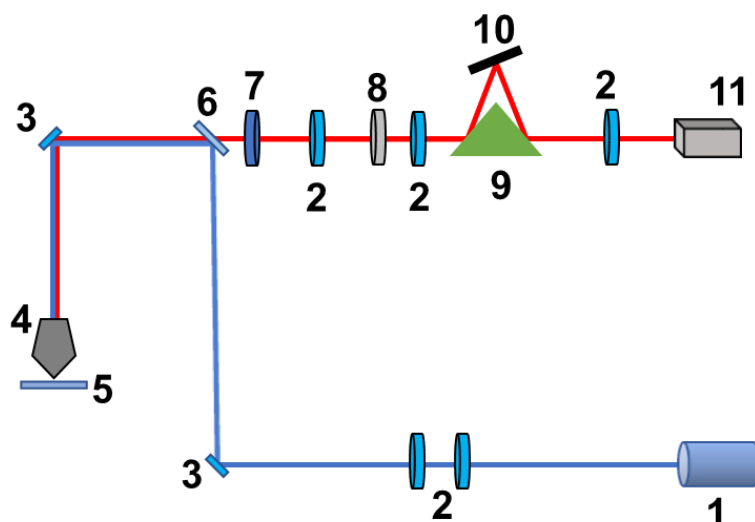
### 3.2.6 Mikrospektroskopia fluorescencji

Widma emisji fluorescencji w mikroskali rejestrowano przy użyciu spektrografu Shamrock 163 połączonego z systemem mikroskopowym MicroTime 200 (PicoQuant). Detekcja sygnału fluorescencyjnego odbywała się poprzez chłodzoną ( $-50^{\circ}\text{C}$ ) kamerę Newton EMCCD DU970P BUF, Andor Technology (Wielka Brytania) czującą na zliczanie pojedynczych fotonów. Badane próbki wzbudzone były impulsowym laserem o długości fali 405 nm z częstotliwością 10 MHz. Widma emisji z wybranego obszaru próbki rejestrowano jednocześnie przy użyciu aparatury do rejestracji czasów życia fluorescencji za pomocą lustra półprzepuszczalnego (50/50).

### 3.2.7 Spektroskopia obrazowania ramanowskiego

Obrazowanie ramanowskie przeprowadzono przy użyciu konfokalnego mikroskopu inVia Reflex Renishaw (Wielka Brytania) z zastosowaniem lasera Cobolt o8-NLD 405 nm, kamery EMCCD Newton 970 Andor Technology (Wielka Brytania) schłodzonej do temperatury  $-50^{\circ}\text{C}$  oraz obiektywu z immersją wodną (Olympus NA 1.2,  $60\times$ ). Widma ramanowskie, dla każdego punktu tworzonej mapy, rejestrowane

były przez 0,1 s w zakresie pomiarowym wynoszącym 953-3033  $\text{cm}^{-1}$  z rozdzielczością 1  $\text{cm}^{-1}$  (siatka dyfrakcyjna o 2400 linii/mm). Moc lasera w miejscu badanej próbki wynosiła 0,2 mW. Wyniki analizowane były z zastosowaniem techniki dekonwolucji DCLS przy pomocy oprogramowania Wire 4.4 Renishaw (Wielka Brytania). Poniżej przedstawiono schemat użytej aparatury pomiarowej.



Rysunek 3.3: Schemat blokowy przedstawiający konfokalny mikroskop ramanowski. 1 - laser, 2 - soczewka, 3 – lustro, 4 - obiektyw, 5 - badana próbka, 6 - lustro dichromatyczne, 7 - filtr typu Notch, 8 - przesłona typu „pinhole”, 9 – pryzmat, 10 - siatka dyfrakcyjna, 11 - kamera CCD.

### 3.2.8 Elektroformacja liposomów

Modelowe błony lipidowe tworzone były techniką elektroformacji<sup>120</sup>. Liposomy formowano z fosfolipidów DPPC, DMPC, POPC z dodatkiem (lub bez udziału) steroli, ludzkiego cholesterolu bądź grzybiczego ergosterolu. W tym celu, fosfolipidy (o stężeniu 20 mg/ml), lub fosfolipidy z 30 mol% sterolem nakładano na elektrody platynowe, po czym umieszczano je w próżni, gdzie przez godzinę odparowywano rozpuszczalniki. Następnie, elektrody pokryte filmem lipidowym umieszczano w kuwecie zawierającej bufor Tricine. W przypadku badania transportu jonów wodorowych elektrody takie umieszczano w wodzie o pH 8,0 (z 30 mM KCl oraz  $8,6 \cdot 10^{-6}$  M stężeniem fluoresceiny). Elektrody podłączano do sinusoidalnie zmiennego napięcia o wartości międzyszczytowej 3 V oraz częstotliwości zmian 10 Hz. Po godzinnej inkubacji próbki, do buforu dodawano AmB w roztworze DMSO, po czym inkubowano ją jeszcze przez następną godzinę. Elektroformacja prowadzona

była powyżej temperatury głównego przejścia fazowego fosfolipidów, odpowiednio 50°C (dla DPPC), 30°C (dla DMPC) oraz 24°C (dla POPC).

W przypadku badań organizacji molekularnej AmB w połączeniu z białkiem BSA, liposomy po godzinnej elektroformacji wytrząsano przez następną z kompleksem antybiotykowo-białkowym (AmB-BSA). Nośnik BSA wiązano z AmB wstrzykując antybiotyk zawieszony w DMSO do białka zawieszzonego w buforze PBS. W następnym kroku roztwór mieszano przez godzinę. Stosunek cząsteczkowy AmB do BSA wynosił 1:1. W celu usunięcia agregatów AmB, próbkę wirowano w warunkach 14000 g przez 10 min. Stężenie kompleksu białko-AmB dodawanego do liposomów określono na podstawie widm absorpcji. Wydajność tworzenia się tego kompleksu określano na podstawie porównania zaników anizotropii fluorescencji (wolnej AmB zawieszanej w metanolu oraz AmB związanej z białkiem).

### **3.2.9 Synteza nanocząstek srebra pokrytych AmB**

Tworzenie srebrnych nanocząstek otoczonych AmB przeprowadzano metodą redukcji chemicznej według procedury opisanej wcześniej w literaturze<sup>121</sup>. Metoda polega na rozpuszczeniu w wodzie prekursora będącego źródłem metalu, a następnie zobojętnieniu jonów metalu poprzez dodanie reduktora. Zobojętnione atomy metalu łączą się ze sobą tworząc nanocząstki. Po dodaniu stabilizatora otaczającego powstające nanocząstki, proces ten zostaje zatrzymany, co pozwala kontrolować wielkość tworzonych nanocząstek<sup>122</sup>.

W przypadku nanocząstek srebra pokrytych AmB, prekursorem był azotan srebra ( $\text{AgNO}_3$ ), natomiast AmB stanowiła jednocześnie reduktor oraz stabilizator. Wszystkie szklane naczynia laboratoryjne użyte w syntezie nanocząstek, zostały oczyszczone w wodzie królewskiej, a następnie obficie przepłukane ultraczystą wodą MiliQ. Oczyszczanie AmB odbywało się poprzez zawieszenie 50 mg antybiotyku w 200 ml mieszaniny chloroformu i wody w stosunku objętościowym 1:1. Tak przygotowaną mieszaninę wytrząsano przez 30 minut, a następnie zbierano antybiotyk zgromadzony na pograniczu faz obu roztworów. Już osuszoną AmB zawieszano w fazie HPLC i mieszano ze zalkalizowaną wodą (0,8 mg/ml KOH) do momentu osiągnięcia roztworu o wartości pH 12. W następnym kroku, 0,5 ml świeżo przygotowanego wodnego roztworu azotanu srebra (50  $\mu\text{moli}$ ) rozpuszczano w 21,5 ml odgazowanej wody, stale mieszając roztwór. Następnie kroplami dodawano 28 ml roztworu AmB (4,544  $\mu\text{moli}$ ) do zawiesiny  $\text{AgNO}_3$ . Całość mieszano

w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, chroniąc przed światłem. Synteza nanocząstek kontrolowana była poprzez pomiar widm absorpcji. Stosunek cząsteczkowy AmB do srebra wynosił 1:11.

Tak przygotowane nanocząstki z AmB dodawano do zawiesiny liposomów oraz komórek *Candida albicans*, a następnie badano je, stosując techniki obrazowania ramanowskiego oraz FLIM.

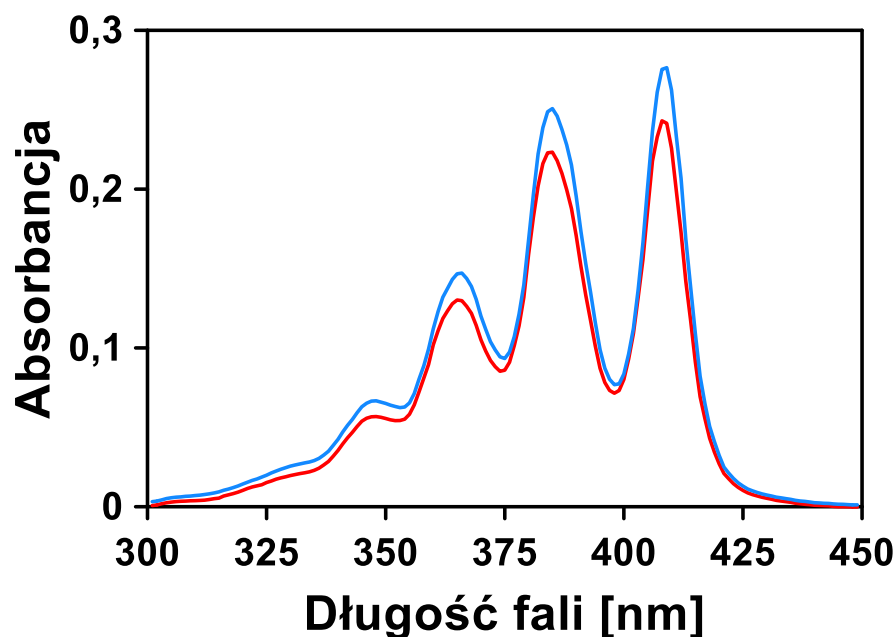
## 4. Wyniki badań

Eksperymenty przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wpisują się w nurt badań dotyczących mechanizmów działania AmB. Zastosowane techniki pomiarowe ukierunkowane oraz wrażliwe na określanie orientacji oraz organizacji cząsteczek, pozwoliły scharakteryzować oddziaływanie antybiotyku z komórkami ludzkimi oraz grzybiczymi. Szczegółowe wyniki badań zamieszczone w niniejszych podrozdziałach obrazują procesy zachodzące w błonach komórkowych, które jak przewidywałam związane są z aktywnością AmB.

### 4.1 Stabilność AmB

Techniki spektroskopowe, które wykorzystują oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z cząsteczkami dostarczają wielu cennych informacji o analizowanym układzie. Często nie bez wpływu pozostaje również efekt odwrotny, intensywności światła na własności badanych cząsteczek. Zastosowane źródło światła może zmieniać postać i własności badanych substancji na przykład powodując ich fotoizomeryzację.

Pierwszy etap eksperymentów obejmował więc kontrolę, czy wykorzystywane źródło światła wzbudzającego (405 nm) w jakikolwiek sposób wpływa na postać cząsteczki AmB. Zmiany monitorowano przy użyciu spektrofotometru do pomiaru widm absorpcji. W tym celu zarejestrowano widma pochłaniania AmB w roztworze izopropanol:woda (4:6) przed, oraz po godzinnym naświetlaniu próbki światłem laserowym o długości fali 405 nm. Wyniki doświadczenia przedstawione na rys. 4.1 wskazują jednoznacznie, że zarówno położenie głównych pasm absorpcji jak też ich wzajemne stosunki intensywności nie ulegają zmianie pod wpływem zastosowanego światła. Zauważono niewielki spadek intensywności dla wszystkich charakterystycznych maksimów pasm oscylacyjnych AmB, co przypisano fotodegradacji antybiotyku.

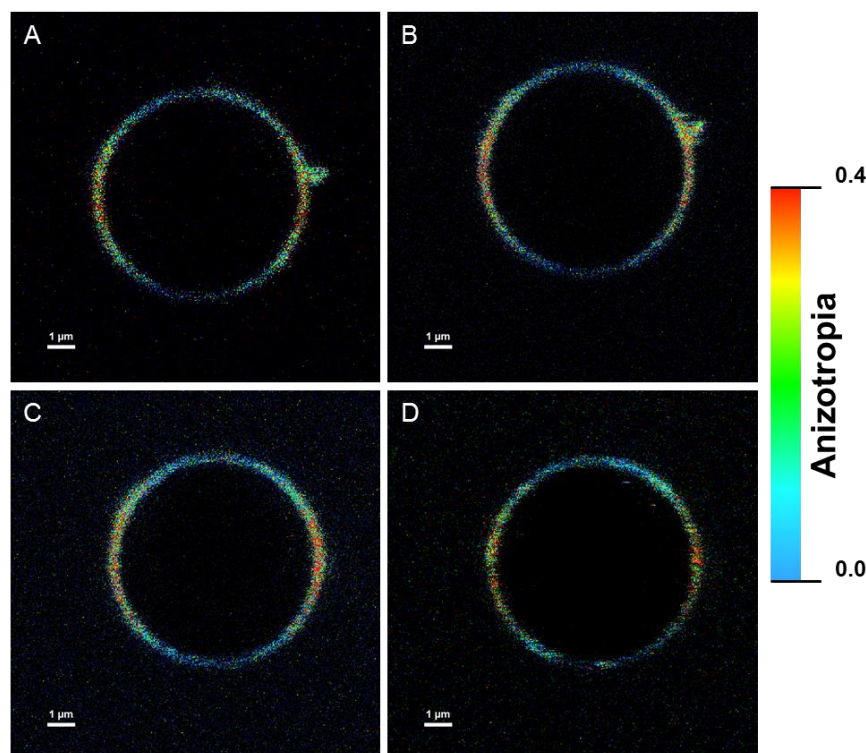


Rysunek 4.1: Widma absorpcji AmB w roztworze izopropanol:woda (4:6). Niebieski – widmo absorpcji AmB przed oświetleniem, czerwony – widmo absorpcji AmB po godzinie oświetlania próbki gólicą laserową o długości fali wzbudzenia 405 nm.

W następnym kroku sprawdzono, czy wzrost intensywności mocy światła laserowego ma wpływ na postać AmB w środowisku lipidowym, co potencjalnie mogłoby zmieniać jej orientację w błonie komórkowej. Badano anizotropię fluorescencji AmB w układzie liposomów uformowanych z fosfolipidu DPPC z dodatkiem 30 mol% ergosterolu. Rys. 4.2 przedstawia kolejne obrazy FLIM liposomu wybranego do analizy, wzbudzanego coraz to większą mocą światła laserowego. Wartości mocy wybranych do badań wskazano w podpisie pod rysunkiem. Najwyższa wartość anizotropii występująca po prawej i lewej stronie liposomów (zaznaczona na rysunku kolorem czerwonym) wskazuje, że AmB niezależnie od mocy zastosowanego światła laserowego wbudowana jest w dwuwarstwę lipidową.

Co charakterystyczne, zauważono odłączenie się fragmentu lipidowo-amfoterycynowego (widocznego na rys. 4.2AB po prawej stronie regularnej dwuwarstwy lipidowej) od powierzchni GUV dla wyższych wartości intensywności światła (rys. 4.2CD). Z reguły obserwowano efekty odwrotne, kiedy w miarę upływu czasu takie fragmenty osiadały na polilizynie i przyłączały się do GUV. Nie prowadzono dalszych badań w tym kierunku, ale być może skanowanie wyższą mocą lasera jest właśnie metodą na odłączanie tego typu „zanieczyszczeń”.



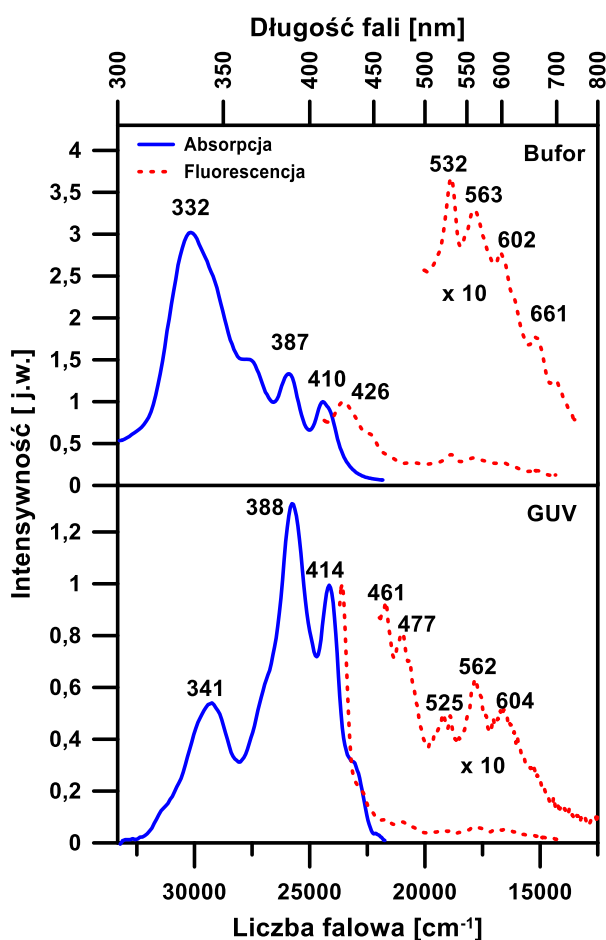


Rysunek 4.2: Obrazy FLIM liposomu uformowanego z fosfolipidu DPPC z 30 mol% ergosterolem przedstawione w skali anizotropii fluorescencji zebrane dla kolejnych, wzrastających mocy światła laserowego. A - moc lasera 0,8  $\mu\text{W}$ , B - moc lasera 2,4  $\mu\text{W}$ , C - moc lasera 4,8  $\mu\text{W}$ , D - moc lasera 24  $\mu\text{W}$ .

## 4.2 Amfoterycyna B w działaniu na modelowe błony lipidowe<sup>123</sup>

Aktywność AmB powiązana jest bezpośrednio z membranami lipidowymi<sup>124</sup>. Wysłunięto hipotezę, że sposób oddziaływania antybiotyku z lipidami może zależeć od jego organizacji molekularnej. W związku z powyższym, postanowiono zbadać oddziaływanie antybiotyku z modelowymi błonami biologicznymi. W celu określenia organizacji molekularnej leku na poszczególnych etapach transportu cząsteczek do błon biologicznych, przeprowadzono eksperymenty z AmB w roztworze wodnym oraz środowisku lipidowym. Porównano widma absorpcji oraz emisji fluorescencji AmB wprowadzanej w roztworze DMSO do buforu Tricine oraz do zawiesiny liposomów. Zastosowanie DMSO jako rozpuszczalnika zapewniało utrzymanie monomerycznej postaci leku przy jego wprowadzaniu. Zadbano, by stężenie DMSO w badanych próbkach było poniżej 0,7%. Liposomy formowane były z fosfolipidu DMPC w temperaturze 25°C.

Analizując widma absorpcji antybiotyku w środowisku buforowym i lipidowym stwierdzono, że najistotniejsza różnica pojawia się w obszarze krótkofalowym widma (Rys. 4.3). Obszar spektralny osiągający maksimum przy długości fali 332 nm został przypisany dużym skupiskom cząsteczek, tzw. agregatom AmB<sup>125</sup>. Intensywność tego pasma w roztworze wodnym była o wiele wyższa niż w środowisku lipidowym (GUV), co oznacza, że agregaty AmB efektywniej tworzą się poza błonami biologicznymi. Opierając się na wcześniejszych doniesieniach literaturowych możliwe było stwierdzenie, że główne pasma absorpcji AmB obserwowane w zawiesinie liposomów przy długościach fal: 341 nm oraz 388 nm odpowiadają: pasmom wzbudzenia dimerów równoległych (340 nm) oraz antyrównoległych (388 nm)<sup>83</sup>.



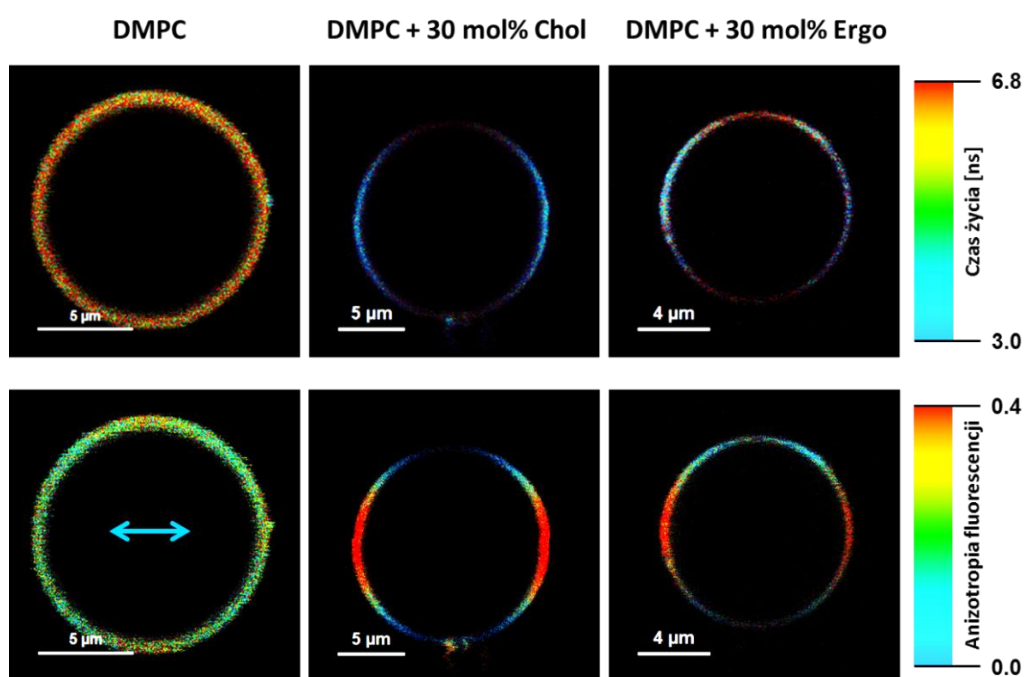
Rysunek 4.3: Widma absorpcji (niebieska ciągła) oraz emisji fluorescencji AmB (czerwona przerywana) w buforze (górny panel) oraz zawiesinie liposomów (dolny panel). Widma absorpcji zostały przedstawione według formuły  $(1 - T)$ , gdzie  $T$  - transmisja. Widma zostały znormalizowane przy długości fali 410 nm. Długofalowe fragmenty widma emisji fluorescencji zostały przedstawione w skali powiększonej ( $\times 10$ ). Na widmach oznaczono wierzchołki absorpcji oraz fluorescencji (wartości maksimum podano w nanometrach).

Aby określić, jakie formy AmB bezpośrednio oddziałują z membraną lipidową, analizowano pojedyncze pęcherzyki lipidowe uformowane z fosfolipidów DMPC, DPPC, POPC oraz z tych samych fosfolipidów z 30 mol% dodatkiem ergosterolu bądź cholesterolu. Dobór fosfolipidów charakteryzujących się różną długością łańcucha acylowego uwarunkowany był chęcią zbadania wpływu długości tego łańcucha na orientację przestrzenną antybiotyku w błonie. Spodziewano się, że różna grubość modelowej błony lipidowej może wpływać na efektywność kotwiczenia się antybiotyku w poprzek błony. Badania oparte na technice FLIM, anizotropii fluorescencji oraz emisji fluorescencji w mikroskali dostarczyły informacji o organizacji molekularnej oraz orientacji antybiotyku w wyżej wymienionych układach. Podejście badawcze oparte na obrazowaniu mikroskopowym w nanoskali (oraz systemie konfokalnym) zapewniało analizę mechanizmów molekularnych związanych z działaniem AmB bezpośrednio na lipid. Wynikało to z faktu, że cząsteczki leku obecne w próbkach, ale nieoddziałujące bezpośrednio z lipidami (np. w fazie wodnej) nie zakłócały analizy poszczególnych struktur błony lipidowej.

Rys. 4.4 - 4.6 ukazują przekroje poprzeczne liposomów w ich płaszczyźnie równikowej. W górnych panelach, pęcherzyki lipidowe zostały przedstawione w skali czasów życia fluorescencji zobrazowanej skalą kolorów. Dolne panele wspomnianych rysunków prezentują wyniki analiz polaryzacji emisji uzyskane dla tych samych liposomów w trakcie tego samego eksperymentu. Dla jasności prezentacji rezultatów badań zdecydowano, że omówienie wyników podzielone zostanie na dwie części dotyczące: czasów życia fluorescencji oraz anizotropii fluorescencji.

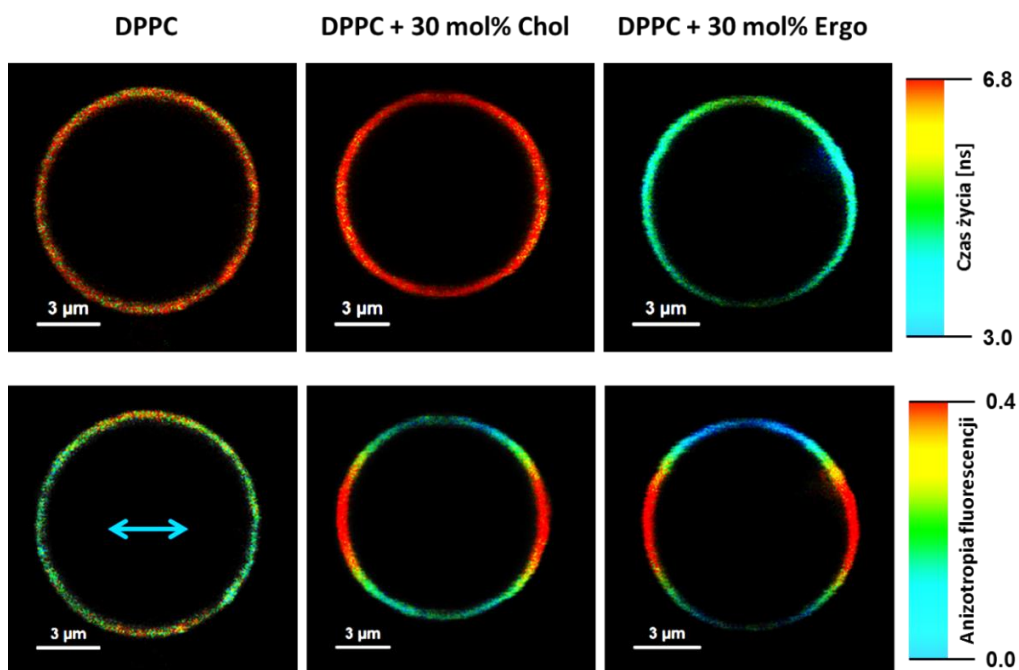
Różnice średnich wartości czasu życia emisji wskazują, że skład błony lipidowej, w tym obecność steroli, wpływa na organizację molekularną cząsteczek AmB. Z drugiej strony większość zarejestrowanych obrazów FLIM charakteryzowała się jednolitym rozkładem kolorów we wszystkich analizowanych układach, co oznaczało jednorodne rozmieszczenie form organizacyjnych AmB w błonie utworzonej z lipidów oraz błonie modyfikowanej sterolami. Analizę ilościową poszczególnych składowych układów organizacyjnych antybiotyku prowadzono w oparciu o badania wcześniejsze, dotyczące przypisania poszczególnym organizacjom molekularnym charakterystycznych wartości czasów życia fluorescencji<sup>83</sup>. Na podstawie wspomnianej analizy udało się wyodrębnić cztery główne postaci leku: monomeryczną, dimeryczną równoległą i antyrównoległą oraz

zagregowaną. Procentowy udział poszczególnych form molekularnych leku, którym przypisane są odpowiednie składowe czasów życia fluorescencji<sup>83</sup> przedstawiono na rys. 4.7. Krótkożyciowa składowa (0,35 ns) przypisana agregatom AmB, w środowisku lipidowym ulega wydłużeniu do wartości 0,6 ns, a komponent odpowiadający dimerom antyrównoległym po związaniu się z błoną lipidową, zmienia swój czas życia z 6,8 ns<sup>83</sup> na 9,0 ns. Monomery cząsteczek AmB charakteryzuje czas życia fluorescencji równy 3 ns, natomiast dimery równoległe 1,8 ns<sup>83</sup>.

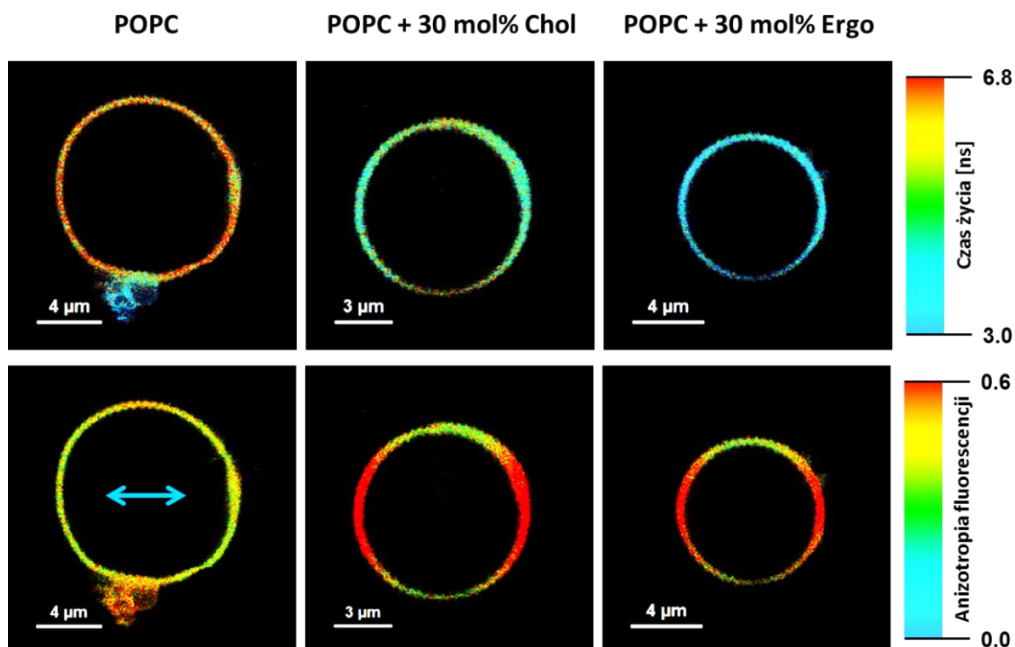


**Rysunek 4.4:** Obrazy uzyskane techniką FLIM przedstawiające liposomy zawierające AmB. Górny panel prezentuje liposomy uformowane z fosfolipidu DMPC, DMPC z dodatkiem cholesterolu oraz DMPC z dodatkiem ergosterolu. Barwna skala górnych paneli prezentuje rozkład średnich czasów życia fluorescencji (liczonych po intensywności), natomiast dolnych anizotropii fluorescencji. Niebieska strzałka wskazuje kierunek polaryzacji wektora elektrycznego światła wzbudzającego próbkę.

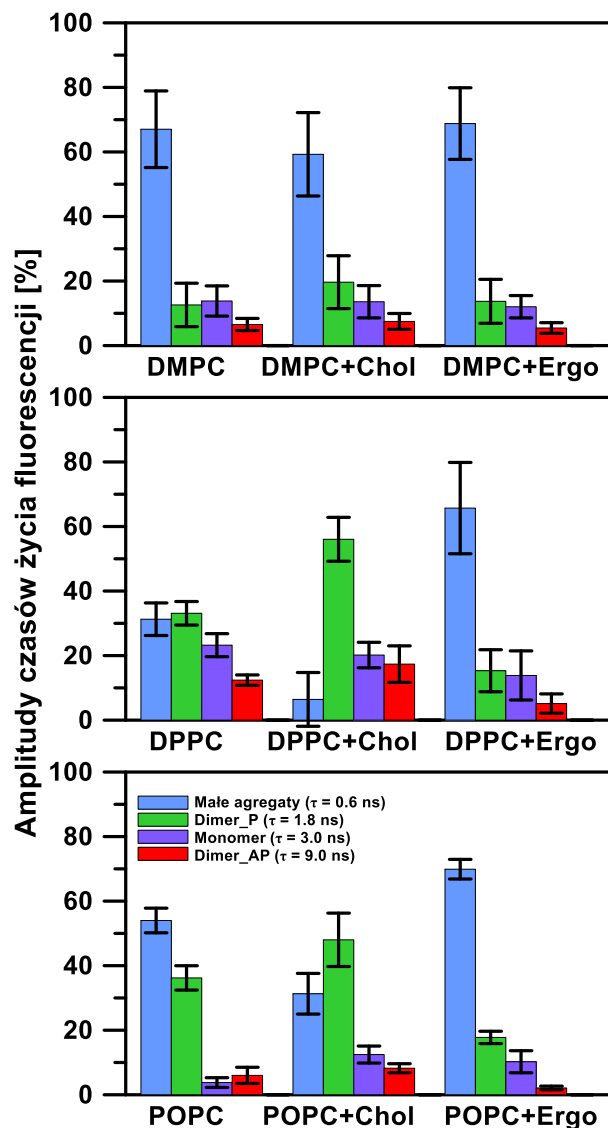
Analiza wartości amplitud (liczonych po intensywnościach) odpowiadających poszczególnym czasom życia fluorescencji wskazuje na dominację form zagregowanych AmB we wszystkich badanych układach, za wyjątkiem liposomów uformowanych z fosfolipidu DPPC oraz POPC zawierających w błonie cholesterol. W tych dwóch przypadkach znaczący jest udział dimerów równoległych AmB (Rys. 4.7).



Rysunek 4.5: Obrazy uzyskane techniką FLIM przedstawiające liposomy zawierające AmB. Górny panel prezentuje liposomy uformowane z fosfolipidu DPPC, DPPC z dodatkiem cholesterolu oraz DPPC z dodatkiem ergosterolu. Barwna skala górnych paneli prezentuje rozkład średnich czasów życia fluorescencji (liczonych po intensywności), natomiast dolnych anizotropii fluorescencji. Niebieska strzałka wskazuje kierunek polaryzacji wektora elektrycznego światła wzbudzającego próbkę.



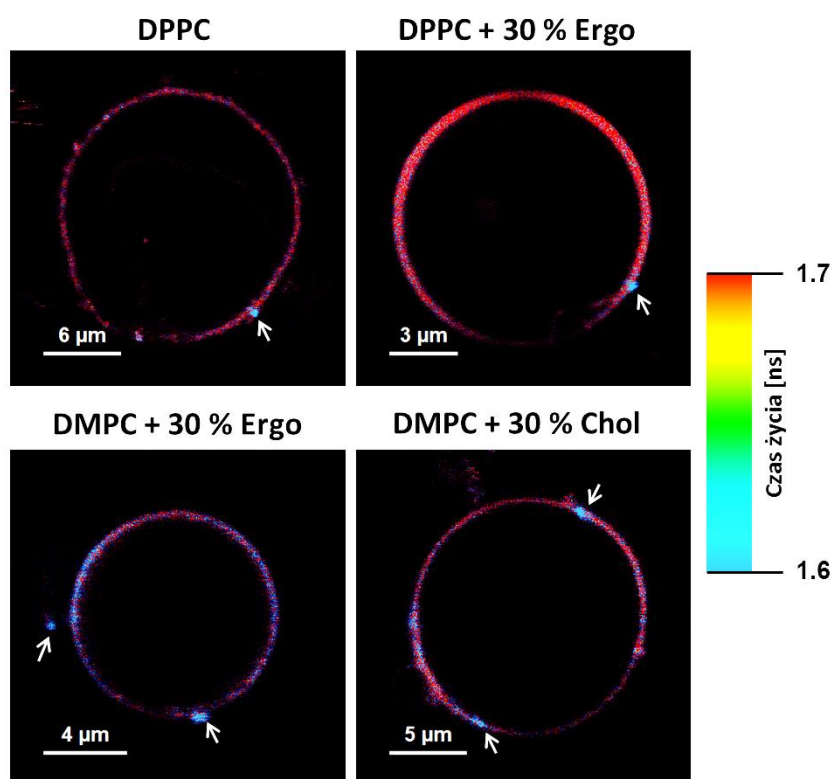
Rysunek 4.6: Obrazy uzyskane techniką FLIM przedstawiające liposomy zawierające AmB. Górny panel prezentuje liposomy uformowane z fosfolipidu POPC, POPC z dodatkiem cholesterolu oraz POPC z dodatkiem ergosterolu. Barwna skala górnych paneli prezentuje rozkład średnich czasów życia fluorescencji (liczonych po intensywności), natomiast dolnych anizotropii fluorescencji. Niebieska strzałka wskazuje kierunek polaryzacji wektora elektrycznego światła wzbudzającego próbkę.



Rysunek 4.7: Procentowy udział poszczególnych frakcji organizacyjnych AmB w liposomach uformowanych z DMPC (górny panel), DPPC (środkowy panel), POPC (dolny panel). Pęcherzyki lipidowe tworzą z fosfolipidów oraz fosfolipidów z 30 mol% dodatkiem cholesterolu lub ergosterolu. Cztery składowe czasów życia fluorescencji, którymi dopasowywano krzywe zaniku intensywności emisji 0.6, 1.8, 3.0, 9.0 ns przypisano odpowiednio; małym agregatom, dimerom równoległym (dimer\_P), monomerom oraz dimerom antyrównoległym AmB (dimer\_AP). Wyniki przedstawione są jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SD z 7-15 eksperymentów.

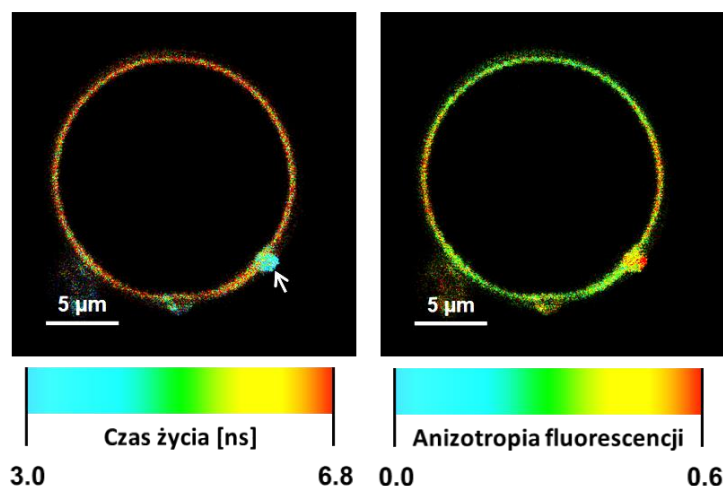
Należy wspomnieć, że odnotowano również przypadki formowania się nanostruktur zagregowanych form AmB, charakteryzujących się stosunkowo krótkim (poniżej 1 ns) czasem życia fluorescencji, wskazane na rys. 4.8 strzałkami. Obszary takie przypisano obecności dużych agregatów molekularnych AmB, które to najprawdopodobniej obserwowane były również w badaniach prowadzonych przez Andersona i innych<sup>5</sup>. Interpretowali je oni jako „gąbki” odsysające sterole z błony, co

w dalszych krokach miało prowadzić do dysfunkcji takiej błony. Co istotne, w przypadku liposomów utworzonych z POPC z dodatkiem cholesterolu (Rys. 4.9) zaobserwowano podobne struktury tego typu. Cechowały się one wysoką wartością anizotropii fluorescencji i składową czasu życia emisji równą 0,6 ns. Wydłużenie tego czasu (w stosunku do obserwowanego wcześniej 0,35 ns) może świadczyć o tym, że w skład takich struktur oprócz AmB wchodziły także lipidy lub lipidy oraz sterole. Różnice obserwowane dla składowej czasu życia fluorescencji układów badawczych zawierających sterole sugerują, że ostatnie nie tylko zmieniają rozkład cząsteczek AmB pomiędzy formami organizacyjnymi, ale również wpływają na samą organizację leku, najprawdopodobniej poprzez tworzenie heterokompleksów z AmB, a zatem wpływając na odległości między chromoforami. Wniosek ten poparty jest symulacjami przeprowadzonymi metodami dynamiki molekularnej zespołu badawczego prof. Jacka Czuba. Taki wniosek nasuwa się również z analizy widm absorpcji (Rys. 4.3 panel górny). Duże zagregowane struktury uformowane z czystej AmB i dające wkład w intensywność pasma w obszarze 330 nm pojawiają się jedynie w znikomej ilości w widmie absorpcji zawiesiny liposomów (Rys. 4.3 panel dolny).



**Rysunek 4.8:** Obrazy FLIM wybranych liposomów zawierających AmB. Strzałkami oznaczono struktury charakteryzujące się krótkim czasem życia fluorescencji, który odpowiada agregatom AmB.

### POPC+ 30 mol% Chol



**Rysunek 4.9:** Obraz FLIM oraz anizotropii fluorescencji liposomu zawierającego AmB. Strzałką oznaczono strukturę charakteryzującą się krótkim czasem życia fluorescencji, który odpowiada agregatom AmB utworzonym prawdopodobnie przy współudziale fosfolipidów i sterolu.

Anizotropia fluorescencji to technika, która pozwala określić przestrzenną orientację cząsteczek względem normalnej do błony lipidowej. Jak już wspomniano, dolne panele rys. 4.4 – 4.6 przedstawiają obrazy liposomów rozpięte w skali kolorów anizotropii fluorescencji. We wszystkich badanych układach zawierających sterole, cząsteczki antybiotyku wbudowują się w dwuwarstwę lipidową, natomiast w przypadku liposomów utworzonych z samych fosfolipidów, AmB lokuje się na powierzchni błony. Świadczy o tym wysoka wartość anizotropii emisji oznaczona kolorem czerwonym w odpowiednich regionach pęcherzyków lipidowych<sup>126</sup>. Wyliczono dokładną, przestrzenną lokalizację poszczególnych form AmB<sup>126</sup> we wszystkich badanych układach. W tabeli 4.1 zestawiono średnie wartości orientacji dipolowego momentu przejścia AmB w błonie lipidowej względem normalnej do powierzchni błony.

Średnia wartość kąta dla małych agregatów (trimer/tertamer) AmB w liposomach uformowanych jedynie z fosfolipidów jest bliska wartości kąta magicznego ( $54,7^\circ$ ), co z jednej strony może świadczyć o takiej właśnie orientacji względem normalnej do płaszczyzny błony, ale bardziej prawdopodobną sytuacją jest swobodna orientacja tych cząsteczek względem błony lipidowej. Luźne związanie agregatów AmB z membraną niezawierającą steroli potwierdzają także obliczenia uzyskane metodami dynamiki molekularnej. Zmniejszenie wartości kąta orientacji w błonach zawierających sterole, jest konsekwencją wbudowywania się form

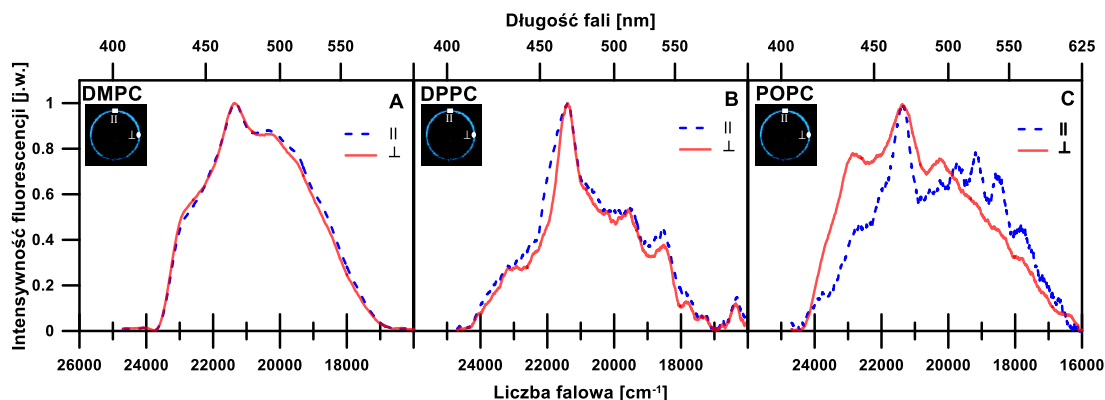


zagregowanych antybiotyku w dwuwarstwę lipidową. Co interesujące, w przypadku liposomów utworzonych z POPC zawierających cholesterol, zaobserwowano wzrost wartości kąta dla wszystkich form AmB, co może wskazywać na specyficzne oddziaływanie leku z hydrofilowymi głowami fosfolipidowymi i przyjmowanie lateralnej orientacji względem błony.

**Tabela 4.1: Wartości kąta [°] zawartego pomiędzy dipolowym momentem przejścia cząsteczki AmB w różnej formie organizacyjnej antybiotyku, a normalną do powierzchni błony lipidowej. Wyniki prezentują średnie arytmetyczne  $\pm$  SD zebrane dla 3-9 eksperymentów.**

Układ \ Forma	Trimer / tetramer	Dimer równoległy	Monomer	Dimer antyrównoległy
DPPC	56,6 $\pm$ 3,7	58,8 $\pm$ 4,6	57,0 $\pm$ 4,0	57,3 $\pm$ 4,7
DPPC + Ergo	47,5 $\pm$ 4,8	49,8 $\pm$ 5,3	50,9 $\pm$ 3,8	48,1 $\pm$ 7,8
DPPC + Chol	51,0 $\pm$ 5,2	46,9 $\pm$ 4,3	46,9 $\pm$ 5,6	51,9 $\pm$ 5,2
DMPC	54,0 $\pm$ 1,6	46,8 $\pm$ 1,4	54,8 $\pm$ 3,5	56,5 $\pm$ 3,9
DMPC + Ergo	42,7 $\pm$ 2,3	56,9 $\pm$ 2,6	57,3 $\pm$ 4,7	56,6 $\pm$ 5,4
DMPC + Chol	49,5 $\pm$ 5,8	43,6 $\pm$ 6,9	58,4 $\pm$ 3,7	60,4 $\pm$ 2,5
POPC	56,7 $\pm$ 3,0	53,0 $\pm$ 3,3	56,4 $\pm$ 3,2	53,7 $\pm$ 4,1
POPC + Ergo	49,9 $\pm$ 4,3	51,9 $\pm$ 8,9	49,5 $\pm$ 6,7	49,9 $\pm$ 5,5
POPC + Chol	59,3 $\pm$ 5,6	58,6 $\pm$ 6,7	56,9 $\pm$ 4,6	58,0 $\pm$ 5,3

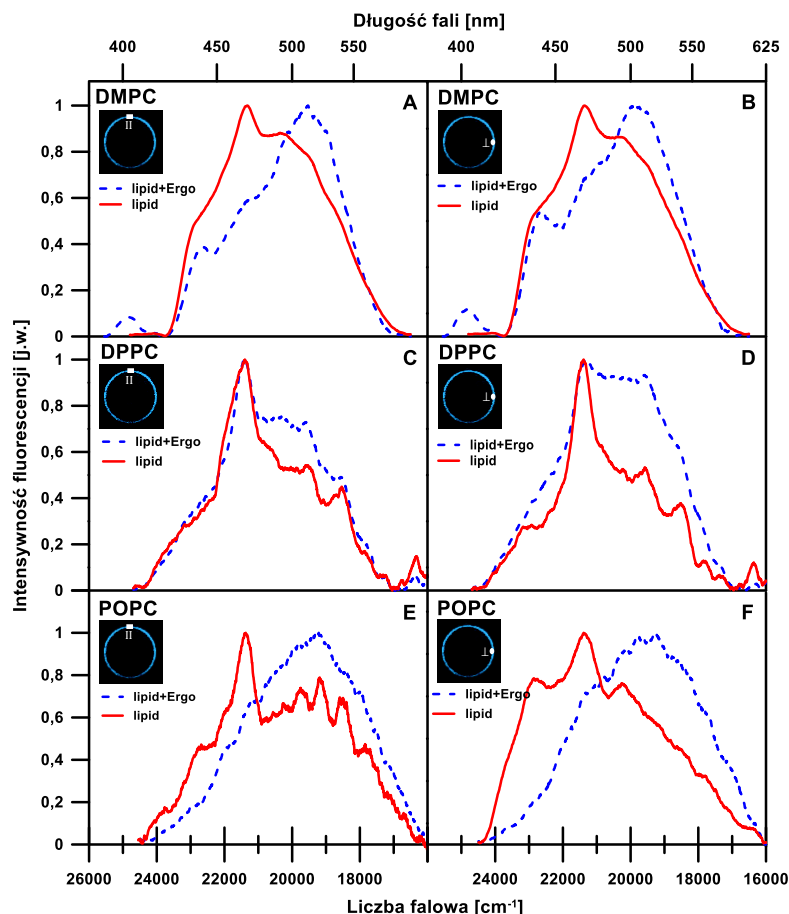
Przeprowadzono wnikliwą analizę cząsteczek antybiotyku zorientowanych wertykalnie oraz horyzontalnie względem dwuwarstwy lipidowej. W tym celu wykorzystano zjawisko fotoselekcji, które pozwoliło na zarejestrowanie widm emisji fluorescencji dla frakcji AmB ułożonej równoległe oraz prostopadle do płaszczyzny błony lipidowej. Widma obu frakcji są bardzo podobne w przypadku liposomów utworzonych z DMPC (Rys. 4.10A) oraz DPPC (Rys. 4.10B), co potwierdza homogenną dystrybucję antybiotyku w błonach niezawierających steroli. Zmiany w widmach, zauważalne dla liposomów utworzonych z POPC (Rys. 4.10C), są spójne z różnorodną orientacją wszystkich form AmB dla tego układu, obserwowaną w przypadku analiz anizotropii fluorescencji.



**Rysunek 4.10:** Widma emisji fluorescencji AmB zarejestrowane w miejscu błony liposomów uformowanych z fosfolipidów DMPC (A), DPPC (B) oraz POPC (C). Widma zostały zarejestrowane z punktów oznaczonych na załączonych obrazach FLIM białą kropką. Punkty odpowiadają frakcjom cząsteczek AmB zorientowanym prostopadle ( $\perp$ ) (czerwona ciągła) oraz równoległe ( $\parallel$ ) (niebieska przerywana) względem płaszczyzny błony.

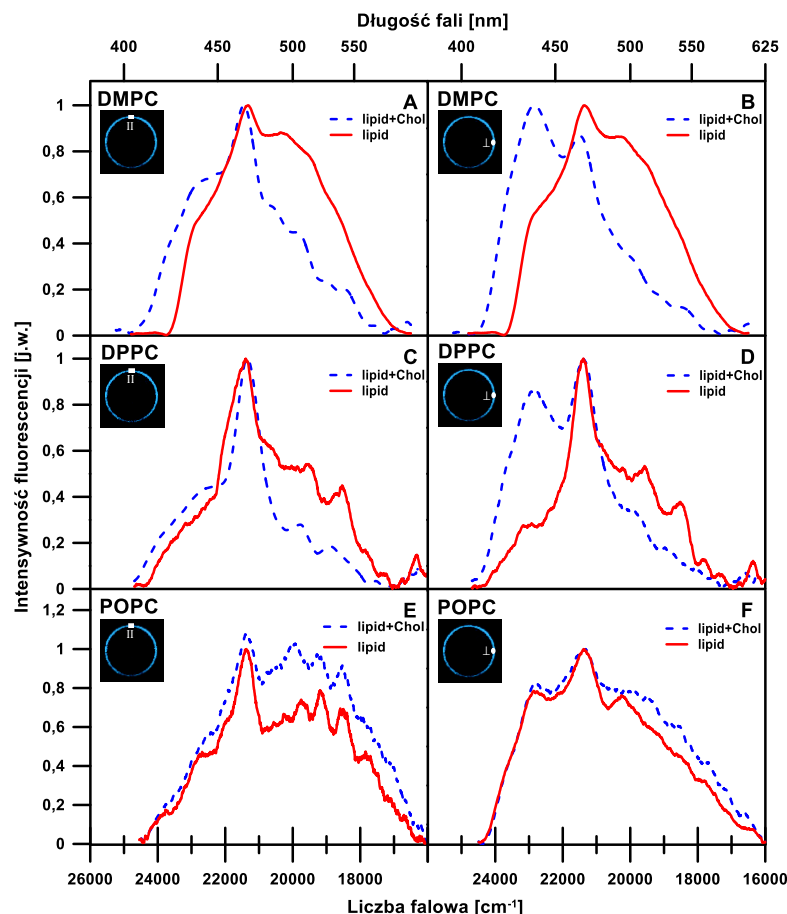
Maksimum emisji fluorescencji obserwowane przy długości fali  $\sim 460$  nm odpowiada emisji monomerów cząsteczek AmB z najniższego elektronowego wzbudzonego stanu singletowego (S1) do elektronowego stanu podstawowego (przejście 0-0)<sup>83</sup>. Różne kształty widm fluorescencji AmB obserwowane dla liposomów utworzonych z różnych fosfolipidów wynikają ze zróżnicowanej organizacji molekularnej leku w tych układach (Rys. 4.7). Zgodnie z teorią rozszczepienia ekscytonowego, emisja fluorescencji dla dużych agregatów AmB zachodzi w obszarze długofalowym. Widma przedstawione na rys. 4.10 wskazują na brak takich struktur w błonie lipidowej, co oznacza, że znajdują się one głównie w środowisku wodnym lub charakteryzują się znikomą wydajnością kwantową.

Istotne różnice w widmach fluorescencji dla frakcji AmB ułożonej równoległe oraz prostopadle względem błony lipidowej, odnotowano w układach zawierających sterole (Rys. 4.11, 4.12). W membranach zawierających ergosterol (Rys. 4.11) zauważono wzrost intensywności pasma w obszarze 460–550 nm, przypisanego małym agregatom AmB<sup>83</sup>. Struktury te w układzie DPPC + Ergo są zorientowane głównie prostopadle do płaszczyzny błony (Rys. 4.11D).



Rysunek 4.11: Widma emisji fluorescencji AmB zarejestrowane w miejscu błony liposomów uformowanych z fosfolipidów DMPC (A, B), DPPC (C, D) oraz POPC (E, F). Widma oznaczone linią czerwoną ciągłą odpowiadają emisji fluorescencji AmB w liposomach utworzonych z fosfolipidu, natomiast linią niebieską przerywaną w liposomach z fosfolipidów oraz 30 mol% dodatkiem ergosterolu. Widma zostały zarejestrowane z punktów oznaczonych na obrazach FLIM białą kropką. Punkty odpowiadają frakcjom cząsteczek AmB zorientowanym równolegle (||) (A, C, E) oraz prostopadle (⊥) (B, D, F) względem płaszczyzny błony.

W układach zawierających cholesterol (Rys. 4.12) zaobserwowano natomiast pojawienie się intensywnego pasma w obszarze 416–455 nm, odpowiadającego dimerom AmB. Niewielkie zmiany widm emisji fluorescencji w obecności cholesterolu dla AmB ułożonej wertykalnie w błonach POPC (Rys. 4.12F) świadczą o charakterystycznym oddziaływaniu antybiotyku z warstwą hydrofilową membrany.



**Rysunek 4.12:** Widma emisji fluorescencji AmB zarejestrowane w miejscu błony liposomów uformowanych z fosfolipidów DMPC (A, B), DPPC (C, D) oraz POPC (E, F). Widma oznaczone linią czerwoną cięgią odpowiadają emisji fluorescencji AmB w liposomach utworzonych z fosfolipidu, natomiast linią niebieską przerywaną w liposomach z fosfolipidów oraz 30 mol% dodatkiem cholesterolu. Widma zostały zarejestrowane z punktów oznaczonych na obrazach FLIM białą kropką. Punkty odpowiadają frakcjom cząsteczek AmB zorientowanym równolegle (||) (A, C, E) oraz prostopadle (⊥) (B, D, F) względem płaszczyzny błony.

Komplementarna analiza wyników przeprowadzona dla czasów życia fluorescencji, widm emisji i orientacji molekularnej AmB prowadzi do wniosku, że obecność steroli w fazie lipidowej sprzyja włączaniu leku do błony nawet w postaci małych agregatów. Taki mechanizm wydaje się mieć ogromne znaczenie biologiczne, a jego konsekwencją jest obecność struktur molekularnych wewnątrz błony, przez które może przebiegać proces niekontrolowanego transportu jonów. To indukowane sterolem uporządkowanie oligomerów AmB względem normalnej do dwuwarstwy lipidowej (zaobserwowane również w badaniach metodami dynamiki molekularnej) ułatwia wyciek jonów poprzez stabilizację porów transbłonowych utworzonych przez cząsteczki antybiotyku i steroli. Drugi z efektów jest bezpośrednio związany z własnościami fizycznymi fazy lipidowej, a w szczególności fazy zawierającej sterole

i był przedmiotem osobnych badań techniką kalorymetrii różnicowej. Zaobserwowano utratę kooperacji głównego przejścia fazowego. To sugeruje, że małe agregaty molekularne AmB mogą być odpowiedzialne za aktywność biologiczną tego leku poprzez dezintegrację błony grzybów zawierających ergosterol i oddziaływanie z ludzkimi błonami komórkowymi zawierającymi cholesterol. Orientacja cząsteczek AmB determinowana była obecnością sterolu w błonie. Nie zauważono zmian orientacji antybiotyku wynikających z długości łańcuchów acylowych.

Biorąc pod uwagę wyniki powyższych badań można stwierdzić, że preparaty antybiotyku AmB o zminimalizowanej toksyczności dla pacjentów, ale zachowujące aktywność farmakologiczną wobec grzybów powinny składać się z dimerów leku, które nie byłyby zdolne do tworzenia wyższych agregatów. Takie wymagania mogłyby być spełnione w układach dostarczania antybiotyku opartych na liposomach utworzonych z DPPC lub POPC zawierających cholesterol.

### **4.3 Amfoterycyna B w działaniu na ludzkie linie komórkowe<sup>127</sup>**

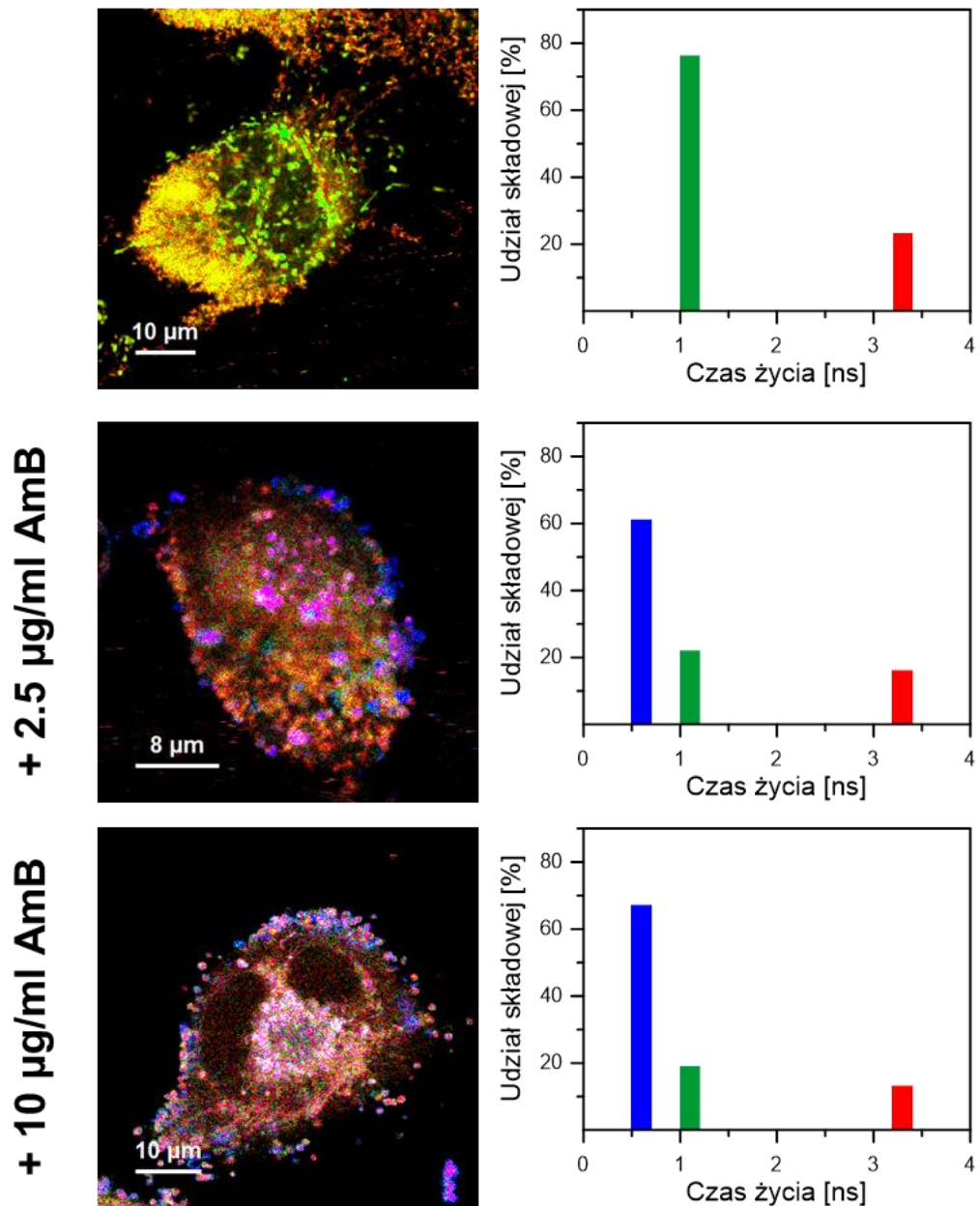
Mechanizm toksyczności AmB odnosi się do aktywności antybiotyku wobec komórek zawierających w swojej błonie cholesterol. Podjęto badania z zastosowaniem spektroskopii FLIM oraz obrazowania ramanowskiego, które pozwoliły uzyskać informacje o organizacji strukturalnej antybiotyku oraz jego lokalizacji w komórkach ludzkich. Ich celem było określenie, które formy antybiotyku odpowiadają za jego toksyczność. AmB wywołuje liczne efekty uboczne ze strony układu pokarmowego. Antybiotyk podawany jest także pacjentom w formie doustnej, dlatego zdecydowano się podjąć badania na ludzkich prawidłowych komórkach nabłonka jelita grubego (CCD 841 CoTr). AmB stosowana jest również u pacjentów onkologicznych, u których ze względu na obniżoną odporność występuje wysokie ryzyko wewnętrznych zakażeń grzybiczych<sup>128</sup>, dlatego też zbadano wpływ antybiotyku na ludzkie, nowotworowe komórki jelita grubego (HT-29).

Badania przeżywalności komórek w środowisku AmB wykazały, że stężenie antybiotyku powyżej 5 µg/ml pożywki hodowlanej było toksyczne dla obu linii komórkowych, przy czym stężenie AmB, które w 50% hamuje funkcje biochemiczne (IC<sub>50</sub>- *ang.* inhibitory concentration) dla komórek nowotworowych wynosiło 21,2 µg/ml, natomiast dla komórek prawidłowych 8,7 µg/ml. AmB dodawana była do

hodowli komórkowych w roztworze DMSO, którego ostateczne stężenie w pożywce nie przekraczało 0,25%.

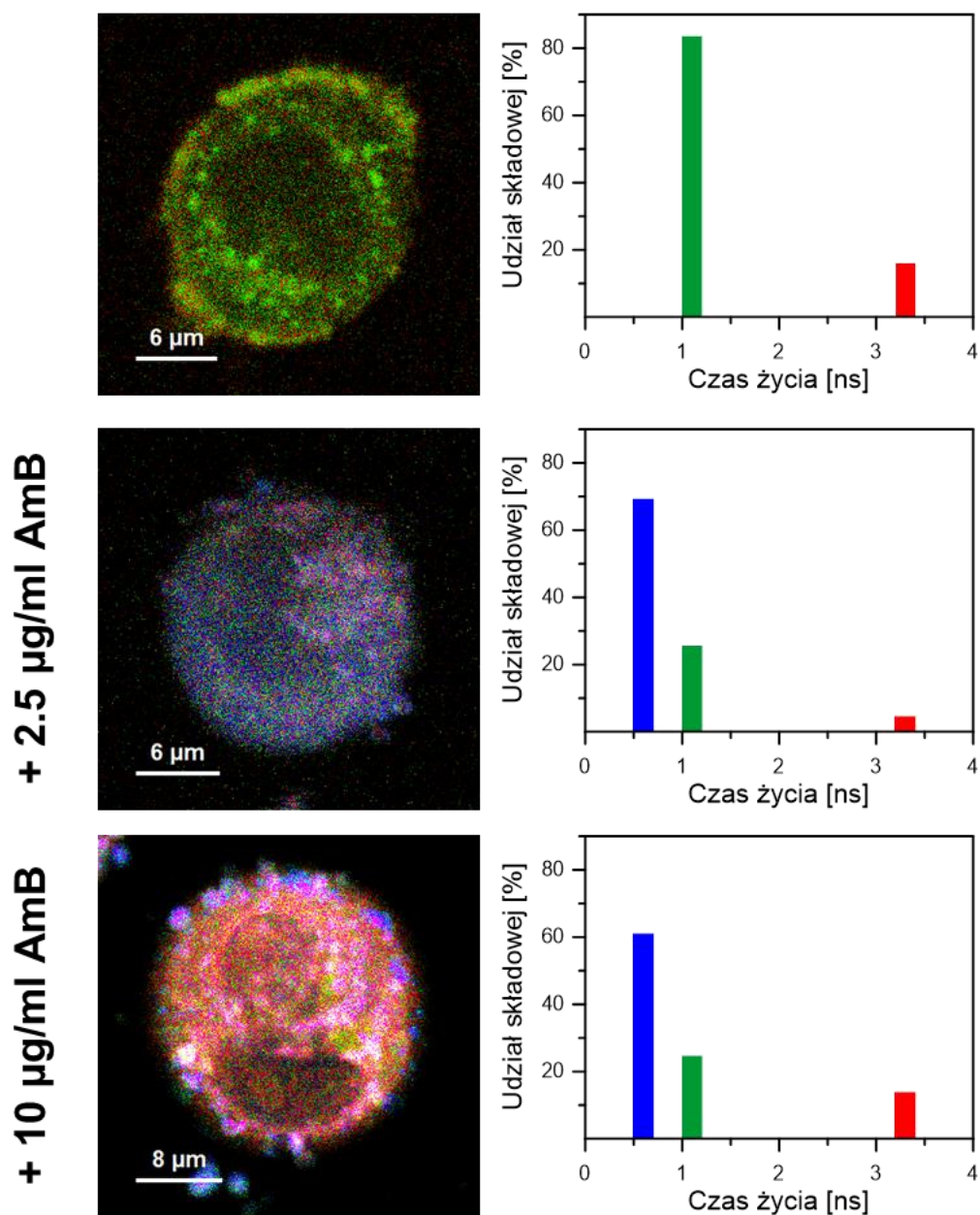
Wyniki obrazowania FLIM komórek kontrolnych oraz inkubowanych z AmB przedstawiają rys. 4.13 (komórki CCD 841 CoTr) oraz 4.14 (komórki HT-29). Komórki prawidłowe oraz nowotworowe cechowały się autofluorescencją charakteryzowaną poprzez dwie składowe czasów życia fluorescencji 1,1 ns oraz 3,3 ns. Udziały tych składowych dla różnych obszarów komórki przedstawione zostały przy pomocy skali kolorów RGB (*ang.* red, green, blue), gdzie składowej 1,1 ns odpowiadał kolor zielony, a 3,3 ns czerwony oraz wykresów słupkowych umieszczonych po prawej stronie obydwu rysunków (4.13, 4.14). Oddziaływanie antybiotyku z komórkami odnotowano poprzez pojawienie się dodatkowej składowej czasu życia fluorescencji równej 0,6 ns (zaprezentowanej kolorem niebieskim), która to odpowiada małym agregatom AmB. Z uwagi na autofluorescencję komórek, niemożliwe było monitorowanie innych składowych czasu życia. W obecności antybiotyku, w obrębie błony komórkowej pojawiają się liczne nanostruktury zawierające AmB (Rys. 4.15). Struktury te, to egzosomy powstające na drodze sekrecji fragmentów błony komórkowej, co stanowi element obronny komórki przed substancjami toksycznymi. Podobny mechanizm oporności na leki przeciwnowotworowe obserwowano wcześniej<sup>129</sup>. Rysunek 4.16 przedstawia dojrzały egzosom wciąż przyłączony do błony komórkowej. Na zdjęciu 4.16B powiększony obraz tej struktury przedstawiony jest poprzez nałożenie trzech składowych czasu życia fluorescencji. Niebieski kolor, przypisany agregatom AmB, wskazuje na ulokowanie antybiotyku w błonie powstałego egzosomu. O wbudowaniu AmB w dwuwarstwę lipidową świadczą także wyniki analiz anizotropii fluorescencji (Rys. 4.15EF, 4.16C). Rezultaty badań wskazują, że zagregowane formy antybiotyku odpowiadają za jego toksyczność względem komórek ludzkich.

## CCD 841 CoTr



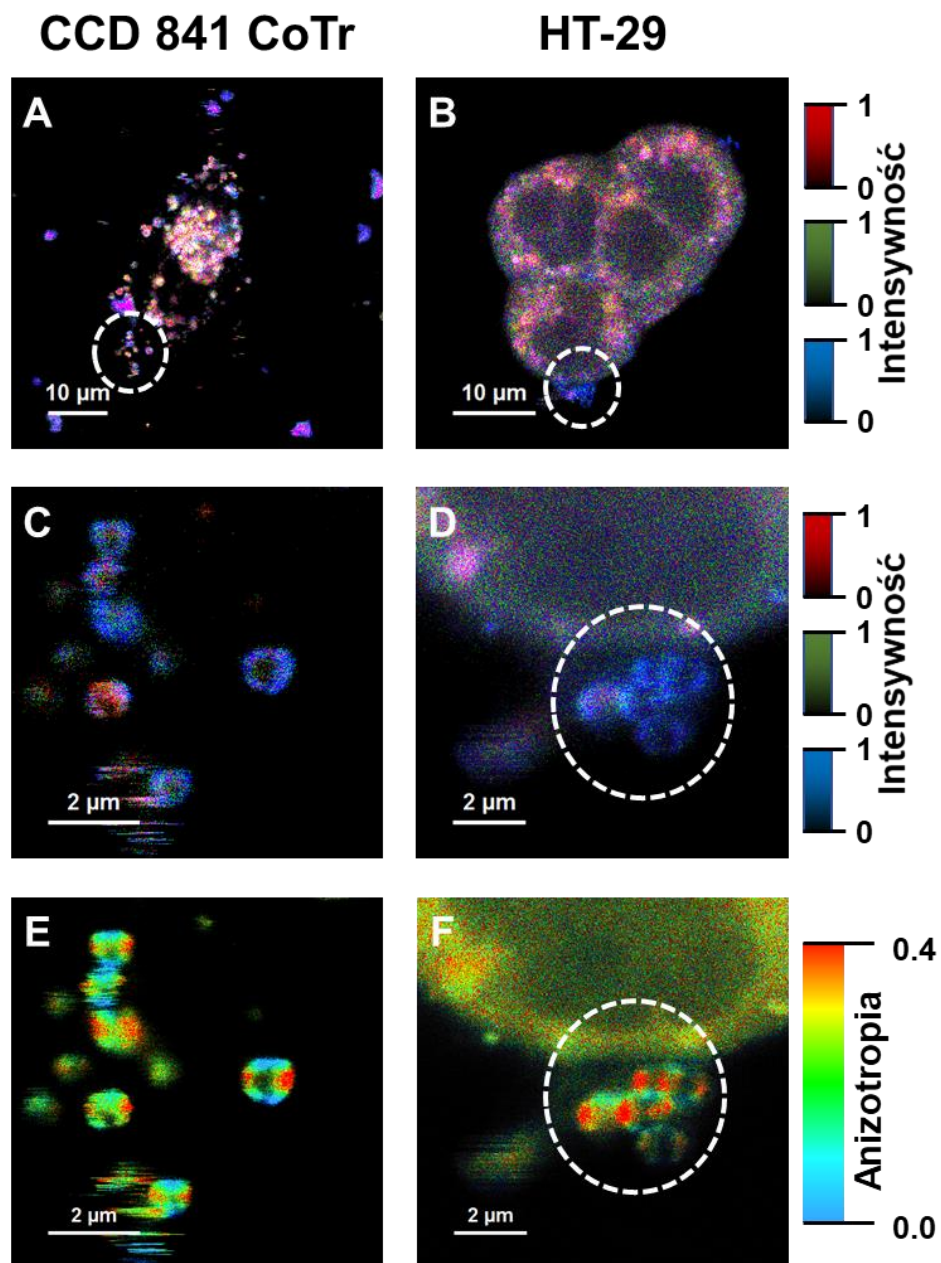
Rysunek 4.13: Obrazy FLIM komórek CCD 841 CoTr (panele po stronie lewej) opisane i przedstawione za pomocą trzech składowych czasów życia fluorescencji. Wyodrębniono dwie składowe autofluorescencji oznaczone kolorem zielonym dla czasu równego 1,1 ns oraz czerwonym dla czasu 3,3 ns. Krótkożyciowy komponent oznaczony kolorem niebieskim (0,6 ns) przypisano małym agregatom AmB. Procentowe udziały poszczególnych składowych przedstawiono (panele po stronie prawej) poprzez wartości amplitud każdej składowej. Na rysunku przedstawiono komórki kontrolne bez dodatku AmB (panel górny), z dodatkiem AmB wynoszącym 2,5 µg/ml pożywki (panel środkowy) oraz 10 µg/ml (panel dolny).

## HT-29

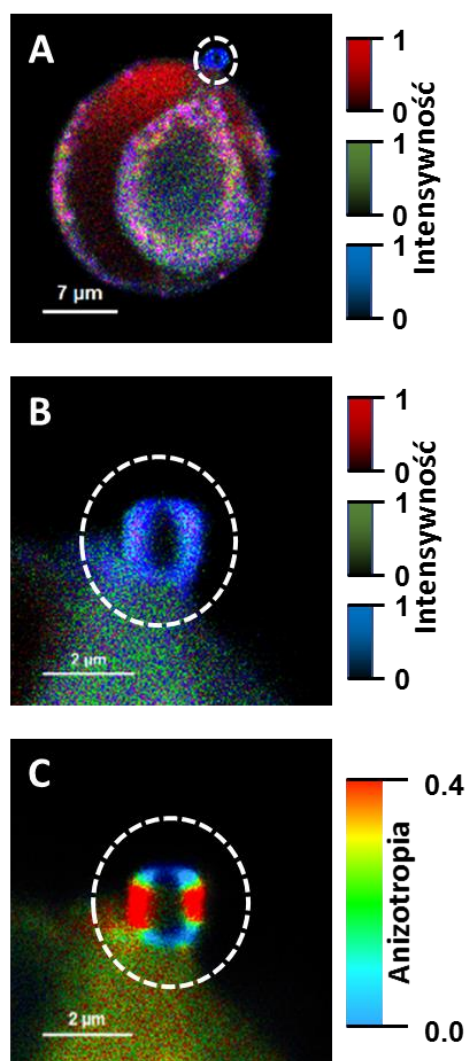


Rysunek 4.14: Obrazy FLIM komórek HT-29 (panele po stronie lewej) opisane i przedstawione za pomocą trzech składowych czasów życia fluorescencji. Wyodrębniono dwie składowe autofluorescencji oznaczone kolorem zielonym dla czasu równego 1,1 ns oraz czerwonym dla czasu 3,3 ns. Krótkożyciowy komponent oznaczony kolorem niebieskim (0,6 ns) przypisano małym agregatom AmB. Procentowe udziały poszczególnych składowych przedstawiono (panele po stronie prawej) poprzez wartości amplitud każdej składowej. Na rysunku przedstawiono komórki kontrolne bez dodatku AmB (panel górny), z dodatkiem AmB wynoszącym 2,5  $\mu\text{g/ml}$  pożywki (panel środkowy) oraz 10  $\mu\text{g/ml}$  (panel dolny).



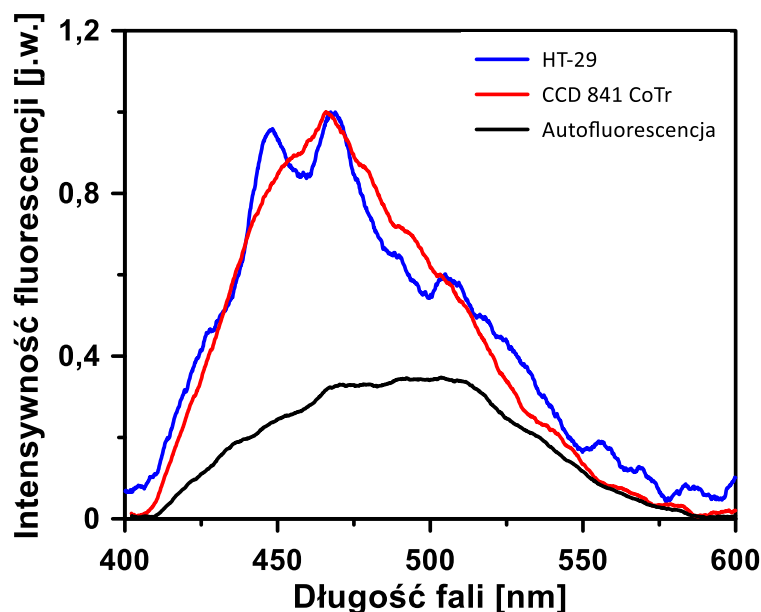


**Rysunek 4.15:** Obrazy FLIM oraz anizotropii fluorescencji komórek CCD 841 CoTr oraz HT-29 hodowanych przez 24 godziny z dodatkiem AmB wynoszącym 10 μg/ml pożywki. A, B - obrazy FLIM komórek opisane i przedstawione trzema składowymi czasów życia fluorescencji, którym przypisano kolory typu RGB (1,1 ns - zielony, 3,3 ns - czerwony, 0,6 - ns niebieski). C, D - powiększony obraz FLIM egzosomów oznaczonych na zdjęciach A, B białym kółkiem, E, F - obrazy anizotropii fluorescencji egzosomów ze zdjęć C, D.



**Rysunek 4.16:** Obrazy FLIM oraz anizotropii fluorescencji komórek HT-29 hodowanych przez 24 godziny z dodatkiem AmB wynoszącym 10 µg/ml pożywki. A - obraz FLIM komórek opisany i przedstawiony trzema składowymi czasów życia fluorescencji, którym przypisano kolory typu RGB (1,1 ns - zielony, 3,3 ns - czerwony, 0,6 - ns niebieski). B - powiększony obraz FLIM egzosomu oznaczonego na zdjęciu A białym kółkiem, C - obraz anizotropii fluorescencji egzosomu ze zdjęcia B.

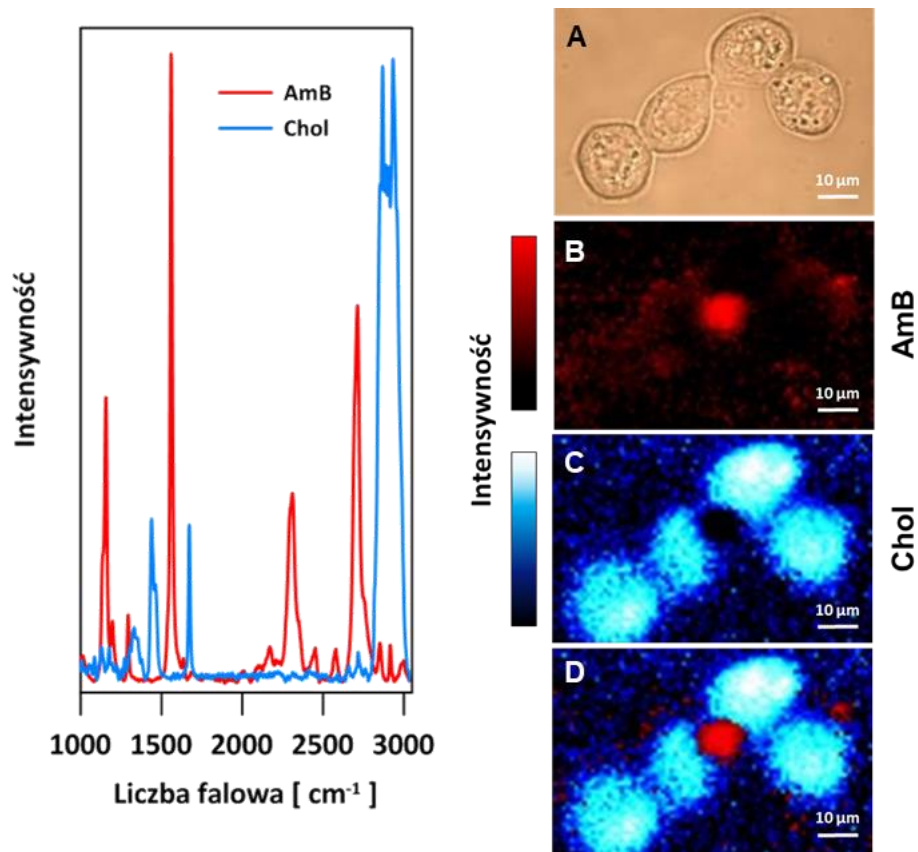
Zarówno wysoki procentowy udział składowej 0,6 ns w stosunku do całkowitej fluorescencji, jak i widma emisji fluorescencji AmB zarejestrowane z błony egzosomów (Rys. 4.17) potwierdzają, że cząsteczki antybiotyku związane z membraną występują w postaci małych struktur zagregowanych.



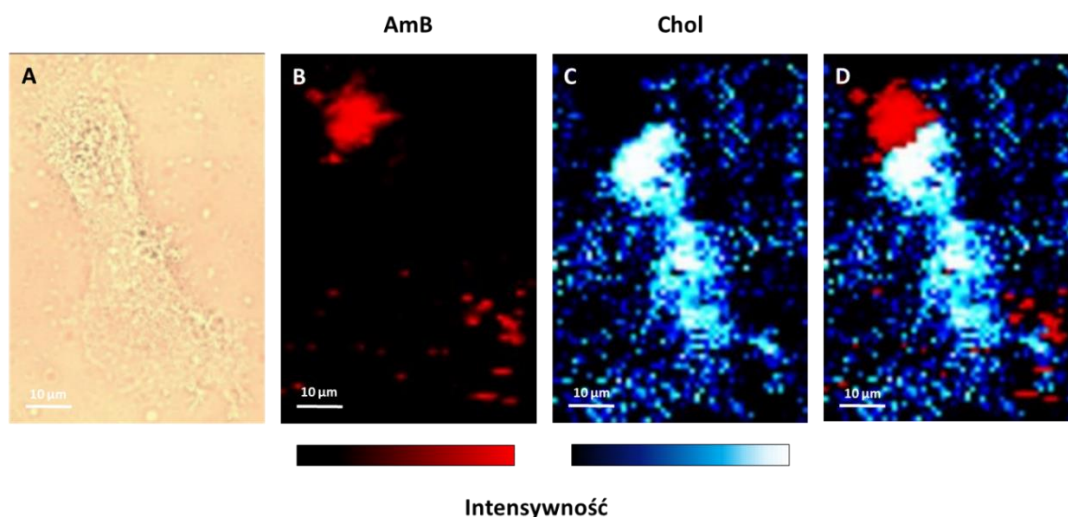
Rysunek 4.17: Widma emisji fluorescencji zarejestrowane z obszaru błon egzosomów pochodzących od komórek HT-29 (kolor niebieski) oraz CCD 841 CoTr (kolor czerwony), inkubowanych z AmB o stężeniu 10  $\mu\text{g/ml}$  pożywki hodowlanej. Autofluorescencja (kolor czarny) została zarejestrowana dla komórek HT-29 hodowanych na podłożu bez dodatku AmB. Widma fluorescencji pochodzące z błon zawierających antybiotyki znormalizowano przy długości fali  $\sim 470$  nm, natomiast widmo autofluorescencji zostało przeskalowane tak, aby nie przewyższać widm zawierających składowe fluorescencji AmB.

W kolejnym kroku zbadano, czy egzosomy tworzące się w obecności AmB zawierają cząsteczki cholesterolu. Mikroskopia ramanowska posłużyła tu do weryfikacji hipotezy jednego z postulowanych mechanizmów działania AmB, polegającego na tworzeniu zewnątrzkomórkowych agregatów antybiotyku sekwestrujących sterole z błony lipidowej<sup>5</sup>.

Celem identyfikacji interesujących cząsteczek (AmB oraz cholesterolu) zarejestrowano widma Ramana ich izolatów (Rys. 4.18), które posłużyły następnie jako wzorce do wyodrębnienia miejsc występowania tych molekuł w komórkach. Poprzez rozdzielenie sygnału pochodzącego z próbek na dwie składowe, uzyskano obraz dystrybucji AmB (Rys. 4.18B i 4.19B) oraz cholesterolu (Rys. 4.18C i 4.19C) w badanych komórkach. Zauważono, że egzosomy zawierające AmB pozbawione są cholesterolu (Rys. 4.18D i 4.19D). Mechanizm polegający na usuwaniu antybiotyku z komórek poprzez liposomy zaobserwowano zarówno u komórek prawidłowych jak i nowotworowych.



Rysunek 4.18: Po stronie lewej przedstawiono widma ramanowskie AmB (kolor czerwony) oraz cholesterolu (kolor niebieski). W panelu po prawej stronie przedstawione zostały komórki HT-29 po 24 godzinnej inkubacji z AmB, której stężenie w pożywce hodowlanej wynosiło 5 μg/ml. A - obraz optyczny, B-D - obrazy ramanowskie, B - dystrybucja AmB, C - dystrybucja cholesterolu, D - nałożenie obrazów C i D.



Rysunek 4.19: Obrazy komórek linii CCD 841 CoTr po 24 godzinnej inkubacji z AmB, której stężenie w pożywce hodowlanej wynosiło 5 μg/ml. A - obraz optyczny, B-D - obrazy ramanowskie, B - dystrybucja AmB, C - dystrybucja cholesterolu, D - nałożenie obrazów C i D.

#### **4.4 Amfoterycyna B w działaniu na linie komórkowe zawierające transportery lipidowe<sup>130</sup>**

Zawartość cholesterolu oraz jego organizacja w błonie komórkowej ma kluczowe znaczenie dla oddziaływania AmB z membraną lipidową. Z tego też powodu przeprowadzono badania wpływu AmB na linię komórkową posiadającą transportery ABCA1 wbudowane w taką błonę.

Transporter ABCA1 należy do rodziny białek ABC (ang. ATP Binding Cassette), które katalizują transport różnych substratów przez błonę<sup>131</sup>. ABCA1 odgrywa znaczącą rolę w translokacji lipidów, dystrybucji oraz usuwaniu cholesterolu z błony komórkowej<sup>132,133</sup>. Zbudowany jest z domeny NBD odpowiedzialnej za wiązanie i hydrolizę ATP (ang. Nucleotide-Binding Domain) oraz domeny transbłonowej MSD (ang. Membrane-Spanning Domain)<sup>134</sup>.

W badaniach wykorzystano komórki jajnika chomika chińskiego (CHO-K1) posiadające aktywny (komórki A1G) oraz nieaktywny (komórki MMG) transporter ABCA1. Komórki inkubowano przez 30-60 min w temperaturze 37°C w buforze zawierającym AmB o stężeniu 20 µg/ml, a następnie badano je stosując technikę FLIM.

Parametrem opisującym ograniczenie wzrostu komórek jest dawka IC<sub>50</sub>, informująca o stężeniu danej substancji, która w 50% hamuje ich funkcje biochemiczne i biologiczne. Dawka IC<sub>50</sub> AmB dla komórek A1G wynosiła 39,2 µg/ml natomiast dla komórek MMG 13,1 µg/ml. Podobną wrażliwością na antybiotyk, jak komórki z nieaktywnym transporterem ABCA1, cechowały się komórki CHO-K1 typu dzikiego, dla których wartość IC<sub>50</sub> wynosiła 16,75 µg/ml. Dawki te wyliczono po czasie inkubacji z AmB, wynoszącego 3 godziny. Wyniki te, wskazują na większą śmiertelność komórek, które w swojej błonie zawierają cholesterol, a więc nieaktywny transporter ABCA1.

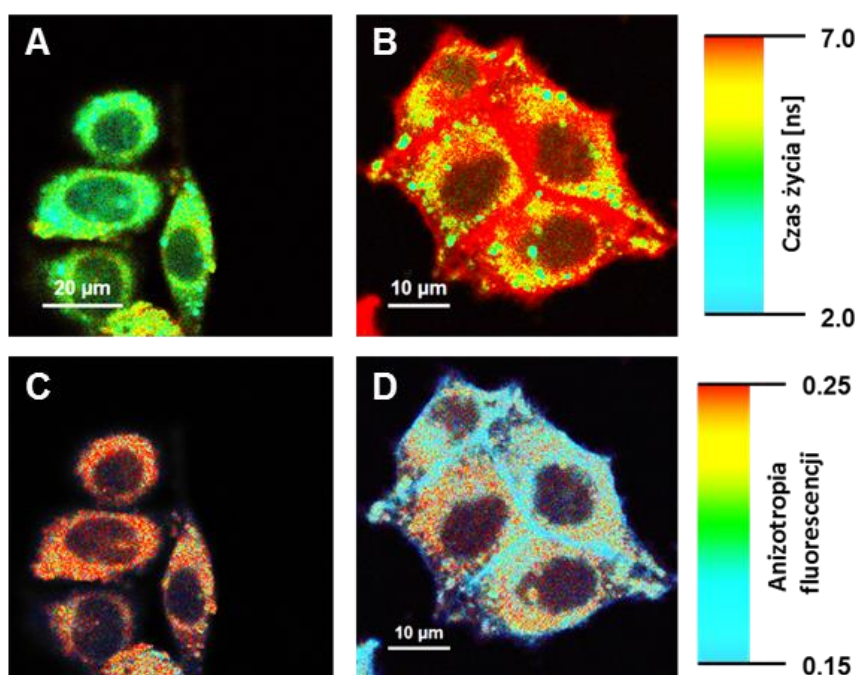
Pomiary organizacji molekularnej antybiotyku miały na celu dokładniejsze zrozumienie zjawiska oporności komórek na AmB, która związana jest z ekspresją białka ABCA1. Poprzez aktywne usuwanie cholesterolu, komórki chronione są przed wbudowywaniem się do błony zagregowanych form AmB, odpowiedzialnych za formowanie kanałów błonowych.

Obrazowanie FLIM komórek A1G oraz MMG przedstawiają odpowiednio rysunki 4.20 oraz 4.21. Obie linie komórkowe zostały wyznakowane białkiem GFP ze

względu na konieczność weryfikacji procesu transfekcji plazmidu kodującego aktywny bądź nieaktywny transporter ABCA1 do komórek CHO-K1. Całkowity sygnał fluorescencyjny pochodzący od komórek kontrolnych charakteryzuje składowa czasowa życia wynosząca  $\sim 3$  ns, oznaczona kolorem zielonym (Rys. 4.20A i 4.21A). Efekty oddziaływania AmB na komórki A1G widoczne są zarówno w obrazowaniu czasami życia fluorescencji (Rys. 4.20B) jak i poprzez anizotropię (Rys. 4.20D). Czas życia fluorescencji powyżej 6 ns oznaczony kolorem czerwonym przypisany został dimerom antyrównoległym<sup>83</sup>, zlokalizowanym w przestrzeni międzykomórkowej. Te same struktury charakteryzuje niska wartość anizotropii fluorescencji, co oznacza, że posiadają one dużą swobodę rotacyjną. Fakt, że takich struktur nie obserwowano w komórkach MMG, których białko ABCA1 nie wykazuje aktywności katalitycznej (Rys. 4.21B, 4.21D) oznacza, że prawdopodobnie oprócz AmB zawierają one cząsteczki cholesterolu.

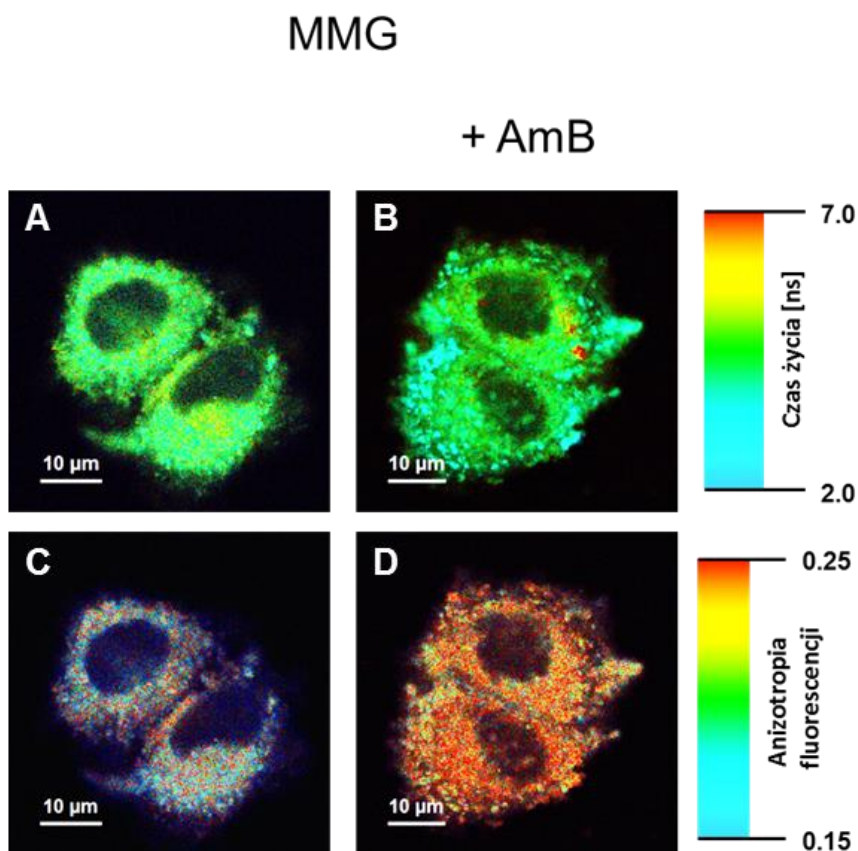
## A1G

+ AmB



**Rysunek 4.20:** Komórki A1G. A - obraz FLIM komórek kontrolnych, B - obraz FLIM komórek zawierających AmB, C - obraz anizotropii fluorescencji komórek kontrolnych, D - obraz anizotropii fluorescencji komórek z dodatkiem AmB.

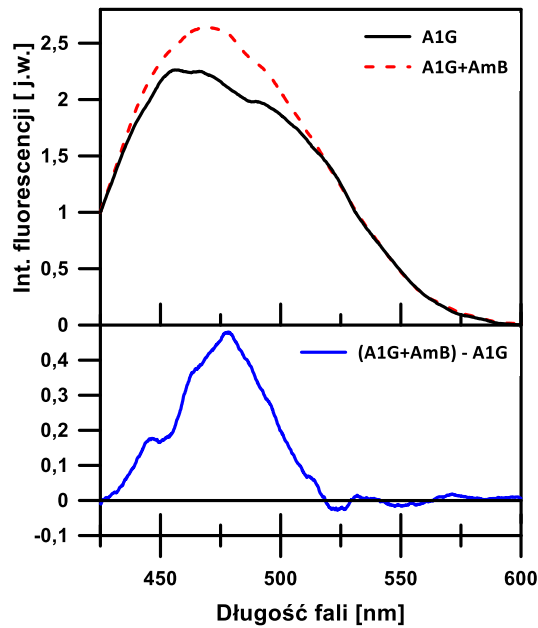
Obecność cholesterolu w błonie komórkowej warunkuje wbudowywanie się antybiotyku w dwuwarstwę, co potwierdza także wzrost wartości anizotropii fluorescencji (Rys. 4.21D).



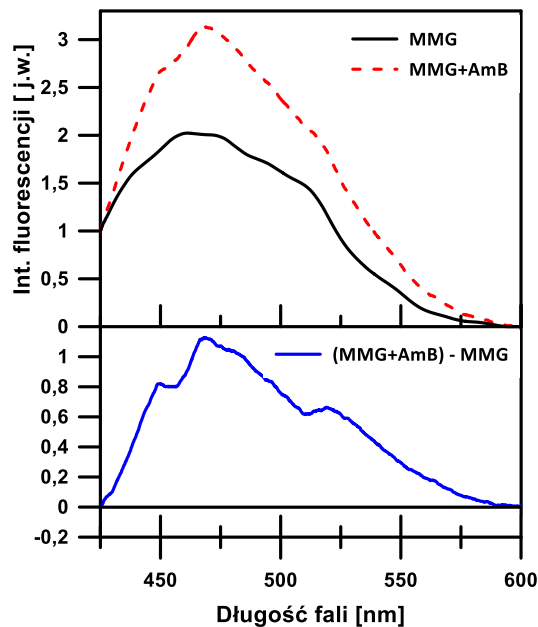
**Rysunek 4.21: Komórki MMG. A - obraz FLIM komórek kontrolnych, B - obraz FLIM komórek zawierających AmB, C - obraz anizotropii fluorescencji komórek kontrolnych, D - obraz anizotropii fluorescencji komórek z dodatkiem AmB.**

Widma emisji fluorescencji zarejestrowane z błony obu linii komórkowych wskazują, że AmB wbudowuje się do membrany ale molekularna organizacja antybiotyku jest inna w komórkach A1G niż MMG. Porównanie widm różnicowych (Rys. 4.22 i 4.23 dolny panel) wskazuje na obecność dwóch form AmB występujących w postaci dimerów równoległych oraz antyrównoległych (pasmo 430–500 nm)<sup>83</sup> w błonie obu linii komórkowych. Dodatkowe pasmo (500–600 nm)<sup>83</sup> widoczne w widmie zarejestrowanym dla komórek MMG wskazuje na obecność małych agregatów AmB. Struktury zagregowane antybiotyku wbudowywały się w dwuwarstwę wyłącznie w obecności cholesterolu, zaburzając przez to równowagę

jonową występującą w poprzek błony komórkowej. Tłumaczy to większą wrażliwość tych komórek na działanie AmB.



Rysunek 4.22: Widma emisji fluorescencji zarejestrowane z błony komórek A1G. Autofluorescencja komórek- linia czarna, widmo komórek z dodatkiem AmB - linia czerwona przerywana, widmo różnicowe - linia niebieska. Widma zostały znormalizowane przy długości fali 425 nm.



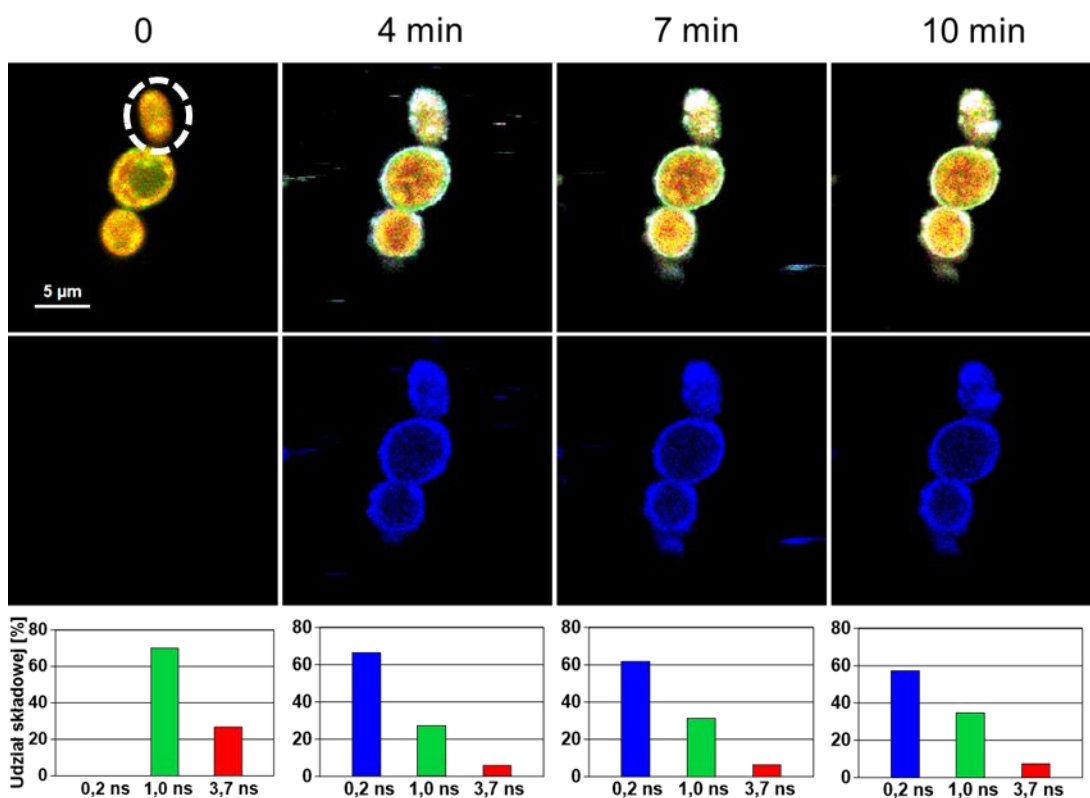
Rysunek 4.23: Widma emisji fluorescencji zarejestrowane z błony komórek MMG. Autofluorescencja komórek- linia czarna, widmo komórek z dodatkiem AmB - linia czerwona przerywana, widmo różnicowe - linia niebieska. Widma zostały znormalizowane przy długości fali 425 nm.



## 4.5 Amfoterycyna B w działaniu na komórki *Candida albicans*<sup>135</sup>

Kolejnym, naturalnym etapem badań było monitorowanie aktywności AmB wobec komórek grzybiczych. Eksperymenty przeprowadzono na klinicznym szczepie *Candida albicans*.

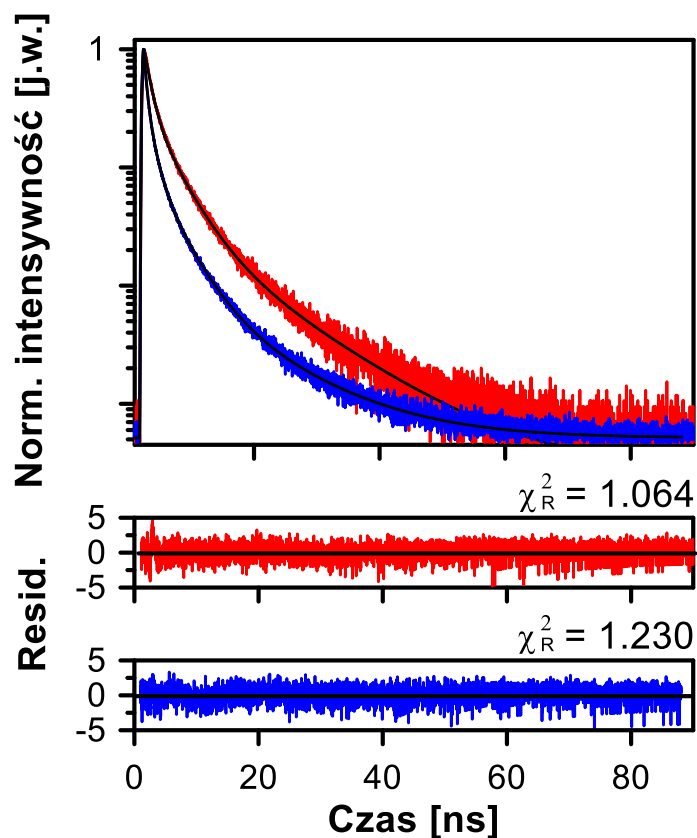
Bezpośrednio przed pomiarami mikroskopowymi FLIM komórki *C. albicans*, będące w logarytmicznej fazie wzrostu, przenoszono z pożywki YPD do 20 mM buforu fosforanowego o pH 7,4. Próbkę zawierającą komórki nanoszono następnie na szkiełko pokryte polilizyną i ostrożnie dodawano AmB zawieszoną w roztworze DMSO. Dzięki powyższej procedurze obserwowano aktywność antybiotyku od momentu jego iniekcji.



Rysunek 4.24: Obrazy FLIM komórek *Candida albicans* przed (czas 0) oraz po dodaniu AmB w kolejnych odstępach czasowych (4 min, 7 min oraz 10 min). Obrazy komórek rozkładano przy użyciu trzech składowych czasu życia fluorescencji oznaczonych kolorami RGB. Kolor niebieski oznacza składową 0,2 ns przypisaną małym agregatom AmB, a barwy: zielona oraz czerwona odpowiadają autofluorescencyjnym składowym czasów życia wynoszącym odpowiednio 1,0 ns oraz 3,7 ns. Środkowy panel, poprzez wyodrębnienie składowej 0,2 ns przedstawia dystrybucję AmB w komórkach. Końcowe stężenie AmB w próbce wynosiło 100 µM, natomiast DMSO 0,3%. Panel dolny przedstawia procentowy udział składowych czasów życia fluorescencji.

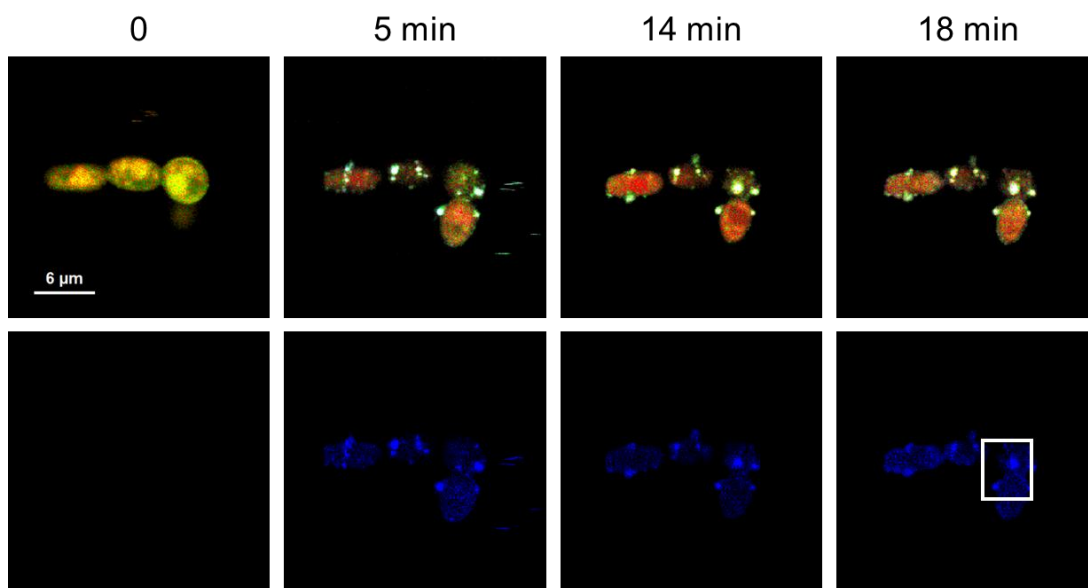
Rysunek 4.24 przedstawia proces wiązania się cząsteczek AmB do komórek grzybiczych. Naturalna fluorescencja *Candida albicans* została zobrazowana przy użyciu dwóch składowych czasu życia emisji: 1,0 ns (kolor zielony) oraz 3,7 ns (kolor czerwony). Podobnie jak w przypadku komórek ludzkich, AmB przyłącza się do komórek w postaci małych agregatów charakteryzujących się czasem życia równym 0,2 ns (kolor niebieski). Prawdopodobnie o takiej właśnie organizacji molekularnej decyduje faza wodna, z której pochodzi AmB. Środkowy panel rysunku 4.24 przedstawia dokładne rozmieszczenie antybiotyku w obszarze skanowanych komórek. Uzyskane wyniki wskazują na to, że AmB lokalizuje się głównie w ścianie komórkowej i jedynie w nieznacznym stopniu penetruje wewnątrz komórki. Liczne grupy polarne występujące w pierścieniu makrolidowym AmB mogą tworzyć wiązania wodorowe z grupami polarnymi chityny oraz  $\beta$ -glukanów, co prawdopodobnie skutkuje zakotwiczeniem AmB w ścianie komórkowej grzybów<sup>136,137</sup>. Nie zaobserwowano istotnych zmian w strukturze komórek pod wpływem działania AmB, za wyjątkiem małej komórki oznaczonej na rysunku białym okręgiem, identyfikowanej jako pączkująca, potomna komórka. Wraz ze wzrostem czasu oddziaływania AmB z tą komórką, stężenie antybiotyku w jej obrębie wyraźnie wzrasta oraz zachodzą w niej widoczne zmiany morfologiczne. Zaobserwowana, swobodniejsza penetracja antybiotyku wewnątrz komórek będących w stadium pączkowania, może wynikać z zaburzenia integralności ściany komórkowej oraz obniżonej sztywności błony tych komórek<sup>138</sup>. Efektywne stężenie AmB w przeprowadzonych eksperymentach dobierano na podstawie rezultatów badań przeżywalności przeprowadzonych przez prof. Zdybicką-Barabas i zamieszczonych w oryginalnej pracy Scientific Reports<sup>135</sup>.

Zarejestrowane zaniki emisji fluorescencji komórek *C. albicans* (Rys. 4.25) charakteryzują się rozkładami wieloeksponencjalnymi, na podstawie których, dopasowywane były wspomniane składowe czasów życia fluorescencji. W obecności AmB (krzywa niebieska) zaobserwowano pojawienie się wyraźnie krótszego czasu życia fluorescencji, charakteryzującego agregaty AmB. Na wykresach przedstawiono wyniki testów dobroci dopasowania obu krzywych.



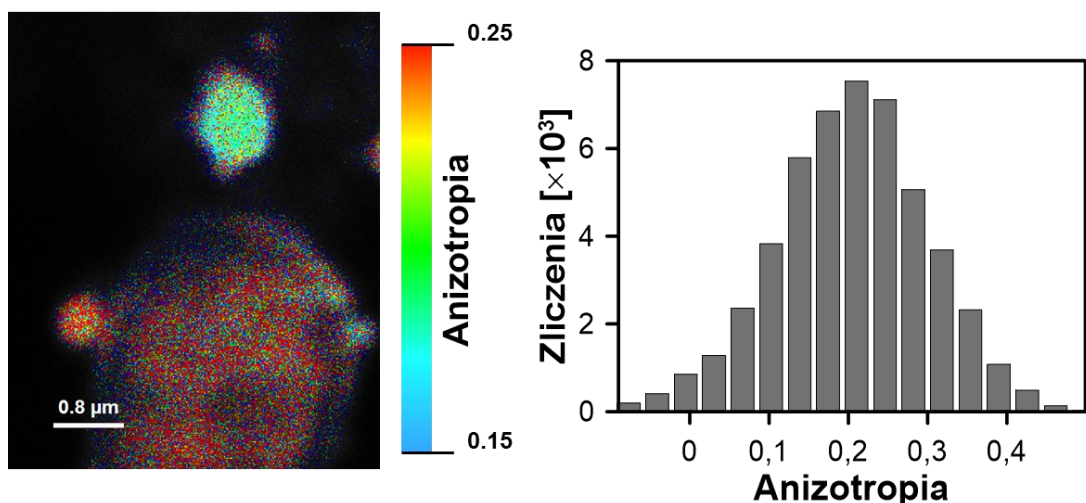
Rysunek 4.25: Znormalizowane krzywe zaniku fluorescencji. Zarejestrowane dla komórek przedstawionych na rys. 4.24 przed dodaniem AmB (kolor czerwony) oraz po 16 min inkubacji z antybiotykiem (kolor niebieski). Parametr  $\chi_R^2$  - opisuje dopasowanie funkcji krzywej zaniku. Dolne panele przedstawiają graficzne testy dopasowania funkcji w postaci wykresu ważonych reszduów, których dystrybucja oscyluje wokół 0.

Zmiany morfologiczne u *Candida albicans* wywołane działaniem AmB potwierdzają również badania z zastosowaniem skaningowego oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego, przeprowadzone we współpracy z prof. Bożeną Pawlikowską-Pawłęgą (Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS), których wyniki stały się przedmiotem wspólnej publikacji naukowej. Półgodzinna inkubacja *C. albicans* z antybiotykiem spowodowała utratę sferycznego kształtu komórek oraz pojawienie się licznych, małych wakuol wewnątrzkomórkowych. Zaobserwowano także deformacje komórek pączkujących, które najprawdopodobniej wystąpiły na skutek zaburzenia równowagi osmotycznej<sup>88</sup>, co pozwala sądzić, że AmB utrudnia formowanie w pełni funkcjonalnej ściany komórkowej grzybów.



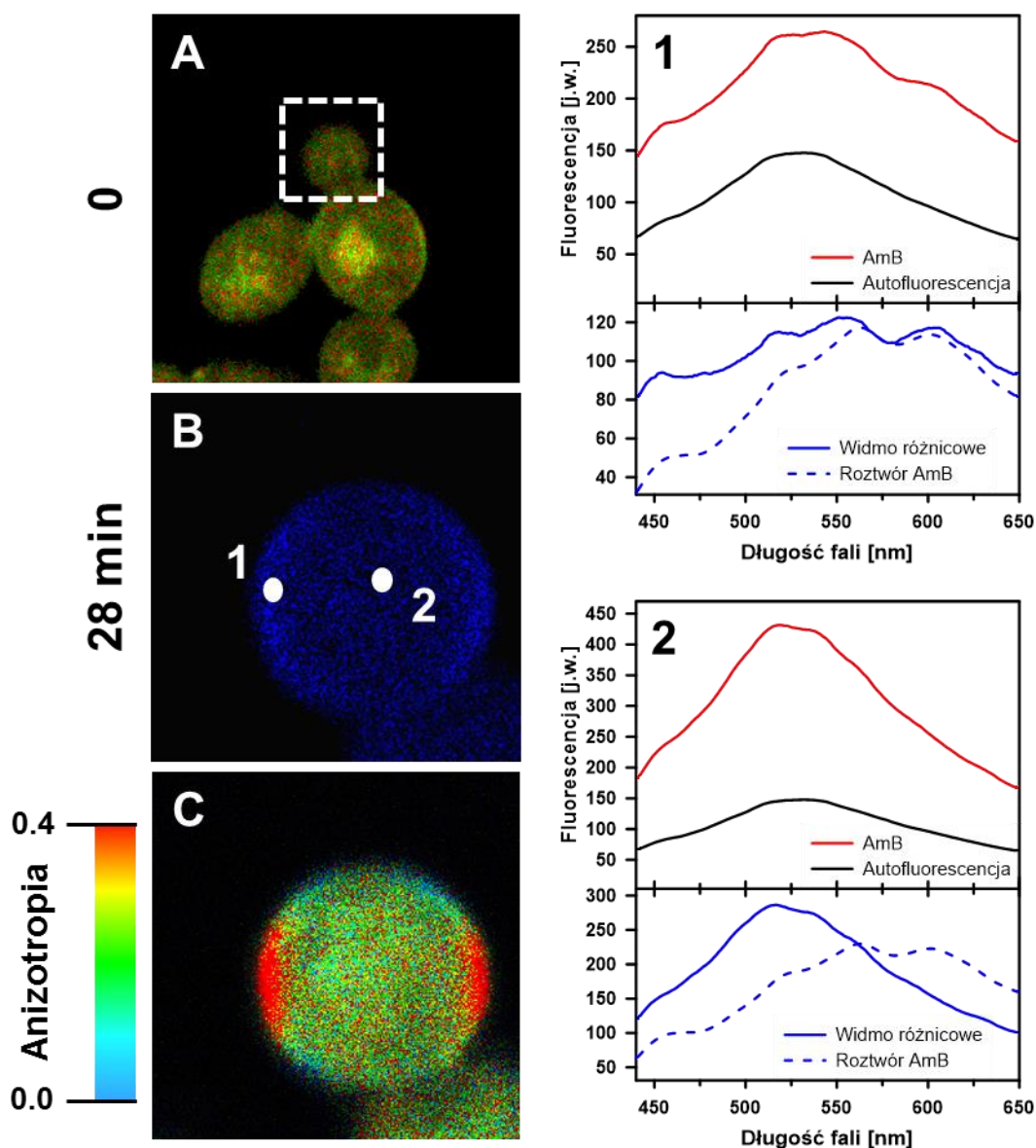
**Rysunek 4.26:** Obrazy FLIM komórek *Candida albicans* przed (czas 0) oraz po dodaniu AmB w kolejnych odstępach czasowych (5 min, 14 min oraz 18 min). Obrazy komórek rozkładano przy użyciu trzech składowych czasu życia fluorescencji oznaczonych kolorami RGB. Kolor niebieski oznacza składową 0,2 ns przypisaną małym agregatom AmB, a barwy: zielona oraz czerwona odpowiadają autofluorescencyjnym składowym czasów życia wynoszącym odpowiednio 1,0 ns oraz 3,7 ns. Dolny panel poprzez wyodrębnienie składowej 0,2 ns przedstawia dystrybucję AmB w komórkach. Końcowe stężenie AmB w próbce wynosiło 100  $\mu$ M, natomiast DMSO 0,3%.

Rezultatem oddziaływania antybiotyku z komórkami *C. albicans* było wytwarzanie zewnątrzkomórkowych struktur zawierających AmB (Rys. 4.26). Powstawanie takich struktur potwierdzałoby istnienie i funkcjonowanie mechanizmu sekwestracji steroli poprzez tzw. gąbki<sup>5</sup> lub mechanizmu obronnego przed antybiotykiem polegającego na wytwarzaniu egzosomów, jak zostało to zaobserwowane w przypadku komórek ludzkich. Po analizie anizotropii fluorescencji przeprowadzonej dla tych struktur (Rys. 4.27) potwierdzono, że zawarta w nich AmB wykazuje jednorodne nieuporządkowane rozmieszczenie (niska wartość anizotropii fluorescencji - kolor zielony). Odmienną sytuację zaobserwowano w przypadku AmB związanej z błoną, gdzie sygnał emisji fluorescencji pochodzący od AmB charakteryzował się wysoką wartością anizotropii (zaznaczoną kolorem czerwonym). Struktury te zatem są prawdopodobnie agregatami antybiotyku oraz ergosterolu.



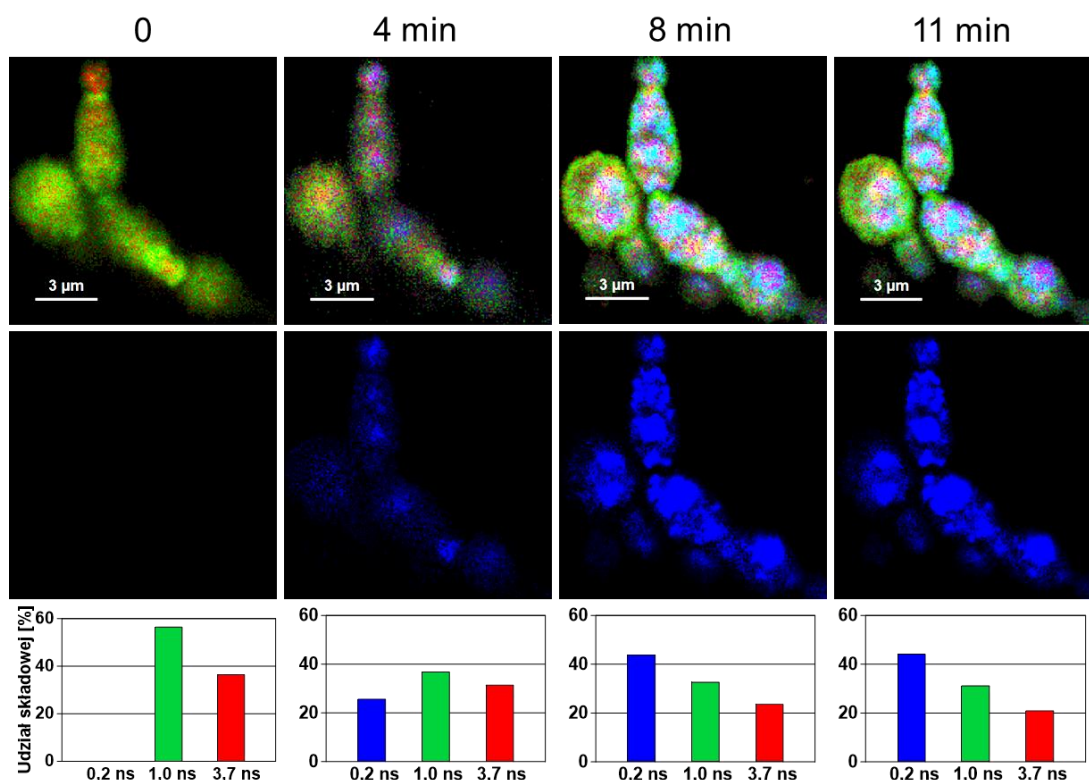
**Rysunek 4.27:** Komórki *C. albicans* z widoczną strukturą typu gąbki (kolor zielony) zobrazowane wartością anizotropii fluorescencji (powiększony obraz obszaru oznaczonego na rysunku 4.26 białym prostokątem). Po stronie prawej przedstawiono histogram anizotropii fluorescencji. Końcowe stężenie AmB w próbce wynosiło 100  $\mu$ M, DMSO 0,3%.

Szczegółowe pomiary komórek *C. albicans* przeprowadzone dla tych będących w fazie pączkowania wskazują na wbudowywanie się AmB do ich błony komórkowej. Świadczy o tym wysoki poziom sygnału emisji oraz wysoka wartość anizotropii (Rys. 4.28C) obserwowana po bokach pączkującej komórki, jak dotychczas obserwowano to w przypadku modelowych błon lipidowych oraz egzosomów. Jak można zauważyć, wewnątrz komórki charakteryzuje się niską wartością anizotropii, co wynika z możliwości ruchu antybiotyku w cytoplazmie. Świadczy to o wbudowywaniu się AmB do błony komórkowej *C. albicans*. Analiza widm emisji fluorescencji (Rys. 4.28) zarejestrowanych z błony (widmo 1) oraz wewnątrz komórki (widmo 2) świadczy o różnorodnej organizacji molekularnej AmB w obydwu tych przestrzeniach. Widma różnicowe (linia niebieska ciągła) odnoszące się do widma odniesienia zarejestrowanego dla AmB w roztworze wodnym (linia niebieska przerywana) wskazują, że antybiotyk, który zlokalizowany jest w błonie komórkowej występuje głównie w formie agregatów, co określono na podstawie szczegółowej analizy przeprowadzonej w rozdziale 4.2. AmB znajdująca się w cytoplazmie wykazuje zróżnicowaną organizację molekularną o mniejszym stopniu zagregowania.



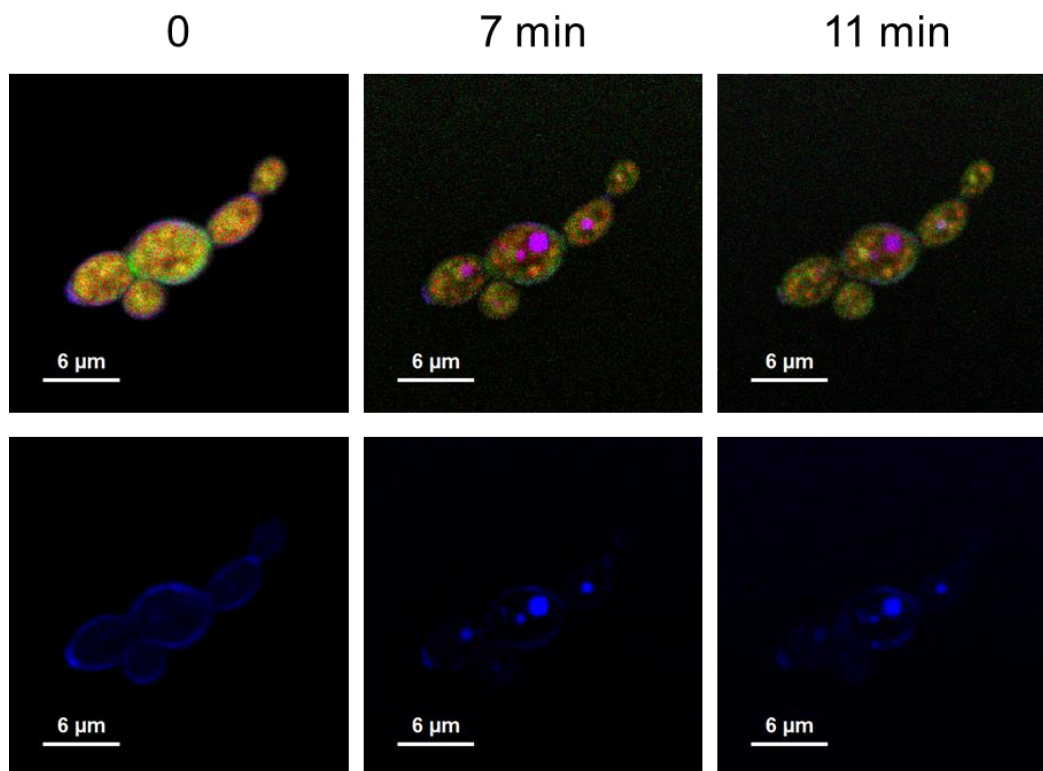
Rysunek 4.28: Obrazy FLIM (strona lewa) oraz widma emisji fluorescencji (strona prawa) zarejestrowane dla komórek *C. albicans* poddanych działaniu AmB o stężeniu 100  $\mu\text{M}$  (po 28 minutach oddziaływania). Końcowe stężenie DMSO wynosiło 0,3%. A - obraz FLIM komórek kontrolnych, B - rozmieszczenie AmB w komórce oznaczonej białym kwadratem na obrazie A, C - obraz anizotropii fluorescencji wyróżnionej komórki, 1, 2 - widma emisji fluorescencji zarejestrowane z punktów oznaczonych odpowiednio na rysunku B.

Przy stosowaniu wyższych stężeń AmB obserwowano gromadzenie się antybiotyku we wnętrzu komórek grzybiczych (Rys. 4.29). Poprzez analizę rozmieszczenia składowej czasu życia fluorescencji AmB (kolor niebieski) monitorowano wzrost stężenia antybiotyku w strukturach wewnętrznych komórek (środkowy panel). Transport AmB ze środowiska zewnętrznego do wakuol wewnątrzkomórkowych obserwowano u *Candida albicans*<sup>139</sup> a także *Saccharomyces cerevisiae*<sup>140</sup>.



**Rysunek 4.29:** Obrazy FLIM komórek *Candida albicans* przed (czas 0) oraz po dodaniu AmB w kolejnych odstępach czasowych (4 min, 8 min oraz 11 min). Obrazy komórek rozkładano przy użyciu trzech składowych czasu życia fluorescencji oznaczonych kolorami RGB. Kolor niebieski oznacza składową 0,2 ns przypisaną małym agregatom AmB, a barwy: zielona oraz czerwona odpowiadają autofluorescencyjnym składowym czasów życia wynoszącym odpowiednio 1,0 ns oraz 3,7 ns. Środkowy panel poprzez wyodrębnienie składowej 0,2 ns przedstawia dystrybucję AmB w komórkach. Końcowe stężenie AmB w próbce wynosiło 300  $\mu$ M, natomiast DMSO 1,3%. Panel dolny przedstawia procentowy udział składowych czasów życia fluorescencji.

Zastosowane, wyższe stężenie AmB powiązane było ze wzrostem stężenia DMSO. W następnym kroku, sprawdzono czy akumulowanie się antybiotyku wewnątrz komórek, było efektem podwyższonego stężenia AmB czy też DMSO. Zbadano komórki *C. albicans* (Rys. 4.30) oddziałujące ze zwiększonym stężeniem antybiotyku zawieszonym w DMSO (o standardowej koncentracji stosowanej w poprzednich badaniach). W tym przypadku, również zaobserwowano gromadzenie się AmB w wewnętrznych strukturach komórkowych, co potwierdza wpływ stężenia antybiotyku na jego lokalizację w komórkach grzybiczych.



Rysunek 4.30: Obrazy FLIM komórek *Candida albicans* przed (czas 0) oraz po dodaniu AmB w kolejnych odstępach czasowych (7 min oraz 11 min). Obrazy komórek rozkładano przy użyciu trzech składowych czasu życia fluorescencji oznaczonych kolorami RGB. Kolor niebieski oznacza składową 0,2 ns przypisaną małym agregatom AmB, a barwy: zielona oraz czerwona odpowiadają autofluorescencyjnym składowym czasów życia wynoszącym odpowiednio 1,0 ns oraz 3,7 ns. Dolny panel poprzez wyodrębnienie składowej 0,2 ns przedstawia dystrybucję AmB w komórkach. Końcowe stężenie AmB w próbce wynosiło 300 μM, natomiast DMSO 0,3%.

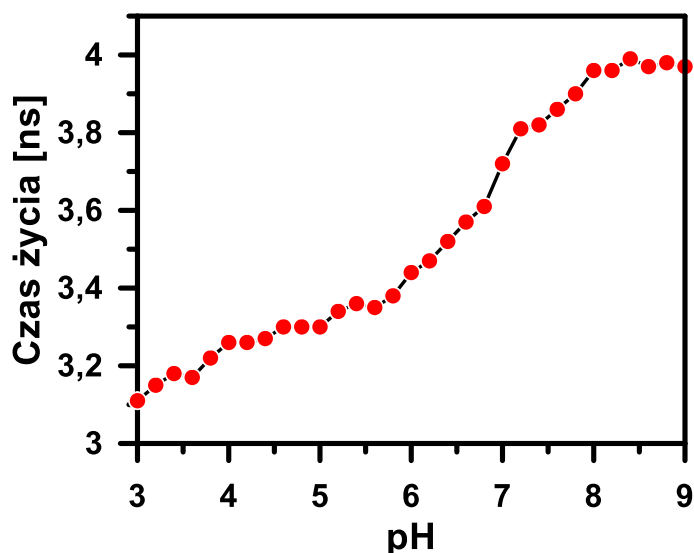
#### 4.6 Transport jonów wodorowych

Najpowszechniej opisywanym mechanizmem działania AmB jest model kanałów jonowych, gdzie antybiotyk wbudowuje się w błonę lipidową tworząc w niej pory, przez które następuje niekontrolowany przepływ jonów. Naruszenie równowagi elektrochemicznej oraz integralności błony komórkowej prowadzi do śmierci komórek<sup>141</sup>. Drugi postulowany mechanizm aktywności antybiotyku polega na sekwestracji ergosterolu z błony lipidowej przez cząsteczki AmB lokujące się na jej powierzchni. Utrata steroli powoduje zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu błony<sup>5</sup>.

Zdecydowano się przeprowadzić badania weryfikujące, które formy AmB odpowiadają za tworzenie kanałów jonowych. Opracowano układ pomiarowy składający się z gigantycznych liposomów o różnym składzie błony lipidowej, która



stanowiła barierę dla jonów wodorowych. Pęcherzyki lipidowe formowane były w roztworze wodnym o wyjściowym pH 8,0, zawierającym fluoresceinę. W pierwszym etapie badań poszukiwano wskaźnika czułego na stężenie jonów wodorowych, który poprzez zmianę wartości czasu życia fluorescencji informowałby o pH wnętrza liposomu. W literaturze można odnaleźć barwniki fluorescencyjne, których intensywność fluorescencji, obszar pochłaniania, czy też emisji promieniowania elektromagnetycznego ulega zmianie zależnie od wartości pH roztworu<sup>142</sup>. Spektroskopowe badania fluoresceiny wykazały, że formy uprotonowana i nieuprotonowana barwnika charakteryzują się różnym czasem życia fluorescencji. Rys. 4.31 przedstawia krzywą zależności czasu życia fluoresceiny od stężenia jonów wodorowych.



Rysunek 4.31: Zależność czasu życia emisji fluoresceiny w funkcji wartości pH roztworu.

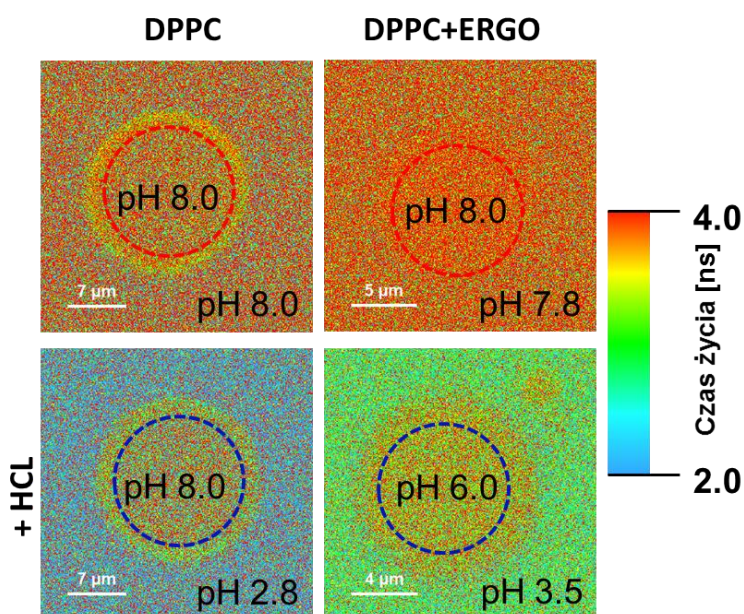
Pomiary FLIM pozwoliły monitorować wartości pH wewnątrz liposomów oraz w ich środowisku zewnętrznym, jak i zmianę tego parametru po dodaniu HCl. Tabela 4.2 przedstawia średnie wartości różnic pH wewnątrz pęcherzyków lipidowych, następujące po zakwaszeniu środowiska zewnętrznego liposomów. Poimoiż, na błony pęcherzyków nie oddziaływała AmB, zaobserwowano zmianę wartości pH w badanych układach. Wyższą różnicę odnotowano w przypadku liposomów zawierających ergosterol. Obecność AmB w błonie lipidowej nieznacznie zwiększyła przepływ jonów wodorowych do wnętrza liposomów, utworzonych z fosfolipidu DPPC. AmB natomiast oddziałująca z ergosterolem wyraźnie nasiliła transport kationu. Trzykrotnie podwyższona różnica pH w stosunku do wartości

zaobserwowanej dla kontrolnych liposomów, może świadczyć o formowaniu przez AmB kanałów transbłonowych w obecności ergosterolu.

**Tabela 4.2:** Wartości zmiany pH wewnątrz liposomów rejestrowane po dodaniu HCl. Wartości przedstawiają średnie arytmetyczne uzyskane z trzech pomiarów.

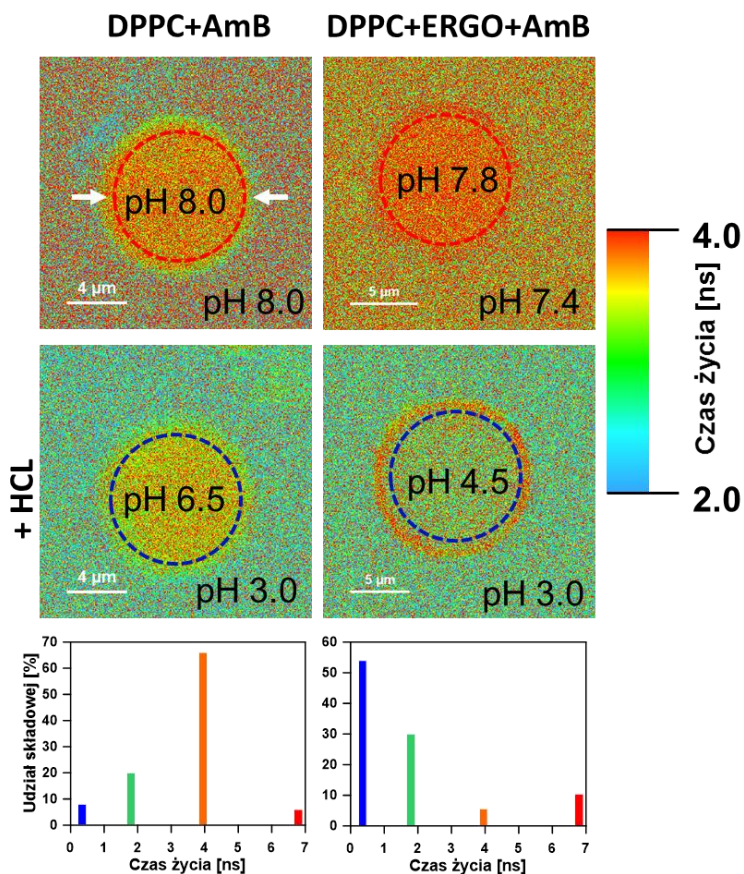
Układ	DPPC	DPPC+AmB	DPPC+Ergo	DPPC+Ergo+AmB
$\Delta\text{pH}$	0,33	0,42	0,83	2,27

Poniżej na rysunku 4.32 przedstawiono obrazy FLIM liposomów niezawierających AmB, przed zakwaszeniem oraz po nakropleniu na próbkę HCl. Zaznaczono wartości pH we wnętrzu przykładowych liposomów oraz w roztworze zewnętrznym, które wyliczono na podstawie czasu życia emisji fluoresceiny.



**Rysunek 4.32:** Obrazy FLIM liposomów przed (panel górny) oraz po dodaniu kwasu HCl (panel dolny) przedstawione w skali czasów życia fluorescencji. Na rysunkach przedstawiono wartości pH wewnątrz liposomów oraz w środowisku zewnętrznym.

Rysunek 4.33 przedstawia zdjęcia FLIM przykładowych liposomów oddziałujących z AmB. Obrazują one wpływ antybiotyku na transport  $\text{H}^+$ . Dodatkowo wyliczono procentowy udział składowych czasu życia fluorescencji przed dodaniem kwasu, z obszaru błony lipidowej, który zaznaczono na zdjęciu białymi strzałkami. Zgodnie ze zjawiskiem fotoselekcji, wzbudzano cząsteczki równoległe zorientowane do polaryzacji światła wzbudzającego, a więc w tym przypadku wbudowane w błonę.

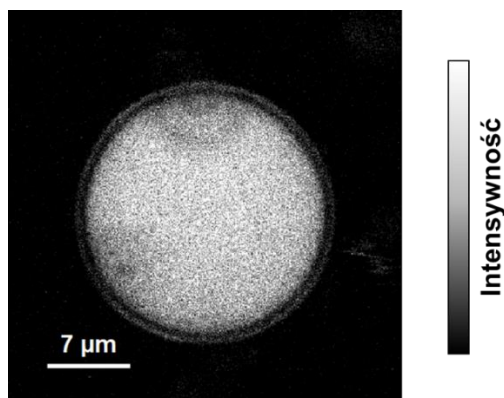


**Rysunek 4.33:** Obrazy FLIM liposomów z dodatkiem AmB przed (panel górny) oraz po dodaniu kwasu HCl (panel środkowy) przedstawione w skali czasów życia fluorescencji. Na rysunkach przedstawiono wartości pH wewnątrz liposomów oraz w środowisku zewnętrznym. Dolny panel przedstawia procentowy udział składowych wyliczony dla puli AmB wbudowanej w błonę lipidową, kolor niebieski - agregaty AmB, kolor zielony - dimery równoległe AmB, kolor pomarańczowy - fluoresceina, kolor czerwony - dimery antyrównoległe AmB.

Amplitudy składowych czasu życia fluorescencji którymi dopasowywano obrazy FLIM zestawiono na wykresach słupkowych (Rys. 4.33). Czas życia emisji równy 3,9 ns odpowiada nieuprotionowanej fluoresceinie (kolor pomarańczowy), pozostałe trzy składowe charakteryzują AmB. Składowa: 0,35 ns agregaty antybiotyku (kolor niebieski), 1,8 ns dimery równoległe (kolor zielony), 6,8 ns dimery antyrównoległe (kolor czerwony). W błonie liposomów uformowanych z DPPC największy udział w puli AmB stanowiły dimery równoległe, natomiast w obecności ergosterolu najliczniejsza była frakcja agregatów, przypuszczalnie odpowiedzialnych za tworzenie kanałów jonowych. Obliczenia technikami dynamiki molekularnej potwierdzają, że powstające pod wpływem działania AmB pory błonowe są termodynamicznie stabilne w obecności steroli. Metody te wskazują, że kanały zbudowane są z oligomerycznych struktur AmB, na które składa się 16 cząsteczek

antybiotyku. W takim modelu, w jednej monowarstwie błony lipidowej znajduje się oktamer AmB, oddziałujący z taką samą strukturą znajdującą się naprzeciw w sąsiedniej.

Wzrost stężenia jonów wodorowych widoczny był nie tylko poprzez zmianę czasu życia fluorescencji, ale także poprzez spadek intensywności fluorescencji. Formując liposom zbudowany z fosfolipidów, ergosterolu oraz AmB w środowisku buforowym, po dodaniu do próbki kwasu, zaobserwowano promieniście rozchodzące się wygaszenie fluorescencji wewnątrz GUVA (Rys. 4.34). Takiego zjawiska nie obserwowano w przypadku liposomów niezawierających ergosterolu. Wynik ten, pozwala zaobserwować przepływ jonów  $H^+$  przez kanały transbłonowe, wytworzone przez AmB.



**Rysunek 4.34:** Liposom uformowany z fosfolipidu DPPC z 30 mol% ergosterolem z dodatkiem AmB przedstawiony w skali intensywności fluorescencji.

## 5. Wnioski

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów spektroskopowo-mikroskopowych pozwalają mi skonstruować następujące wnioski, dotyczące organizacji oraz orientacji molekularnej AmB w badanych układach. Ich zestawienie wykonałam w kontekście uzyskania odpowiedzi na kluczowe pytanie dotyczące toksyczności antybiotyku AmB. Porównanie struktury oraz lokalizacji antybiotyku w błonach: układów modelowych, komórek ludzkich i grzybiczych, pozwala wdrożyć badania skuteczniej celowane na tworzenie leku o mniejszym działaniu niepożądanym dla pacjenta.

### 5.1 Stabilności AmB

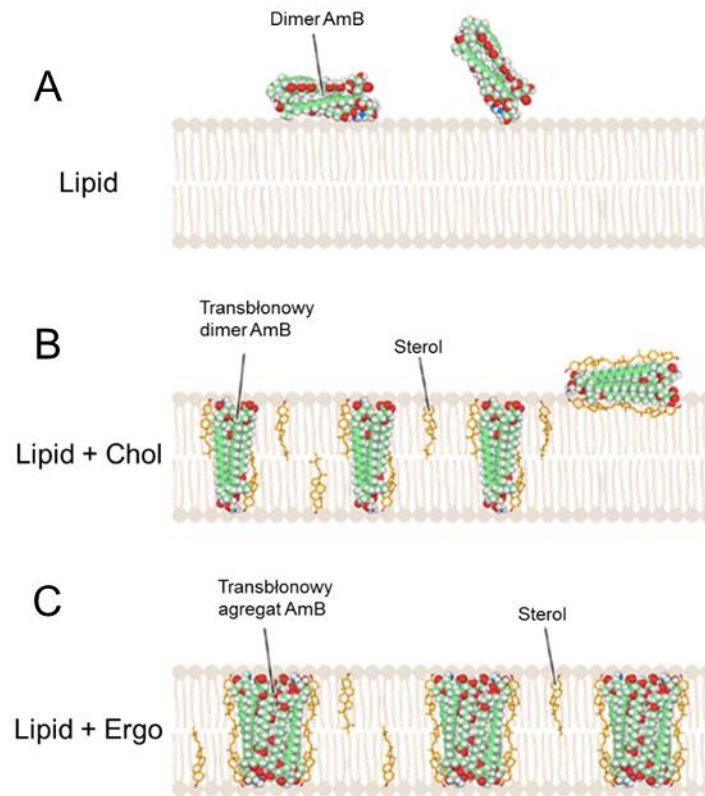
Niezwykle istotną kwestią w badaniach dotyczących AmB jest dbałość o jej czystość chemiczną oraz stabilność. Z tego też powodu antybiotyk był oczyszczany każdorazowo przed eksperymentami, a jego organizacja molekularna kontrolowana przy pomocy spektroskopii absorpcyjnej. Ważnym aspektem odnośnie stosowanych technik spektroskopowych było sprawdzenie stabilności AmB w warunkach intensywnego oświetlania laserem. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały, że AmB nie ulega fotoizomeryzacji, a zastosowane metody badawcze nie wpływają na jej postać.

### 5.2 Amfoterycyna B w działaniu na modelowe błony lipidowe

Rezultaty badań dotyczących oddziaływania AmB z modelowymi błonami lipidowymi pozwoliły sformułować następujące wnioski:

- Przy przejściu ze środowiska wodnego do lipidowego, zmianie ulega organizacja molekularna antybiotyku AmB, co potwierdzają badania widm absorpcji oraz badania prowadzone technikami dynamiki molekularnej;
- Badania orientacji cząsteczek AmB w modelowych błonach lipidowych utworzonych z fosfolipidów POPC, DMPC oraz DPPC dowodzą, że antybiotyk posiada dużą swobodę orientacyjną (jest luźno związany z powierzchnią błony lipidowej) (Rys. 5.1A);
- Analiza rezultatów dotyczących orientacji molekularnej antybiotyku pozwala stwierdzić, że obecność steroli w fazie lipidowej promuje wbudowywanie małych agregatów AmB do błon modelowych (Rys. 5.1BC);

- Na podstawie długofalowego przesunięcia widm emisji fluorescencji, stwierdzono efektywne tworzenie się agregatów cząsteczek AmB w obecności ergosterolu w błonie lipidowej (Rys. 5.1C);
- Zmiany amplitud czasów życia fluorescencji obserwowane w błonach lipidowych przypisano zmianie organizacji molekularnej antybiotyku, która wynika zarówno z różnic długości łańcuchów acylowych fosfolipidów wybranych do badań jak i obecności steroli w tak przygotowanych błonach modelowych;
- Obecność steroli w błonie lipidowej wpływa na odległość pomiędzy cząsteczkami AmB tworzącymi agregaty. Obliczenia przeprowadzone technikami dynamiki molekularnej wskazują, że przyczyną tego zjawiska jest formowanie się heterokompleksów oligomerycznych antybiotyku ze sterolami;
- Stwierdzono, że ergosterol wpływa na asocjację dimerów AmB do wyższych form zagregowanych, które odpowiadają głównie za aktywność biologiczną antybiotyku (Rys. 5.1C);
- Minimalizacja efektów toksycznych antybiotyku AmB mogłaby opierać się na formowaniu dimerów AmB w obecności cholesterolu oraz blokowaniu tworzenia się wyższych agregatów antybiotyku. Warto nadmienić, że w obecności cholesterolu obserwowano zmniejszenie przepuszczalności jonów w błonach zawierających AmB<sup>143</sup>;
- Cholesterol wpływa na tworzenie form AmB, które nie są związane z hydrofobowym wnętrzem dwuwarstwy, co wskazuje, że jednym z możliwych mechanizmów toksyczności antybiotyku jest przemieszczenie sterolu w błonie biologicznej przez cząsteczki antybiotyku (Rys. 5.1B).



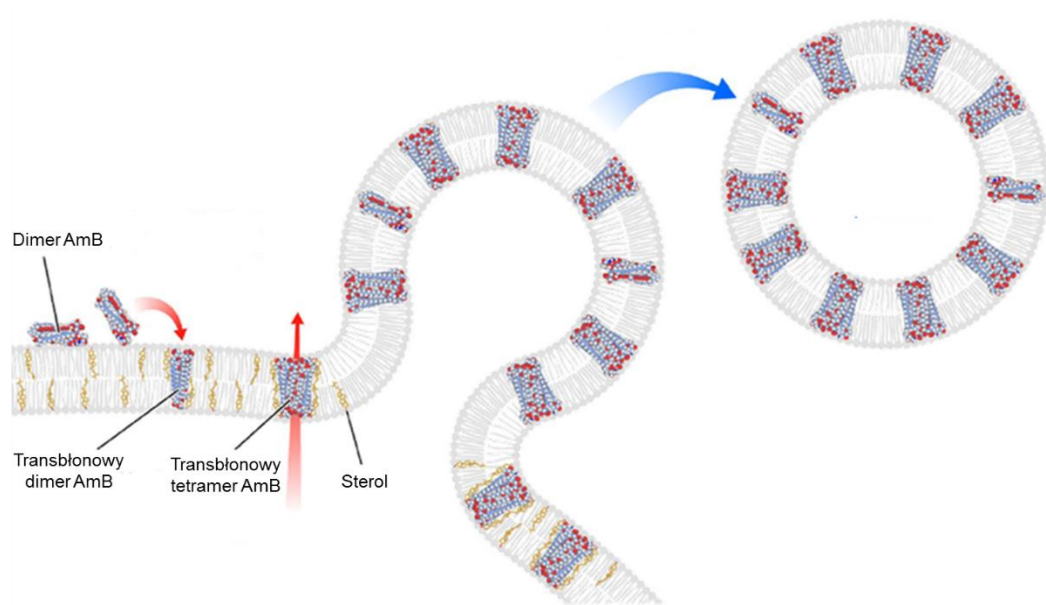
Rysunek 5.1: Schemat podsumowujący oddziaływanie AmB z modelowymi błonami lipidowymi.

### 5.3 Amfoterycyna B w działaniu na ludzkie linie komórkowe

Podsumowując wyniki uzyskane z badań wpływu AmB na ludzkie linie komórkowe sformułowano poniższe wnioski:

- Potwierdzono wysoką toksyczność AmB, zarówno w stosunku do komórek nowotworowych HT-29 jak i prawidłowych CCD 841 CoTr. Nieznacznie wyższa toksyczność w działaniu na komórki prawidłowe mogła wynikać ze składu białkowego błony lub wolniejszej proliferacji tych komórek;
- AmB zaburza biologiczne funkcje błony komórkowej wiążąc się do niej w formie małych agregatów, przez co prawdopodobnie zakłóca równowagę jonową komórek (Rys. 5.2);
- Zagregowane formy antybiotyku odpowiadają za jego toksyczność względem komórek ludzkich;
- Zarejestrowano mechanizm obronny komórek prawidłowych oraz nowotworowych polegający na usunięciu antybiotyku AmB z błony biologicznej w postaci egzosomów (Rys. 5.2);

- Stwierdzono, że tworzone egzosomy pozbawione są cząsteczek cholesterolu, co może oznaczać, że sekwestracja steroli nie jest głównym mechanizmem działania AmB.



**Rysunek 5.2:** Schemat przedstawiający oddziaływanie AmB z komórkami ludzkimi oraz mechanizm obronny komórek przed działaniem antybiotyku.

#### **5.4 Amfoterycyna B w działaniu na linie komórkowe zawierające transportery lipidowe**

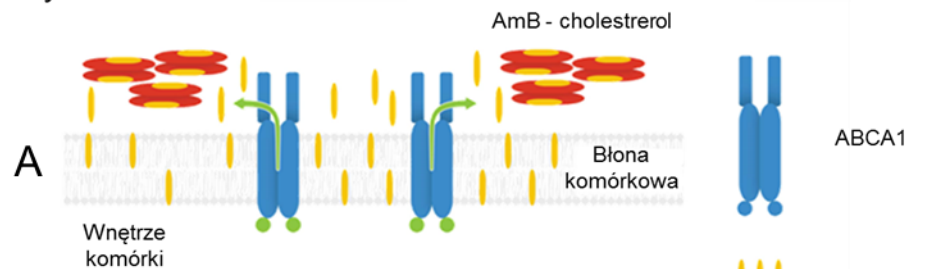
Obecność steroli w błonie komórkowej istotnie wpływa na aktywność AmB. Poniżej sformułowano wnioski na podstawie badań oddziaływania AmB z komórkami zawierającymi transportery lipidowe:

- Dodanie AmB do komórek z aktywnym transporterem cholesterolu powoduje lokowanie się antybiotyku na zewnątrz błony w postaci dimerów antyrównoległych (Rys. 5.3A);
- Badania orientacji nowopowstałych struktur (dimery antyrównoległe AmB z cholesterolem) wskazują na ich dużą swobodę ruchu charakteryzowaną niską wartością anizotropii;

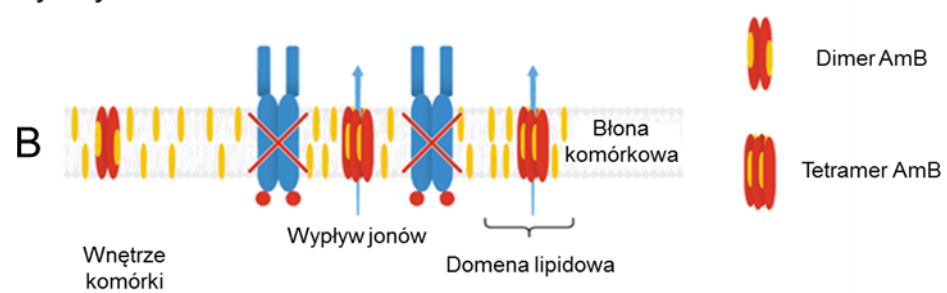


- Widma fluorescencji AmB zarejestrowane dla komórek posiadających nieaktywny transporter ABCA1 wskazują na obecność w błonie form zagregowanych antybiotyku. Brak tych struktur w błonie komórek z aktywnym transporterem wskazuje, że sterole są niezbędne do ich tworzenia. Krótkie czasy życia fluorescencji zarejestrowane w błonach komórek MMG również potwierdzają tam obecność agregatów, które prawdopodobnie formują kanały jonowe (Rys. 5.3B);
- Ze względu na fakt, że cholesterol obecny w dwuwarstwie sprzyja inkorporacji antybiotyku do błony, komórki w których transporter ABCA1 ulega ekspresji są bardziej odporne na działanie AmB;
- Potencjalna ochrona pacjentów przed toksycznym działaniem AmB mogłaby opierać się na regulacji ekspresji białka ABCA1 poprzez statyny<sup>144</sup> lub agonistów wątrobowych receptorów X<sup>145</sup>.

#### Aktywny ABCA1



#### Nieaktywny ABCA1

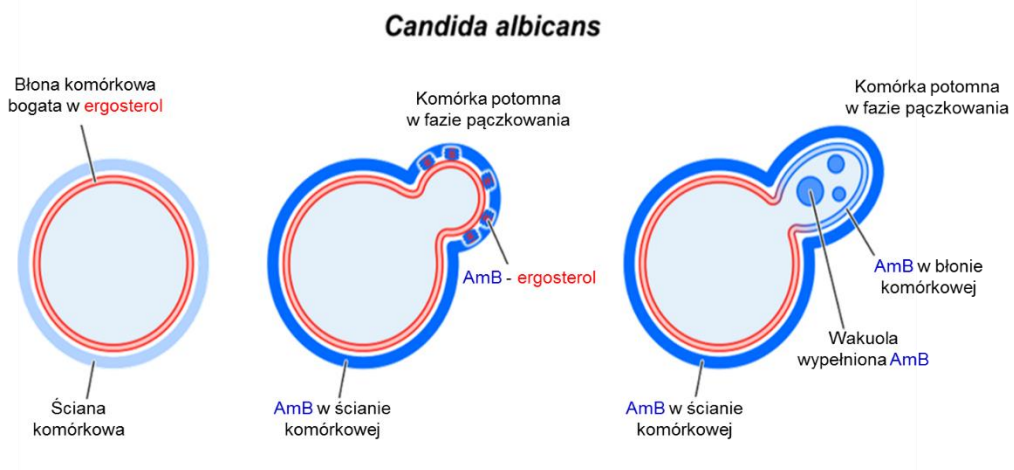


**Rysunek 5.3:** Schemat przedstawiający oddziaływanie AmB z błonami zawierającymi aktywny oraz nieaktywny transporter cholesterolu.

## 5.5 Amfoterycyna B w działaniu na komórki *Candida albicans*

Jednoczesne monitorowanie molekularnej organizacji oraz lokalizacji cząsteczek AmB oddziałujących z komórkami grzybiczymi, ujawniło różnorodne mechanizmy aktywności antybiotyku w błonach zawierających ergosterol.

- AmB oddziałuje z komórkami *C. albicans* poprzez małe agregaty widoczne techniką FLIM w postaci krótkiej składowej czasu życia fluorescencji;
- Ściana komórkowa stanowi barierę ochronną przed działaniem AmB. Antybiotyk dociera do błony komórkowej grzybów głównie w przypadku komórek będących w stadium pączkowania;
- Aktywność biologiczna AmB może zachodzić na dwa sposoby, poprzez formowanie zewnątrzkomórkowych struktur typu gąbek oraz gromadzenie się antybiotyku wewnątrz komórek w wakuolach czy lomasomach, co potwierdzają także badania TEM.



**Rysunek 5.4:** Schemat przedstawiający mechanizmy aktywności AmB wobec komórek *Candida albicans*.

Rysunek 5.4 przedstawia schematy prawdopodobnych sposobów obrony komórek przed działaniem AmB: barierę fizyczną, którą stanowi ściana komórkowa oraz gromadzenie AmB w zewnątrzkomórkowych strukturach. Schemat zawiera również mechanizmy działania antybiotyku obejmujące wiązanie go do błony komórkowej u *C. albicans* będących w stadium pączkowania, a także przedostawanie się AmB do wnętrza komórek. Aktywność biologiczna antybiotyku może wpływać na

właściwości strukturalne błony komórkowej oraz na procesy fizjologiczne zachodzące wewnątrz komórek grzybiczych.

## **5.6 Transportu jonów wodorowych**

Badania monitorujące przepływ jonów wodorowych w poprzek błony lipidowej, wskazują wysoce prawdopodobny mechanizm aktywności AmB. Wyniki doświadczalne poparte obliczeniami dynamiki molekularnej pozwalają sformułować poniższe wnioski:

- Amfoterycyna B zwiększa przepuszczalność jonów wodorowych przez błonę biologiczną, szczególnie w układach zawierających sterol;
- W błonach zawierających ergosterol za transport  $H^+$  odpowiadają głównie małe agregaty AmB, które mogą formować pory transbłonowe;
- Obliczenia metodami dynamiki molekularnej wskazują, że kanały jonowe tworzą oligomery AmB stabilizowane obecnością steroli w błonie.

## 6. Perspektywy dalszych badań- obniżenie toksyczności

### AmB

Dalsze badania dotyczące aktywności AmB, chciałabym ukierunkować na opracowywanie mniej toksycznych formuł antybiotyku, które jednocześnie wykazywałyby wysoką skuteczność w leczeniu grzybic. W tym celu, istotne jest określenie organizacji oraz orientacji przestrzennej AmB oddziałującej z błoną komórkową. Doskonałymi metodami do przeprowadzenia tego typu badań są mikroskopowe analizy rozpraszania ramanowskiego oraz obrazowania czasów życia fluorescencji.

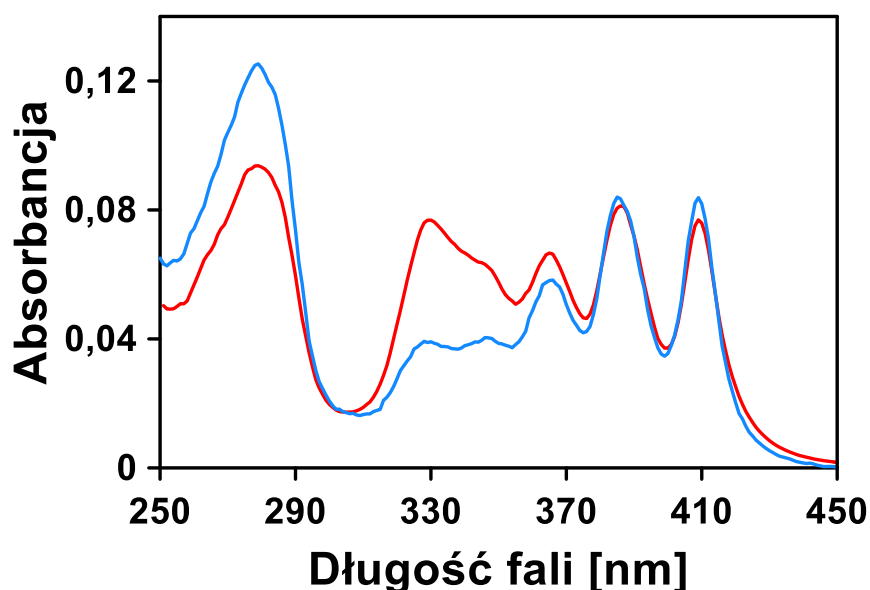
#### 6.1 Oddziaływanie AmB z białkiem BSA

Albuminy surowicze to białka pełniące wiele fizjologicznych funkcji i są odpowiedzialne między innymi za odżywianie, odporność czy metabolizm. Ich najważniejszą funkcją jest magazynowanie oraz transport wielu endogennych oraz egzogennych substancji we krwi. Wołowa albumina surowicza (BSA) jest strukturalnym homologiem ludzkiej albuminy surowiczej (HSA), a sekwencje tych białek są w 76% identyczne<sup>146,147</sup>. Farmakokinetyka oraz farmakodynamika substancji leczniczych ulega zmianie w interakcji z tymi białkami. Badania wskazują, że albumina surowicza zapobiega agregacji AmB w błonie komórkowej, przez co obniża jej toksyczność<sup>148</sup>. AmB podawana szczurom na nośniku albuminy nie zmniejszała nerkowego przepływu krwi oraz nie wpływała negatywnie na utlenianie kory mózgowej, jak to obserwowano w przypadku podawania samej AmB. Badania *in vitro* wykazały również zmniejszoną hemolizę czerwonych krwinek indukowaną AmB w obecności albumin<sup>146,149,150</sup>.

Oddziaływanie AmB z białkami transportującymi potencjalnie pozwoliłoby rozdzielić jej efekty terapeutyczne od toksycznych. Przeprowadziłam wstępne badania charakteryzujące AmB połączoną z białkiem BSA oraz oddziaływania AmB-BSA z liposomami zawierającymi ergosterol.

Wyjściowo, AmB łączono z BSA i dodawano do lipidów w stosunku cząsteczkowym 1:1:1000. Tak przygotowaną próbkę mieszało się następnie przez godzinę. Próbkę wirowano w celu usunięcia form zagregowanych antybiotyku, co

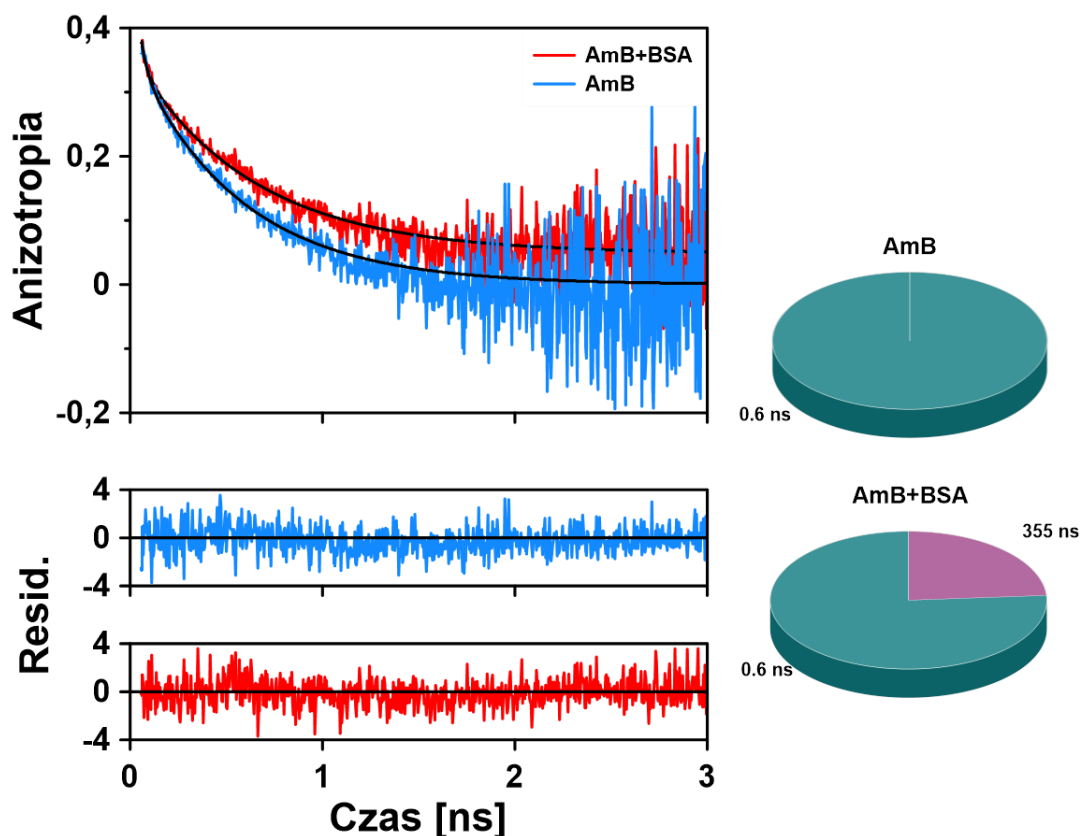
widoczne było poprzez zmniejszenie intensywności pasma absorpcji agregatów obserwowanego w obszarze 310-360 nm (Rys. 6.1).



Rysunek 6.1: Widma absorpcji BSA z AmB przed (kolor czerwony) oraz po wirowaniu (kolor niebieski), wykonane dla tej samej próbki zawieszanej w PBS. Pomiar przeprowadzono w kwarcowej kuwecie 1 cm.

W celu określenia, jaka pula AmB połączyła się z białkiem nośnikowym, zmierzono zaniki anizotropii fluorescencji. Jest to bardzo precyzyjna metoda badawcza informująca o szybkości rotacji cząsteczki fluoryzującej. Tutaj zastosowano ją do określenia czasu po jakim wartość anizotropii badanego układu spadnie do zera. Jak można się było spodziewać, cząsteczki AmB niezwiązane z BSA szybciej osiągają zerową anizotropię ze względu na swobodniejszą możliwość rotacji niż te, które połączone są z białkiem (Rys. 6.2). Zaletą tej metody jest to, że niesie bezpośrednią informację o amplitudzie (udziale) składowej czasu zaniku anizotropii (szybkość rotacji).

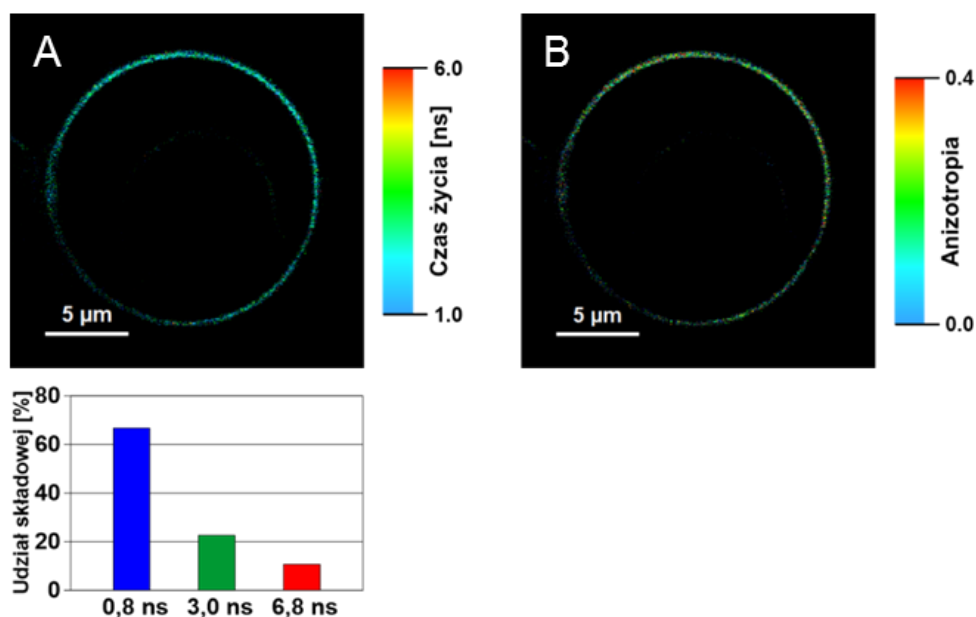
Wyznaczono czas zaniku anizotropii fluorescencji wolnej AmB w metanolu, który wynosił 0,6 ns. Dla AmB oddziałującej z BSA, określono dwa czasy zaniku wynoszące 0,6 ns oraz 355 ns. Udział składowej o czasie zaniku równym 355 ns wskazuje na związanie się pewnej puli antybiotyku z białkiem. Procentowy udział wydłużonego czasu świadczy o tym, że  $\frac{1}{4}$  cząsteczek AmB przyłączyła się do BSA (Rys. 6.2).



Rysunek 6.2: Zaniki anizotropii fluorescencji AmB w metanolu (kolor niebieski) oraz AmB połączonej z białkiem BSA (kolor czerwony). Intensywność fluorescencji obserwowano przy długości fali 600 nm oraz wzbudzeniu światłem laserowym 405 nm. Dolny panel przedstawia graficzny test dopasowania funkcji w postaci wykresu ważonych residuów, których dystrybucja oscyluje wokół 0. Udziały procentowe czasów zaniku anizotropii fluorescencji AmB oraz AmB dodanej do BSA przedstawiono po stronie prawej. Kolor zielony reprezentuje amplitudę czasu równego 0,6 ns natomiast fioletowy czasu 355 ns.

Istotną kwestią było również to, czy AmB przyłączona do białka nośnikowego będzie wydajnie transportowana do błony lipidowej. W tym celu przeprowadzono pilotażowe pomiary z zastosowaniem techniki FLIM i zbadano oddziaływanie kompleksu AmB-BSA z modelowymi błonami (liposomy uformowane z POPC + 30 mol% Ergo). Stężenie AmB w zawiesinie liposomów wynosiło  $6,2 \times 10^{-7}$  M, natomiast BSA  $5,5 \times 10^{-6}$  M. Wyniki obrazowania FLIM (Rys. 6.3) niosące informację o udziale składowych czasów życia fluorescencji, a tym samym organizacji molekularnej antybiotyku wskazują na obecność trzech form AmB. Były to: agregaty (0,8 ns - kolor niebieski), monomery (3,0 ns - kolor zielony) oraz dimery antyrównoległe (6,8 ns - kolor czerwony). Jak można zauważyć prawie  $\frac{1}{4}$  całkowitej puli AmB stanowią monomery antybiotyku, co koresponduje z procentowym udziałem AmB związanej z BSA (Rys. 6.2). Mogłoby to oznaczać, że AmB łączy się

z białkiem w postaci monomerycznej, a więc postaci poszukiwanej na tym etapie badań.



**Rysunek 6.3:** Obrazy FLIM (A) oraz anizotropii fluorescencji (B) liposomów oddziałujących z kompleksem AmB-BSA. W dolnym panelu przedstawiono procentowy udział trzech składowych czasu życia fluorescencji: 0,8 ns - agregaty, 3,0 ns - monomer, 6,8 ns - dimer antyrównoległy.

Niewykluczone, że formy zagregowane czy dimeryczne antybiotyku również wchodzi w interakcje z BSA. W przyszłości należałoby przeprowadzić dodatkowe badania organizacji molekularnej AmB w obecności samego białka z zastosowaniem obrazowania FLIM. Anizotropia fluorescencji wskazuje, że AmB nie wbudowuje się w błonę lipidową jak to obserwowano w badaniach modelowych (Rozdział 4.2), mimo iż w dwuwarstwie obecny był ergosterol. Być może nie pozwala na to wiązanie się antybiotyku z białkiem.

Badania właściwości kompleksu AmB-BSA wymagają przeprowadzenia szeregu dalszych eksperymentów określających szczegółowo, które formy antybiotyku wiążą się z białkiem nośnikowym. Należałoby także zoptymalizować proces wydajnego łączenia AmB z białkiem BSA, a w następnym kroku przeprowadzić badania oddziaływania potencjalnie mniej toksycznego kompleksu antybiotykowo-białkowego z komórkami ludzkimi oraz grzybiczymi. Istotne jest sprawdzenie, czy formuły białkowe AmB rzeczywiście są mniej toksyczne wobec komórek ludzkich, ale nadal skuteczne w zwalczaniu komórek grzybiczych.

## 6.2 Nanocząstki AmB

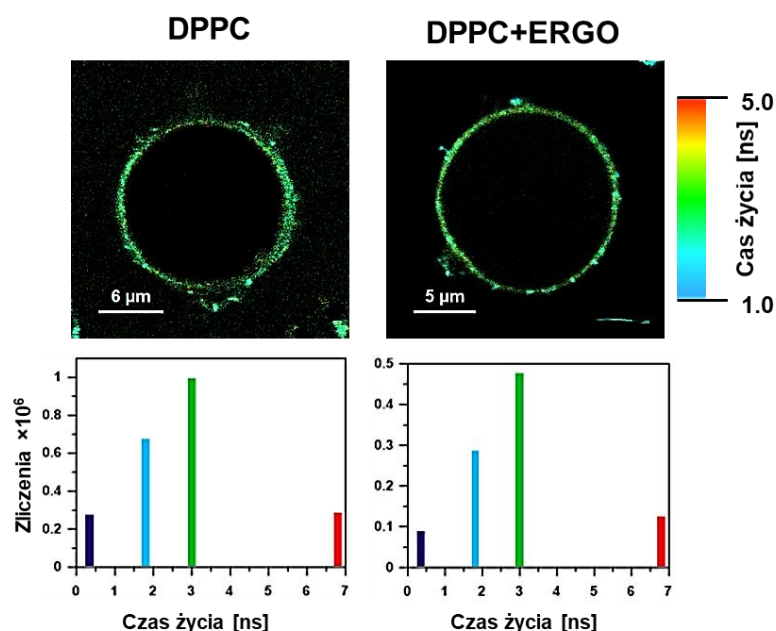
W perspektywie badań, również ukierunkowanych na obniżenie toksyczności antybiotyku, chciałabym szczegółowo zbadać mechanizm oddziaływania srebrnych nanocząstek tworzonych przy współudziale AmB (NP-AmB) z komórkami zawierającymi ergosterol oraz cholesterol. Dotychczasowe badania wskazują, że AmB łączy się z cząsteczkami srebra w formie monomerycznej, co zapobiega jej agregacji, a przez to jest potencjalnie mniej szkodliwa dla komórek ludzkich. Co istotne, hybrydy tego typu nadal wykazują silne działanie grzybobójcze<sup>121</sup>.

Przeprowadzono wstępne badania mające na celu scharakteryzowanie oddziaływań NP-AmB z błonami lipidowymi (liposomy formowane z fosfolipidu DPPC oraz DPPC z dodatkiem ergosterolu). Nanocząstki dodawano do liposomów bezpośrednio przed mikroskopowymi pomiarami: FLIM oraz rozpraszania ramanowskiego. Rys. 6.4 przedstawia obrazy FLIM liposomów oraz udział składowych czasów życia fluorescencji AmB. Poniżej na wykresach zaprezentowano udziały składowych czasów życia fluorescencji w skali liczby zliczeń. Kolorem granatowym oznaczono udział agregatów (0,3 ns), kolorem niebieskim dimerów równoległych (1,8 ns), kolorem zielonym monomerów (3,0 ns), a czerwonym dimerów antyrównoległych AmB. Największą pulę antybiotyku stanowiły monomery otaczające jony srebra, które uznawane są za mniej toksyczne formy leku. Zaobserwowano także zgrupowane punktowo cząsteczki AmB ulokowane blisko błony lipidowej. Niska amplituda krótkiej składowej czasu życia emisji mogła wynikać z gaszenia fluorescencji w obecności nanocząstek. Niestety, na obecnym etapie badań nie jest możliwe precyzyjne określenie udziału form organizacyjnych AmB jakie oddziałują z komórką. Wynika to ze znanego w literaturze naukowej faktu obniżenia czasu życia emisji fluoroforu w pobliżu nanocząstek<sup>151–153</sup>. Cząsteczki antybiotyku mogą więc występować w formie monomerycznej lub innej, ale poprzez bezpromienisty transfer energii do nanocząstki obniżają charakteryzującą je wartość czasu życia. Prawdopodobnie, formy organizacyjne AmB o dłuższym czasie życia emisji nie były donorami energii w przypadku zarejestrowanych wyników.

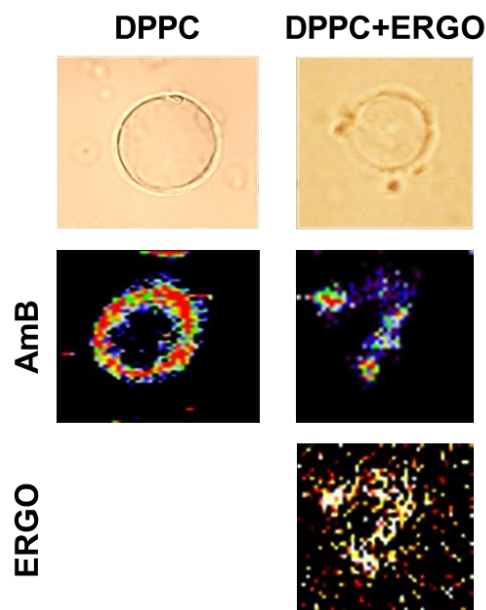
Koncepcja działania NP-AmB opiera się na mechanizmie sekwestrowania ergosterolu przez te struktury. Według tej hipotezy roboczej nanocząstka otoczona monomerami AmB zbliżałaby się do błony i nie odrywając się od nanocząstki „odsysała” sterole w miejscu oddziaływania. Przeprowadzono badania wstępne celem



weryfikacji hipotezy. Z uwagi na to, że technika FLIM informuje o tym jaka jest strukturalna organizacja leku, natomiast nie pozwala na zobrazowanie cząsteczek ergosterolu w badanym układzie, posłużono się metodą komplementarną. Mikroskopia ramanowska pozwala określić jednocześnie i lokalizację NP-AmB i ergosterolu. Rys. 6.5 przedstawia wyniki uzyskane techniką obrazowania ramanowskiego liposomów wskazujące dystrybucję obu tych kluczowych cząsteczek w badanych układach. W przypadku błony utworzonej z fosfolipidu DPPC, AmB jest rozmieszczona jednorodnie w liposomach, natomiast w błonie zawierającej ergosterol, antybiotyk wyraźnie lokuje w miejscach, w których obserwowana jest również największa ilość sterolu, co być może potwierdzać postulowany mechanizm działania NP-AmB.

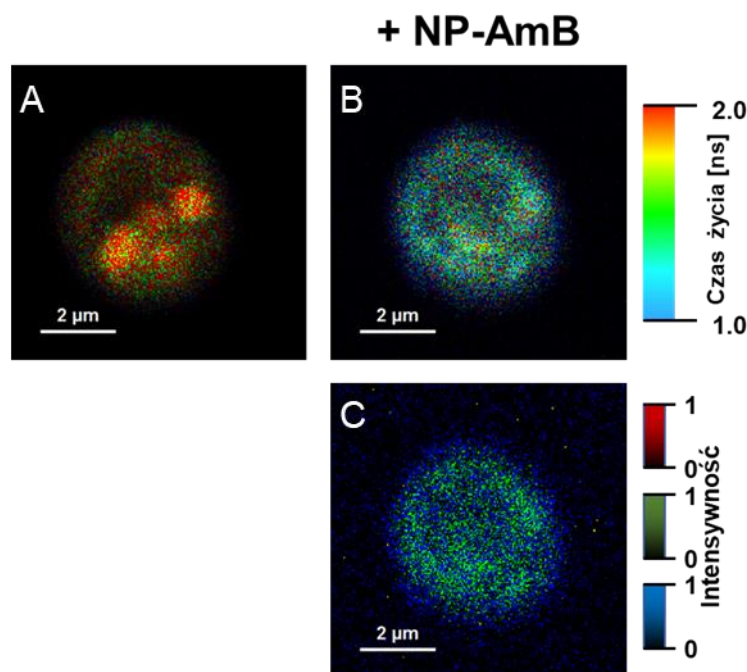


**Rysunek 6.4:** Zdjęcia FLIM liposomów utworzonych z DPPC oraz z DPPC z dodatkiem ergosterolu, zobrazowane w skali czasów życia fluorescencji. Panel dolny przestawia udział (w skali liczby zliczeń) składowych czasów życia, które zostały przedstawione dla liposomów znajdujących się powyżej. Kolor granatowy - składowa 0,3 ns, kolor niebieski - składowa 1,8 ns, kolor zielony - składowa 3 ns, kolor czerwony - składowa 6,8 ns.



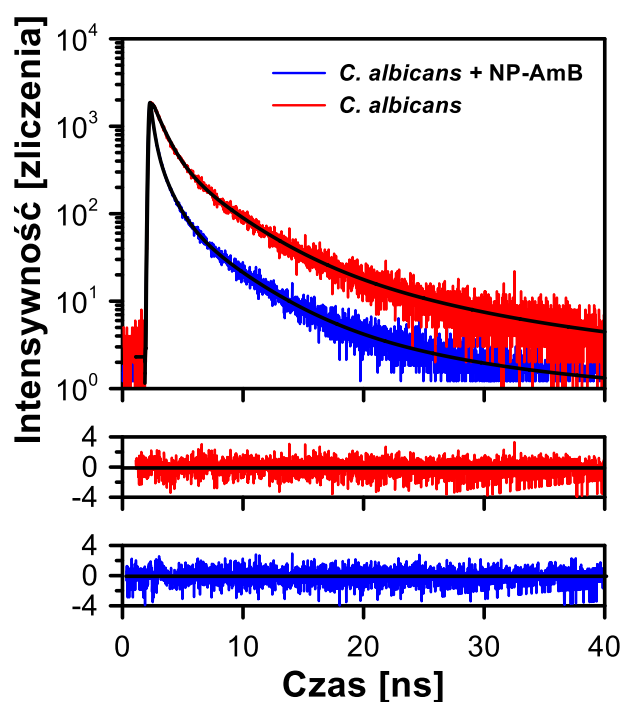
**Rysunek 6.5:** Obrazy liposomów utworzonych z DPPC oraz z DPPC z dodatkiem ergosterolu. Panel górny - obraz optyczny, panel środkowy - obraz ramanowski AmB, panel dolny - obraz ramanowski ergosterolu.

To dowodzi, że nanocząstki utworzone z AmB mogą skutecznie ekstrahować i wiązać cząsteczki sterolu obecne w fazie lipidowej i tworzyć z nimi struktury pozabłonowe. Takie spostrzeżenie otwiera drogę do inżynierii nowych form molekularnych, które dzięki technologii funkcjonalizowania powierzchni byłyby zdolne do usuwania ergosterolu z komórek grzybów i niezdolne do tworzenia struktur transbłonowych leku.



**Rysunek 6.6:** Obrazy FLIM komórek *C. albicans* przedstawione w skali czasów życia fluorescencji. A - kontrolna komórka *C. albicans* zobrazowana skalą czasów życia fluorescencji, B - komórka *C. albicans* po dodaniu NP-AmB zobrazowana skalą czasów życia fluorescencji, C - komórka *C. albicans* po dodaniu NP-AmB zobrazowana skalą RGB (R - 3,7 ns, G - 1,1 ns, B - 0,3 ns).

Oddziaływanie układów hybrydowych NP-AmB z modelowymi błonami lipidowymi było bodźcem dla przeprowadzenia badań wpływu takich nanocząstek na komórki grzybowe. Rys. 6.6 przedstawia typowe obrazy uzyskane techniką FLIM dla komórek *C. albicans* przed dodaniem nanocząstek (panel A) oraz po ich dodaniu (panele B i C). Jak łatwo zauważyć autofluoryzująca komórka grzyba wybarwiona jest kolorami czerwonym i zielonym, które odpowiadają dłuższym wartościom czasów życia fluorescencji zgodnie z zastosowaną skalą zaprezentowaną po prawej stronie rysunku. Co charakterystyczne, po dodaniu NP-AmB obniża się czas życia emisji. Jest to widoczne poprzez zmianę koloru obrazującego wyniki FLIM jak i skrócenie eksponencjalnych zaników fluorescencji, które zaprezentowano na rys. 6.7. Pokuszono się o wydzielenie występowania kolejnych składowych czasów życia fluorescencji, którymi dopasowywano zaniki emisji, co przedstawia rys. 6.6C. Jak łatwo zauważyć, krótka składowa występuje głównie wokół komórki grzybowej, co dowodzi przyłączania się hybryd NP-AmB do komórek. Zarejestrowano nowe wartości czasów życia emisji, którym należałoby przypisać określoną formę organizacyjną leku.



Rysunek 6.7: Krzywe zaniku intensywności fluorescencji zarejestrowane dla komórek *C. albicans* (kolor czerwony) oraz komórek *C. albicans* oddziałujących z NP-AmB (kolor niebieski) wraz z dopasowaniami (linie czarne ciągłe) składowymi 0,3 ns, 1,1 ns oraz 3,7 ns. Panele poniżej prezentują residua jakości dopasowań do zaników eksponencjalnych.

Oddziaływanie NP-AmB na komórki ludzkie oraz grzybicze wymaga przeprowadzenia szeregu dalszych badań, szczególnie charakteryzujących ich mechanizm działania. W przyszłości chciałbym również zweryfikować pogląd o zmniejszonej toksyczności tych struktur, badając ich wpływ na przeżywalność oraz mechanizm działania wobec komórek ludzkich.

## 7. Bibliografia

1. Almeida, F., Rodrigues, M. L. & Coelho, C. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
2. Nucci, M. & Marr, K. A. Emerging Fungal Diseases. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 521–526 (2005).
3. Casadevall, A. Fungal Diseases in the 21st Century: The Near and Far Horizons. *Pathog. Immun.* **3**, 183–196 (2018).
4. Saravolatz, L. D., Ostrosky-Zeichner, L., Marr, K. A., Rex, J. H. & Cohen, S. H. Amphotericin B: Time for a New “Gold Standard”. *Clin. Infect. Dis.* **37**, 415–425 (2003).
5. Anderson, T. M. *et al.* Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 400–406 (2014).
6. Lee, P. P. & Lau, Y.-L. Cellular and Molecular Defects Underlying Invasive Fungal Infections—Revelations from Endemic Mycoses. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
7. Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O. & Denning, D. W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *J. Fungi* **3**, (2017).
8. Friedman, D. Z. P. & Schwartz, I. S. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *J. Fungi Basel Switz.* **5**, (2019).
9. Mayer, F. L., Wilson, D. & Hube, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **4**, 119–128 (2013).
10. Maertens, J. Evaluating prophylaxis of invasive fungal infections in patients with haematologic malignancies. *Eur. J. Haematol.* **78**, 275–282 (2007).
11. Fukuda, T. *et al.* Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood* **102**, 827–833 (2003).
12. Wingard, J. R. & Leather, H. A new era of antifungal therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **10**, 73–90 (2004).
13. Rapala-Kozik, M. *et al.* Inactivation of the Antifungal and Immunomodulatory Properties of Human Cathelicidin LL-37 by Aspartic Proteases Produced by the Pathogenic Yeast *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **83**, 2518–2530 (2015).
14. Perfect, J. R. *et al.* Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **36**, 1122–1131 (2003).
15. Rex, J. H. *et al.* Practice Guidelines for the Treatment of Candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 662–678 (2000).
16. Murray, C. K. *et al.* Incidence of systemic fungal infection and related mortality following severe burns. *Burns* **34**, 1108–1112 (2008).
17. Lass-Flörl, C. Treatment of Infections Due to *Aspergillus terreus* Species Complex. *J. Fungi* **4**, 83 (2018).

18. Valiante, V., Macheleidt, J., Föge, M. & Brakhage, A. A. The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
19. Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M. & Kozik, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim. Pol.* **56**, 211–224 (2009).
20. Pagano, L. *et al.* Mucormycosis in patients with haematological malignancies: a retrospective clinical study of 37 cases. *Br. J. Haematol.* **99**, 331–336 (1997).
21. Dignani, M. C. Epidemiology of invasive fungal diseases on the basis of autopsy reports. *F1000Prime Rep.* **6**, (2014).
22. Dignan, F. L. *et al.* An early CT-diagnosis-based treatment strategy for invasive fungal infection in allogeneic transplant recipients using caspofungin first line: an effective strategy with low mortality. *Bone Marrow Transplant.* **44**, 51–56 (2009).
23. Arastehfar, A. *et al.* Identification of Mycoses in Developing Countries. *J. Fungi* **5**, 90 (2019).
24. Chen, S. C. A. & Sorrell, T. C. Antifungal agents. *Med. J. Aust.* **187**, 404–409 (2007).
25. Gow, N. A. R., Latge, J.-P. & Munro, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol. Spectr.* **5**, (2017).
26. Spampinato, C. & Leonardi, D. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Res. Int.* **2013**, (2013).
27. Ghannoum, M. A. & Rice, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 501–517 (1999).
28. Krogh-Madsen, M., Arendrup, M. C., Heslet, L. & Knudsen, J. D. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **42**, 938–944 (2006).
29. Como, J. A. & Dismukes, W. E. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N. Engl. J. Med.* **330**, 263–272 (1994).
30. Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rogers, P. D. & Perlin, D. S. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a019752 (2014).
31. Polak, A. Synergism of polyene antibiotics with 5-fluorocytosine. *Chemotherapy* **24**, 2–16 (1978).
32. Espinel-Ingroff, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* **25**, 101–106 (2008).
33. Kelly, S. L. *et al.* Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett.* **400**, 80–82 (1997).

34. Vermes, A., Guchelaar, H. J. & Dankert, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, 171–179 (2000).
35. Chapeland-Leclerc, F. *et al.* Inactivation of the FCY2 gene encoding purine-cytosine permease promotes cross-resistance to flucytosine and fluconazole in *Candida lusitanae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3101–3108 (2005).
36. Vandeputte, P. *et al.* Molecular mechanisms of resistance to 5-fluorocytosine in laboratory mutants of *Candida glabrata*. *Mycopathologia* **171**, 11–21 (2011).
37. Kathiravan, M. K. *et al.* The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 5678–5698 (2012).
38. TYPES OF ANTIMICROBIALS. *Roughdraft*  
<https://knguyen8252.wixsite.com/antimicrobial/types-of-resistance>.
39. Odds, F. C., Brown, A. J. P. & Gow, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**, 272–279 (2003).
40. Francois, I. E. J. A., Aerts, A. M., Cammue, B. P. A. & Thevissen, K. Currently used antimycotics: spectrum, mode of action and resistance occurrence. *Curr. Drug Targets* **6**, 895–907 (2005).
41. Mukherjee, P. K., Sheehan, D. J., Hitchcock, C. A. & Ghannoum, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 163–194 (2005).
42. Freitas, M. S. *et al.* Fungal Extracellular Vesicles as Potential Targets for Immune Interventions. *mSphere* **4**, (2019).
43. Mesa-Arango, A. C., Scorzoni, L. & Zaragoza, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front. Microbiol.* **3**, (2012).
44. Talas, L., Szigeti, Z. M., Banfalvi, G. & Szeman-Nagy, G. Effect of amphotericin B and voriconazole on the outgrowth of conidia of *Aspergillus fumigatus* followed by time-lapse microscopy. *AMB Express* **9**, (2019).
45. Sousa-Batista, A. J., Pacienza-Lima, W., Ré, M. I. & Rossi-Bergmann, B. Novel and safe single-dose treatment of cutaneous leishmaniasis with implantable amphotericin B-loaded microparticles. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **11**, 148–155 (2019).
46. Chattopadhyay, A. & Jafurulla, M. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**, 7–12 (2011).
47. Muraglia, K. A. *et al.* Small-molecule ion channels increase host defences in cystic fibrosis airway epithelia. *Nature* **567**, 405–408 (2019).
48. Xu, F. *et al.* Amphotericin B Inhibits Enterovirus 71 Replication by Impeding Viral Entry. *Sci. Rep.* **6**, 1–9 (2016).
49. Bates, D. W. *et al.* Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **32**, 686–693 (2001).

50. Rocha, P. N. *et al.* Incidence, Predictors, and Impact on Hospital Mortality of Amphotericin B Nephrotoxicity Defined Using Newer Acute Kidney Injury Diagnostic Criteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 4759–4769 (2015).
51. Harmsen, S., McLaren, A. C., Pauken, C. & McLemore, R. Amphotericin B Is Cytotoxic at Locally Delivered Concentrations. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **469**, 3016 (2011).
52. Gagoś, M. & Czernel, G. Oxidized forms of polyene antibiotic amphotericin B. *Chem. Phys. Lett.* **598**, 5–9 (2014).
53. Klimek, K., Strubińska, J., Czernel, G., Ginalska, G. & Gagoś, M. In vitro evaluation of antifungal and cytotoxic activities as also the therapeutic safety of the oxidized form of amphotericin B. *Chem. Biol. Interact.* **256**, 47–54 (2016).
54. Bagiński, M., Bruni, P. & Borowski, E. Comparative analysis of the distribution of the molecular electrostatic potential for cholesterol and ergosterol. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **311**, 285–296 (1994).
55. Baran, M., Borowski, E. & Mazerski, J. Molecular modeling of amphotericin B–ergosterol primary complex in water II. *Biophys. Chem.* **141**, 162 (2009).
56. Kamiński, D. M. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *Eur. Biophys. J. EBJ* **43**, 453–467 (2014).
57. Ellis, D. Amphotericin B: Spectrum and resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **49 Suppl 1**, 7–10 (2002).
58. Purkait, B. *et al.* Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1031–1041 (2012).
59. Leon, C. G. *et al.* In vitro cytotoxicity of two novel oral formulations of Amphotericin B (iCo-009 and iCo-010) against *Candida albicans*, human monocytic and kidney cell lines. *Lipids Health Dis.* **10**, 144 (2011).
60. Georgopapadakou, N. H. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 547–557 (1998).
61. Mesa-Arango, A. C. *et al.* Cell Wall Changes in Amphotericin B-Resistant Strains from *Candida tropicalis* and Relationship with the Immune Responses Elicited by the Host. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 2326–2335 (2016).
62. Serrano, D., Ballesteros, M., Schatzlein, A., Torrado, J. & Uchegbu, I. Amphotericin B Formulations – The Possibility of Generic Competition. *Pharm. Nanotechnol.* **1**, 250–258 (2013).
63. Aversa, F. *et al.* Liposomal amphotericin B (AmBisome®) at beginning of its third decade of clinical use. *J. Chemother. Florence Italy* **29**, 131–143 (2017).
64. Bekersky, I. *et al.* Plasma Protein Binding of Amphotericin B and Pharmacokinetics of Bound versus Unbound Amphotericin B after Administration of Intravenous Liposomal Amphotericin B (AmBisome) and Amphotericin B Deoxycholate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 834–840 (2002).
65. Lestner, J. M. *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Amphotericin B Deoxycholate, Liposomal Amphotericin B, and Amphotericin B Lipid



- Complex in an In Vitro Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3432–3441 (2010).
66. Walsh, T. J. *et al.* Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3487–3496 (2001).
  67. Caffrey, P., Lynch, S., Flood, E., Finnan, S. & Oliynyk, M. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem. Biol.* **8**, 713–723 (2001).
  68. Chudzik, B., Czernel, G., Miaskowski, A. & Gagoś, M. Amphotericin B-copper(II) complex shows improved therapeutic index in vitro. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **97**, 9–21 (2017).
  69. Gola, J. *et al.* Amphotericin B-copper (II) complex alters transcriptional activity of genes encoding transforming growth factor-beta family members and related proteins in renal cells. *Pharmacol. Rep. PR* **69**, 1308–1314 (2017).
  70. Kagan, S. *et al.* Toxicity Mechanisms of Amphotericin B and Its Neutralization by Conjugation with Arabinogalactan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 5603–5611 (2012).
  71. Chen, Y.-C., Su, C.-Y., Jhan, H.-J., Ho, H.-O. & Sheu, M.-T. Physical characterization and in vivo pharmacokinetic study of self-assembling amphotericin B-loaded lecithin-based mixed polymeric micelles. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 7265–7274 (2015).
  72. Serrano, D. R. *et al.* Oral particle uptake and organ targeting drives the activity of amphotericin B nanoparticles. *Mol. Pharm.* **12**, 420–431 (2015).
  73. Rolón, M. *et al.* Engineering Oral and Parenteral Amorphous Amphotericin B Formulations against Experimental *Trypanosoma cruzi* Infections. *Mol. Pharm.* **14**, 1095–1106 (2017).
  74. Chudzik, B. *et al.* Synergistic antifungal interactions of amphotericin B with 4-(5-methyl-1,3,4-thiadiazole-2-yl) benzene-1,3-diol. *Sci. Rep.* **9**, 1–14 (2019).
  75. Tufteland, M. L., Selitrennikoff, C. P. & O Ryan, R. Nanodisks protect amphotericin B from ultraviolet light and oxidation-induced damage. *Pest Manag. Sci.* **65**, 624–628 (2009).
  76. Tutaj, K. *et al.* The orientation of the transition dipole moments of a polyene antibiotic Amphotericin B under UV-VIS studies. *J. Photochem. Photobiol. B* **151**, 83–88 (2015).
  77. Ganis, P., Avitabile, G., Mechlinski, W. & Schaffner, C. P. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 4560–4564 (1971).
  78. Zielińska, J., Wieczór, M., Bączek, T., Gruszecki, M. & Czub, J. Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).

79. Neumann, A., Bagiński, M. & Czub, J. How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin B? Free energy of binding between the drug and its membrane targets. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 18266–18272 (2010).
80. Romanini, D., Avalle, G., Nerli, B. & Picó, G. Thermodynamic and spectroscopic features of the behavior of amphotericin B in aqueous medium. *Biophys. Chem.* **77**, 69–77 (1999).
81. Wasko, P. *et al.* Toward Understanding of Toxic Side Effects of a Polyene Antibiotic Amphotericin B: Fluorescence Spectroscopy Reveals Widespread Formation of the Specific Supramolecular Structures of the Drug. *Mol. Pharm.* **9**, 1511–1520 (2012).
82. Les, K. A. *et al.* Poly(methacrylic acid) complexation of amphotericin B to treat neglected diseases. *Polym. Chem.* **5**, 1037–1048 (2013).
83. Starzyk, J. *et al.* Self-Association of Amphotericin B: Spontaneous Formation of Molecular Structures Responsible for the Toxic Side Effects of the Antibiotic. *J. Phys. Chem. B* **118**, 13821–13832 (2014).
84. Labuz, M., Wal, A., Wisz, G. & Kuzma, M. Symmetry and classification of electron states in polyacenes. *J. Phys. Conf. Ser.* **30**, 325–332 (2006).
85. Gruszecki, W., Gagoś, M. & Hereć, M. Dimers of polyene antibiotic amphotericin B detected by means of fluorescence spectroscopy: Molecular organization in solution and in lipid membranes. *J. Photochem. Photobiol. B* **69**, 49–57 (2003).
86. Walker, L. *et al.* The Viscoelastic Properties of the Fungal Cell Wall Allow Traffic of AmBisome as Intact Liposome Vesicles. *mBio* **9**, (2018).
87. Bagiński, M., Resat, H. & McCammon, J. A. Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation. *Mol. Pharmacol.* **52**, 560–570 (1997).
88. Cohen, B. E. Amphotericin B Membrane Action: Role for Two Types of Ion Channels in Eliciting Cell Survival and Lethal Effects. *J. Membr. Biol.* **238**, 1–20 (2010).
89. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer, 2006).
90. Frackowiak, D. The Jablonski diagram. *J. Photochem. Photobiol. B* **2**, 399 (1988).
91. Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles And Applications*. (WILEY-VCH, 2002).
92. L. Mann, T. & J. Krull, U. Fluorescence polarization spectroscopy in protein analysis. *Analyst* **128**, 313–317 (2003).
93. Kawski, A. & Bojarski, P. Contribution of dielectric friction to the rotational reorientation time. *Chem. Phys.* **375**, 52–57 (2010).
94. Böhmer, M. *et al.* Time-resolved confocal scanning device for ultrasensitive fluorescence detection. *Rev. Sci. Instrum.* **72**, 4145–4152 (2001).
95. Wahl, M. *et al.* Scalable time-correlated photon counting system with multiple independent input channels. *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 123113 (2008).

96. Sillen, A. & Engelborghs, Y. The Correct Use of “Average” Fluorescence Parameters. *Photochem. Photobiol.* **67**, 475–486 (1998).
97. Gadella, T. W. J., Jovin, T. M. & Clegg, R. M. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): Spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale. *Biophys. Chem.* **48**, 221–239 (1993).
98. Gambin, Y. *et al.* Single-Molecule Fluorescence Reveals the Oligomerization and Folding Steps Driving the Prion-like Behavior of ASC. *J. Mol. Biol.* **430**, 491–508 (2018).
99. Chung, H. S., McHale, K., Louis, J. M. & Eaton, W. A. Single-molecule fluorescence experiments determine protein folding transition path times. *Science* **335**, 981–984 (2012).
100. Deschout, H. *et al.* Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy. *Nat. Methods* **11**, 253–266 (2014).
101. Wang, X., Uchida, T. & Minami, S. A Fluorescence Lifetime Distribution Measurement System Based on Phase-Resolved Detection Using an Image Dissector Tube. *Appl. Spectrosc. - APPL SPECTROSC* **43**, 840–845 (1989).
102. van Munster, E. B. & Gadella, T. W. J. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). in *Microscopy Techniques: -/-* (ed. Rietdorf, J.) 143–175 (Springer, 2005). doi:10.1007/b102213.
103. Bastiaens, P. I. H. & Squire, A. Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends Cell Biol.* **9**, 48–52 (1999).
104. Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold, R. & Drummen, G. P. C. Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Mol. Basel Switz.* **17**, 4047–4132 (2012).
105. Hell, S. & Stelzer, E. H. K. Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope. *JOSA A* **9**, 2159–2166 (1992).
106. Hell, S. & Stelzer, E. H. K. Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Opt. Commun.* **93**, 277–282 (1992).
107. Hell, S. W. & Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **19**, 780–782 (1994).
108. Betzig, E. *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642–1645 (2006).
109. Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* **3**, 793–796 (2006).
110. Larkin, P. *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation.* (Elsevier, 2017).
111. Kalinowska, M. Spektroskopia Ramana. <https://slideplayer.pl/slide/10315271/>.
112. Downes, A. & Elfick, A. Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine. *Sensors* **10**, 1871–1889 (2010).

113. Kasha, M., Rawls, H. R. & Ashraf, E.-B. M. The exciton model in molecular spectroscopy. *Pure Appl. Chem.* **11**, 371–392 (1965).
114. Kasha, M. Energy Transfer Mechanisms and the Molecular Exciton Model for Molecular Aggregates. *Radiat. Res.* **20**, 55–70 (1963).
115. Kasha, M. Molecular Excitons in Small Aggregates. in *Spectroscopy of the Excited State* (eds. Di Bartolo, B., Pacheco, D. & Goldberg, V.) 337–363 (Springer US, 1976). doi:10.1007/978-1-4684-2793-6\_12.
116. Gruszecki, W. I., Gagos, M. & Kernen, P. Polyene antibiotic amphotericin B in monomolecular layers: spectrophotometric and scanning force microscopic analysis. *FEBS Lett.* **524**, 92–96 (2002).
117. Hargreaves, P. L., Nguyen, T.-S. & Ryan, R. O. Spectroscopic studies of amphotericin B solubilized in nanoscale bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1758**, 38–44 (2006).
118. Mota, M. C., Carvalho, P., Ramalho, J. & Leite, E. Spectrophotometric analysis of sodium fluorescein aqueous solutions. Determination of molar absorption coefficient. *Int. Ophthalmol.* **15**, 321–326 (1991).
119. Thermo Fisher Scientific. Extinction-coefficients. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0006-Extinction-coefficients.pdf>.
120. Wesołowska, O., Michalak, K., Maniewska, J. & Hendrich, A. B. Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. *Acta Biochim. Pol.* **56**, 33–39 (2009).
121. Tutaj, K. *et al.* Amphotericin B-silver hybrid nanoparticles: synthesis, properties and antifungal activity. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **12**, 1095–1103 (2016).
122. Manikam, V. R., Cheong, K. Y. & Razak, K. A. Chemical reduction methods for synthesizing Ag and Al nanoparticles and their respective nanoalloys. *Mater. Sci. Eng. B* **176**, 187–203 (2011).
123. Grela, E. *et al.* Mechanism of Binding of Antifungal Antibiotic Amphotericin B to Lipid Membranes: An Insight from Combined Single-Membrane Imaging, Microspectroscopy, and Molecular Dynamics. *Mol. Pharm.* **15**, 4202–4213 (2018).
124. Lemke, A., Kiderlen, A. F. & Kayser, O. Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 151–162 (2005).
125. Barwicz, J., Gruszecki, W. I. & Gruda, I. Spontaneous Organization of Amphotericin B in Aqueous Medium. *J. Colloid Interface Sci.* **158**, 71–76 (1993).
126. Grudzinski, W., Sagan, J., Welc, R., Luchowski, R. & Gruszecki, W. I. Molecular organization, localization and orientation of antifungal antibiotic amphotericin B in a single lipid bilayer. *Sci. Rep.* **6**, 32780 (2016).
127. Grela, E. *et al.* Imaging of human cells exposed to an antifungal antibiotic amphotericin B reveals the mechanisms associated with the drug toxicity and cell defence. *Sci. Rep.* **8**, 1–7 (2018).

128. Itraconazole and Amphotericin B To Treat Fungal Infections in Patients with Cancer Who Are Receiving Chemotherapy. *Ann. Intern. Med.* **135**, I–39 (2001).
129. Namee, N. M. & O’Driscoll, L. Extracellular vesicles and anti-cancer drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **1870**, 123–136 (2018).
130. Wu, A. *et al.* ABCA1 transporter reduces amphotericin B cytotoxicity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* (2019) doi:10.1007/s00018-019-03154-w.
131. Wang, N., Silver, D. L., Thiele, C. & Tall, A. R. ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) Functions as a Cholesterol Efflux Regulatory Protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 23742–23747 (2001).
132. Neufeld, E. B. *et al.* Cellular Localization and Trafficking of the Human ABCA1 Transporter. *J. Biol. Chem.* **276**, 27584–27590 (2001).
133. Yvan-Charvet, L., Wang, N. & Tall, A. R. The role of HDL, ABCA1 and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 139–143 (2010).
134. Qian, H. *et al.* Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1. *Cell* **169**, 1228–1239.e10 (2017).
135. Grela, E. *et al.* Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against *Candida albicans*. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
136. Lenardon, M. D., Munro, C. A. & Gow, N. A. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 416–423 (2010).
137. Gow, N. A. R., Veerdonk, F. L. van de, Brown, A. J. P. & Netea, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 112–122 (2012).
138. Banerjee, P., Pal, S., Kundu, N., Mondal, D. & Sarkar, N. A cell-penetrating peptide induces the self-reproduction of phospholipid vesicles: understanding the role of the bilayer rigidity. *Chem. Commun.* **54**, 11451–11454 (2018).
139. Borjihan, H., Ogita, A., Fujita, K., Hirasawa, E. & Tanaka, T. The vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B against the pathogenic fungus *Candida albicans* and its enhancement by allicin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **62**, 691–697 (2009).
140. Kang, C.-K. *et al.* Visualization analysis of the vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B against the parent strain and an ergosterol-less mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **159**, 939–947 (2013).
141. Yang, T.-S. *et al.* Quantifying membrane permeability of amphotericin B ion channels in single living cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1828**, 1794–1801 (2013).
142. Aigner, D. *et al.* Fluorescent materials for pH sensing and imaging based on novel 1,4-diketopyrrolo-[3,4- c ]pyrrole dyes. *J. Mater. Chem. C* **1**, 5685–5693 (2013).
143. Matsuoka, S. & Murata, M. Cholesterol markedly reduces ion permeability induced by membrane-bound amphotericin B. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1564**, 429–434 (2002).

144. Kobayashi, M. *et al.* Regulation mechanism of ABCA1 expression by statins in hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **662**, 9–14 (2011).
145. Naik Snehal U. *et al.* Pharmacological Activation of Liver X Receptors Promotes Reverse Cholesterol Transport In Vivo. *Circulation* **113**, 90–97 (2006).
146. Gelamo, E. L., Silva, C. H. T. P., Imasato, H. & Tabak, M. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1594**, 84–99 (2002).
147. Suryawanshi, V. D., Walekar, L. S., Gore, A. H., Anbhule, P. V. & Kolekar, G. B. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. *J. Pharm. Anal.* **6**, 56–63 (2016).
148. Aramwit, P., Yu, B. G., Lavasanifar, A., Samuel, J. & Kwon, G. S. The Effect of Serum Albumin on the Aggregation State and Toxicity of Amphotericin B. *J. Pharm. Sci.* **89**, 1589–1593 (2000).
149. Brezis, M., Heyman, S. & Sugar, A. Reduced Amphotericin Toxicity in an Albumin Vehicle. *J. Drug Target.* **1**, 185–189 (1993).
150. Wang, Y.-Q. *et al.* Spectroscopic studies on the interaction between silicotungstic acid and bovine serum albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**, 1869–1875 (2007).
151. Luchowski, R. *et al.* Molecular Fluorescence Enhancement on Fractal-Like Structures. *Appl. Spectrosc.* **64**, 578–583 (2010).
152. Sorensen, T. J. *et al.* Enhanced fluorescence emission of Me-ADOTA(+) by self-assembled silver nanoparticles on a gold film. *Chem. Phys. Lett.* **476**, 46–50 (2009).
153. Luchowski, R. *et al.* Single Molecule Immunoassay on Plasmonic Platforms. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **11**, 96–102 (2010).