

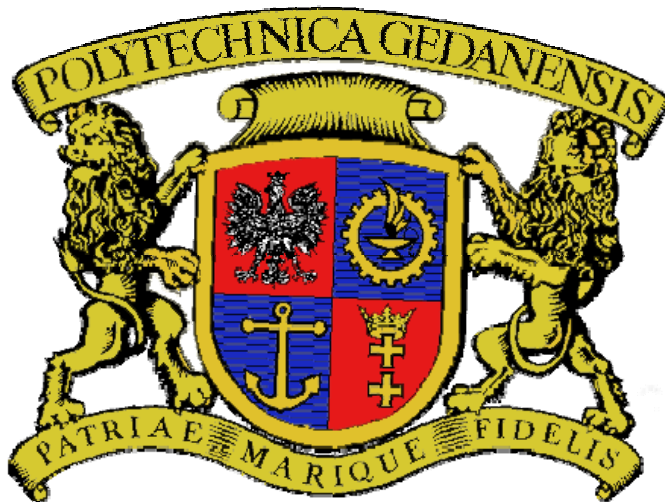
KATEDRA TECHNOLOGII LEKÓW I BIOCHEMII
POLITECHNIKI GDAŃSKIEJ

mgr inż. MAGDALENA ŚLISZ

**Pochodne amfoterycyny B z zawadą przestrzenną – nowa
grupa antymykotyków o niskiej toksyczności i aktywnych
względem szczepów grzybowych z opornością wielolekową.**

**Badanie natury i mechanizmów ich właściwości
fizykochemicznych i biologicznych.**

Rozprawa doktorska



Promotorzy:

prof. dr hab. inż. Jan Mazerski

prof. dr inż. Edward Borowski

GDAŃSK 2007

Spis treści

Streszczenie.....	4
Wykaz skrótów.....	6
1. Wstęp.....	8
2. Część teoretyczna.....	14
2.1. Mechanizm działania amfoterycyny B.....	14
2.2. Struktura kanału błonowego tworzonego przez AmB.....	18
2.3. Podstawy selektywnej toksyczności.....	21
2.4. Stan amfoterycyny B w roztworach wodnych.....	24
2.4.1. Agregaty amfoterycyny B.....	25
2.4.2. Agregacja a selektywna toksyczność.....	27
2.5. Pochodne AmB o obniżonej toksyczności.....	28
2.6. Oporność komórek grzybowych.....	33
2.6.1. Mechanizmy oporności grzybów na amfoterycynę B.....	34
2.6.2. Oporność wielolekowa komórek grzybowych.....	37
3. Cel i zakres pracy.....	45
4. Część eksperymentalna.....	48
4.1. Materiały.....	48
4.1.1. Antybiotyki.....	48
4.1.1.1. Oczyszczanie amfoterycyny B.....	49
4.1.1.1.2. Badane pochodne.....	51
4.1.2. Pożywki.....	51
4.1.3. Odczynniki.....	52
4.1.4. Badane komórki.....	52
4.2. Aktywność w stosunku do komórek grzybowych.....	53
4.2.1. Przechowywanie i namnażanie szczepów.....	53
4.2.2. Oznaczanie aktywności grzybostatycznej (MIC) i grzybobójczej (MFC).....	54
4.2.2.1. Metoda klasyczna.....	54
4.2.2.2. Aktywność grzybostatyczna (MIC) wg procedury zalecanej przez NCCLS....	55
4.2.3. Oznaczanie aktywności permeabilizacyjnej.....	55
4.2.3.1. Monitorowanie ruchu protonów (ΔpH).....	55
4.2.3.2. Wpływ potasu z komórek.....	56
4.2.3.3. Kinetyka wymiany H^+/K^+	56

4.2.4. Określanie powinowactwa do błon komórek grzybowych	57
4.2.4.1. Określanie stopnia wiązania z komórkami grzybów fluorescencyjną metodą transferu energii.....	57
4.2.4.2. Oznaczanie zdolności komórek grzybowych do tworzenia kolonii (c.f.u.)....	58
4.2.5. Określanie stabilności wiązania do błon komórek grzybów wielolekoopornych	58
4.2.6. Określanie wpływu AmB i wybranych pochodnych na komórki grzybów wielolekoopornych znakowanych rodaminą 6G.....	59
4.3. Oznaczanie aktywności w stosunku do krwinek czerwonych.....	60
4.3.1. Oznaczanie aktywności permeabilizacyjnej i hemolitycznej.....	60
4.4. Aktywność względem dużych pęcherzyków lipidowych (REV).....	60
4.4.1. Otrzymywanie dużych pęcherzyków lipidowych (REV)	60
4.4.2. Oznaczanie stężenia fosfolipidów.....	61
4.4.3. Oznaczanie aktywności permeabilizacyjnej względem dużych pęcherzyków lipidowych (REV) metodą fluorymetryczną.....	62
4.5. Spektrofotometryczne badanie stanu antybiotyku w roztworze.....	63
4.5.1. Zawartość form rozpuszczalnych.....	63
4.5.2. Identyfikacja liczby i typów form spektralnych.....	64
4.5.2.1. PCA.....	65
4.5.2.2. Spektroskopia pochodnych.....	66
4.5.2.3. Numeryczna dekompozycja widm.....	66
4.5.2.4. Model agregacji.....	68
4.5.3. Oddziaływanie z białkami surowicy ludzkiej	70
5. Wyniki i wnioski.....	70
5.1. Selektywna toksyczność AmB i badanych pochodnych.....	70
5.2. Aktywność w stosunku do standardowego szczepu <i>C. albicans</i> i mutantów ergosterolowych.....	73
5.2.1. Aktywność przeciwgrzybowa (MIC, MFC).....	73
5.2.2. Aktywność permeabilizacyjna.....	74
5.2.2.1. Ruch protonów (ΔpH) indukowany w komórkach grzybów.....	75
5.2.2.2. Wpływ jonów potasu.....	78
5.2.2.3. Kinetyka wymiany H^+/K^+	80
5.2.3. Oddziaływanie z błonami komórek grzybowych oznaczane fluorescencyjną metodą transferu energii.....	82
5.3. Aktywność w stosunku do standardowego szczepu <i>S. cerevisiae</i> i mutantów wielolekoopornych.....	87
5.3.1. Aktywność przeciwgrzybowa (MIC, MFC).....	87
5.3.2. Aktywność permeabilizacyjna.....	89

5.3.2.1. Ruch protonów (ΔpH) indukowany w komórkach grzybów.....	89
5.3.2.2. Wpływ jonów potasu.....	91
5.3.2.3. Kinetyka wymiany H^+/K^+	92
5.3.3. Oddziaływanie z błonami komórek drożdżowych oznaczane fluorescencyjną metodą transferu energii.....	93
5.3.4. Działanie na komórki grzybów wielolekoopornych <i>S. cerevisiae</i> znakowanych rodaminą R6G.....	101
5.4. Aktywność N-aminoacylowych pochodnych AmB z zawadą przestrzenną w stosunku do mutantów wielolekoopornych <i>C. albicans</i>.....	106
5.5. Aktywność permeabilizacyjna względem dużych pęcherzyków lipidowych.....	108
5.6. Stan antybiotyku w roztworze.....	116
5.6.1. Agregacja AmB w roztworach wodnych.....	116
5.6.1.1. Oczyszczanie amfoterycyny B.....	117
5.6.1.2. Właściwości spektroskopowe AmB w roztworach wodnych.....	120
5.6.1.3. Metoda sedymentacyjna.....	121
5.6.1.4. Numeryczna dekompozycja widm (MCR-ALS).....	128
5.6.1.4.1. Liczba form spektralnych	128
5.6.1.4.2. Charakterystyka form spektralnych – spektroskopia pochodnych.....	131
5.6.1.4.3. Zawartość form spektralnych – algorytm widm samouzgodnionych....	133
5.6.2. Agregacja pochodnych AmB.....	138
5.6.2.1. AMA.....	138
5.6.2.2. AMPA.....	140
5.6.2.3. Pochodne serii K.....	142
5.6.3. Wpływ modyfikacji chemicznych i składu roztworu wodnego na stałe agregacji badanych związków.....	150
5.6.4. Wpływ stanu roztworu na właściwości biologiczne (permeabilizacyjne).....	152
5.6.5. Wpływ surowicy krwi na stopień agregacji badanych związków.....	154
5.6.5.1. Albumina.....	154
5.6.5.2. Surowica.....	157
6. Dyskusja.....	160
7. Literatura.....	178

Streszczenie

Amfoterycyna B (AmB), polienowy antybiotyk makrolidowy, od blisko 50 lat pozostaje najważniejszym lekiem stosowanym w terapii grzybic układowych. Badania nad projektowaniem i syntezą pochodnych AmB prowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej zmierzają do otrzymania preparatu pozbawionego głównych wad tego cennego antybiotyku tj. toksyczności i słabej rozpuszczalności w wodzie. Istotnym osiągnięciem w tym zakresie było otrzymanie pochodnych z zawadą przestrzenną zlokalizowaną w „polarnej głowie” cząsteczki AmB. Związki te, w zależności od ich struktury, zachowują w różnym stopniu aktywność przeciwgrzybową wyjściowego antybiotyku, a równocześnie wykazują obniżoną toksyczność w stosunku do komórek zwierzęcych.

Badania prezentowane w ramach niniejszej rozprawy koncentrują się na poznaniu i wyjaśnieniu molekularnych mechanizmów leżących u podstaw poprawy selektywnej toksyczności tej grupy pochodnych AmB jak również ich aktywności względem opornych szczepów grzybowych. Pełne zrozumienie tychże zjawisk wymaga uwzględnienia zarówno właściwości fizykochemicznych badanych związków jak i ich oddziaływań w układach komórkowych oraz modelowych układach molekularnych.

Zakres przeprowadzonych badań obejmuje: **1)** ogólną charakterystykę selektywnej toksyczności wytypowanych związków; **2)** charakterystykę wrażliwości szczepów reprezentujących różne mechanizmy oporności tj. mutantów ergosterolowych *Candida albicans* posiadających defekt w szlaku biosyntezy ergosterolu (oporność specyficzna) oraz wielolekoopornych szczepów *Saccharomyces cerevisiae*, wyposażonych w błonowe pompy eksportujące z nadrodzin ABC i MFS (oporność MDR); **3)** analizę składu roztworów wodnych AmB i wybranych pochodnych pod względem stopnia agregacji cząsteczek (techniki chemometryczne: PCA, MCR-ALS); **4)** określenie wydajności kanałów błonowych indukowanych przez AmB i pochodne w pęcherzykach lipidowych zawierających odpowiednio ergo- lub cholesterol.

W oparciu o uzyskane wyniki stwierdzono, iż wszystkie testowane pochodne charakteryzuje w układach *in vitro* zredukowana w stosunku do antybiotyku macierzystego toksyczność, a jednocześnie związki te, podobnie jak AmB, hamują wzrost i działają grzybobójczo, co jest szczególnie istotne, również wobec opornych szczepów grzybowych.

Badania prowadzone nad działaniem AmB i pochodnych na mutanty ergosterolowe *C. albicans* wykazały, iż obecność i struktura sterolu w błonie komórek grzybowych nie są jedynymi czynnikami determinującymi powinowactwo do komórki, chociaż w istotny sposób wpływają na stopień jej wrażliwości. W przypadku mutantów *erg* (*erg-2*, *erg-16*) zaobserwowano obniżenie aktywności permeabilizacyjnej testowanych związków, badanej zarówno w oparciu o ruch protonów (H^+), wpływ jonów potasu (K^+), jak i kinetykę wymiany H^+/K^+ . Jednocześnie stosując odpowiednie sondy błonowe stwierdzono, iż ilość antybiotyku związanego z błoną wyznaczona dla AmB i pochodnych, przyjmuje zbliżone wartości w komórkach szczepu dzikiego (*C.a*) jak i mutantów niezdolnych do biosyntezy ergosterolu. Wyniki te wydają się sugerować, że obserwowane różnice w aktywności testowanych związków mogą być konsekwencją różnic w kompleksowaniu tychże związków z fosfolipidami błon zawierających sterole o zmodyfikowanej w stosunku do ergosterolu strukturze.

Nie stwierdzono zasadniczych różnic w mechanizmie działania AmB i pochodnych w stosunku do komórek *S. cerevisiae* wrażliwych i z wykształconą opornością wielolekową. Mutanty MDR zawierające pompy błonowe dwóch rodzajów: ABC (ADCD2) oraz MFS (ADCaMDR1) zachowują podobną wrażliwość jak szczep

wyjściowy (AD1234568), co potwierdzono w testach długiego (MIC, MFC) jak i krótkiego działania (ruch jonów H^+ , K^+). W oparciu o fluorescencyjną metodę transferu energii ustalono, że: i) AmB i pochodne wykazują podobne powinowactwo w stosunku do wszystkich badanych szczepów wielolekoopornych, niezależnie od typu posiadanych przez nie transporterów błonowych; ii) glukoza, jako źródło energii nie ma wpływu na przebieg wygaszania fluorescencji sondy TMA-DPH w komórkach szczepów MDR, zarówno znajdujących się w fazie stacjonarnej jak i metabolizujących. Dodatkowo, w eksperymentach z komórkami szczepów wielolekoopornych znakowanych rodaminą 6G nie stwierdzono kompetycji w transporcie barwnika zachodzącego za pośrednictwem transportera Cdr2p. Obserwacje te wydają się jednoznacznie wskazywać, że zachowanie aktywności AmB i pochodnych wobec szczepów MDR wynika z faktu, iż związki te nie są substratami błonowych pomp eksportujących, prawdopodobnie z uwagi na duże rozmiary cząsteczek.

Przebieg procesu agregacji oraz określenie stopnia agregacji badanych związków w roztworach wodnych o różnym składzie przeprowadzono w oparciu o spektroskopię absorpcyjną UV-VIS. Analiza otrzymanych zestawów widm została wykonana z zastosowaniem zaawansowanych technik chemometrycznych (PCA, MCR-ALS), co pozwoliło na identyfikację liczby i typów form spektralnych. Stwierdzono, iż w roztworach wodnych AmB i pochodnych współistnieją co najmniej 4 formy spektralne: monomer (M) oraz 3 typy agregatów (X, Y, A) o różnym stopniu zagregowania i różnej rozpuszczalności. Widma poszczególnych form spektralnych nie zależą od składu roztworu (różne bufony, różna siła jonowa). Niemniej jednak skład środowiska wodnego (różne bufony, różna siła jonowa), podobnie jak typ pochodnej, decyduje o stężeniu antybiotyku, przy którym poszczególne formy spektralne występują w przewodzie.

Nie zaobserwowano jednakże występowania wyraźnych relacji pomiędzy strukturą roztworu a efektem biologicznym działania badanych pochodnych AmB. W środowiskach wodnych proporcje poszczególnych form spektralnych, oszacowane w oparciu o skonstruowany model agregacji, zmieniają się drastycznie w zależności od obecności różnych soli.

Wyniki badań nad wpływem białek surowicy ludzkiej na proces agregacji AmB i pochodnych wydają się sugerować, że nie tyle sam stopień agregacji, co raczej organizacja formowanych agregatów jest czynnikiem o istotnym znaczeniu dla zjawiska selektywnej toksyczności.

Wykonany metodą fluorymetryczną pomiar aktywności permeabilizacyjnej AmB i wybranych pochodnych względem pęcherzyków ergo- i cholesterolowych wskazuje na możliwość istnienia różnych mechanizmów zwiększania przepuszczalności błony w zależności od jej składu sterolowego oraz struktury związku. Pochodne o najwyższej selektywności - MFAME oraz PAMB nie są zdolne do indukowania funkcjonalnych kanałów w pęcherzykach zawierających cholesterol, podczas gdy kanały takie powstają bez przeszkód w pęcherzykach zawierających ergosterol. Ich działanie permeabilizacyjne w odróżnieniu od pozostałych testowanych związków jest obserwowalne jednakże dopiero w bardzo wysokich stężeniach sugerując, że w tym przypadku chodzi o niespecyficzne działanie detergentowe.

Wyniki przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy badań pozwalają na postulowanie, iż prawdopodobnie poprawa selektywnej toksyczności pochodnych AmB z zawadą przestrzenną jest w głównej mierze efektem różnic w zdolności do formowania kanałów niezależnej od zdolności kompleksowania się ze sterolami w komórkach zawierających w błonach odpowiednio ergo- i cholesterol. Niemniej jednak pełne wyjaśnienie natury selektywnego działania tego typu związków wymaga

kontynuacji szeroko zakrojonych badań zarówno eksperymentalnych jak i teoretycznych obejmujących metody modelowania molekularnego.

Wykaz skrótów

AAG	- ang. human α_1 - acid glycoprotein; ludzka kwaśna α_1 - glikoproteina
ABC	- ang. <i>ATP-Binding Cassette</i>
AIDS	- ang. <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> ; zespół nabytego braku odporności
AM3	- ang. <i>Antibiotic Medium 3</i> ; pożywka
AMA	- amid 3-dimetyloaminopropylowy amfoterycyny B
AmB	- amfoterycyna B
AMPA	- amid 4-metylopiiperazynowy amfoterycyny B
ATCC	- ang. <i>American Type Culture Collection</i>
CD	- spektroskopia dichroizmu kołowego
c.f.u.	- ang. <i>colony forming units</i> ; zdolność komórek do tworzenia kolonii
DMSO	- dimetylosulfotlenek
DPH	- 1,6-difenyloheksa-1,3,5-trien
DS	- ang. <i>Derivative Spectroscopy</i> ; spektrofotometria pochodnych
EH₅₀	- stężenie związku indukujące 50% wypływu hemoglobiny z krwinek czerwonych
EK₅₀	- stężenie związku indukujące 50% wypływu potasu z krwinek czerwonych
EPC	- fosfatydylocholina izolowana z żółtka jaja kurzego
FCCP	- karbonylocyjanido <i>p</i> -(trifluorometoksy)fenylohydrazon
HSA	- ang. <i>human serum albumin</i> ; albumina surowicy ludzkiej
K₆	- <i>N-O-t</i> -butylotyrozylo amfoterycyna B
K₉	- <i>N-O^β</i> - <i>t</i> -butyloaspartylo amfoterycyna B
K₁₀	- <i>N-O^γ</i> - <i>t</i> -butyloglutamylo amfoterycyna B
K₁₆	- <i>N-O-t</i> -butyloserylo amfoterycyna B
K₁₇	- <i>N-O-t</i> -butylotreonylo amfoterycyna B
K₁₉	- D-prolilo amfoterycyna B
K₂₀	- 4-hydroksy-prolilo amfoterycyna B
K₂₁	- D-tryptofanylo amfoterycyna B
K₂₄	- <i>N-O^β</i> - benzyloaspartylo amfoterycyna B
K₃₄	- <i>N-O-t</i> -butylo-D-treonylo amfoterycyna B
K₃₅	- <i>N-O-t</i> -butylo-D-tyrozylo amfoterycyna B
LUV	- ang. <i>large unilamellar vesicles</i> ; duże jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe
MCR-ALS	- ang. <i>Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares</i>
MDR	- ang. <i>Multidrug Resistance</i> ; wielolekooporność
MFAME	- ester metylowy <i>N</i> -metylo- <i>N</i> -D-fruktopyranozylo amfoterycyny B
MSD	- ang. <i>Membrane Spanning Domains</i>
MFC	- ang. <i>Minimal Fungicidal Concentration</i> ; minimalne stężenie związku wywołujące efekt bójczy
MFS	- ang. <i>Major Facilitator Superfamily</i>
MIC	- ang. <i>Minimal Inhibitory Concentration</i> ; minimalne stężenie związku powodujące zahamowanie wzrostu drobnoustrojów
MMC	- ang. <i>Maximal Monomer Concentration</i>
NSD	- ang. <i>Numerical Spectrum Decomposition</i> ; numeryczna dekompozycja widm
OD	- ang. <i>Optical Density</i> ; gęstość optyczna
³¹P-NMR	- spektroskopia fosforowego magnetycznego rezonansu jądrowego

PAMB	- <i>N</i> -1-piperydynopropionilo amfoterycyna B
PBS	- bufor o składzie: 155 mM NaCl, 7mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PCA	- ang. <i>Principle Component Analysis</i> ; metoda głównych składowych
PAME	- ester metylowy 1-piperydopropionilo amfoterycyny B
REV	- duże jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe otrzymywane metodą faz odwróconych (ang. <i>reverse phase evaporation</i>)
R6G	- rodamina 6G
TRIS	- 2-amino-2 -(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol; bufor o pH 6,8
SAME	- ester metylowy <i>N</i> -(<i>N</i> '-3-dimetyloaminopropyl)sukcynimido amfoterycyny B
SLN	- ang. <i>solid lipid nanoparticle</i>
t₅₀	- czas wypływu 50% potasu wewnątrzkomórkowego z komórek grzybowych traktowanych antybiotykiem o stężeniu 10 μM
t₃₀	- czas wypływu 30% potasu wewnątrzkomórkowego z komórek grzybowych traktowanych antybiotykiem o stężeniu 10 μM
TMA-DPH	- p-toulenosulfonian 1-[4 -trimetylo aminofenylo)] – 6-fenylohexa-1,3,5- trienu
TMD	- ang. <i>Transmembrane Domain</i>
TMS	- ang. <i>Transmembrane Segments</i>
YNBG	- ang. <i>Yeast Nitrogen Base/Glucose</i> ; pożywka
UV	- promieniowanie w zakresie ultrafioletu
VIS	- promieniowanie w zakresie widzialnym

1. Wstęp

Układowe infekcje grzybowe stanowią poważne wyzwanie dla współczesnej chemoterapii zwłaszcza w obliczu notowanego stałego wzrostu częstości występowania tego typu schorzeń w odpowiedzi na immunosupresję obserwowaną u pacjentów po transplantacji organów, szpiku kostnego, cierpiących na choroby nowotworowe lub AIDS, jak również w konsekwencji masowego stosowania antybiotyków przeciwbakteryjnych o szerokim spektrum działania, prowadzącego do zachwiania równowagi biocenotycznej u pacjentów [1]. W praktyce klinicznej dominujące są infekcje wywołane przez gatunki z rodzajów *Candida* i *Aspergillus*, niemniej jednak niepokojącym zjawiskiem jest uaktywnienie się jako patogenów rzadko spotykanych oportunistycznych grzybów takich jak: *Trichosporon beigelii*, szczepy *Fusarium*, *Pseudallescheria boydii* oraz pleśni klasy *Zygomycetes*. Podobną tendencję obserwuje się dla gatunków egzystujących w rejonach endemicznych np. *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffei*, czy *Coccidioides immitis*, które wykazują duży potencjał patogenny i zdolność do wywoływania różnorodnych infekcji w zakresie od grzybic powierzchniowych po grzybicę układową [2,3].

Skuteczną terapię układowych infekcji grzybowych utrudniają dwa główne problemy:

- 1) niska selektywność działania leków przeciwgrzybiczych, uwarunkowana bliskim podobieństwem na poziomie molekularnym eukariotycznych komórek patogenów grzybowych i komórek ssaków
- 2) występowanie oporności szczepów grzybowych, w tym przede wszystkim oporności wielolekowej (MDR, ang. *Multidrug Resistance*), związanej z nadekspresją w opornych szczepach grzybowych eksportujących ksenobiotyki pomp błonowych o szerokim spektrum substratowym, obejmującym większość dostępnych leków przeciwgrzybowych.

Zestawienie najważniejszych leków przeciwgrzybowych mających obecnie zastosowanie w praktyce klinicznej jak również wybranych preparatów znajdujących się na różnych etapach badań przedklinicznych i klinicznych przedstawiono w Tab. 1. Żaden z wymienionych związków nie spełnia jednak wszystkich wymagań

optymalnego chemoterapeutyku przeciwgrzybowego obejmujących następujące elementy: wysoka aktywność, szerokie spektrum działania, efekt grzybobójczy (nie grzybostatyczny), brak indukowania oporności specyficznej, aktywność względem szczepów z opornością wielolekową, niska toksyczność [4].

Tabela 1. Zestawienie najważniejszych leków stosowanych obecnie w terapii zakażeń grzybiczych oraz nowych preparatów znajdujących się w fazie badań [5-14].

Związek	Mechanizm działania	Mechanizm oporności	Spektrum/Toksyczność
Makrolidy polienowe			
Amfoterycyna B (Fungizon)	Wnikanie do błony cytoplazmatycznej, oddziaływanie z ergosterolem, wzrost permeabilizacji dla kationów jedno- i dwuwartościowych, śmierć komórki	- Zmiany w składzie lipidów błonowych, głównie ergosterolu - Wzrost aktywności katalaz	Pierwotna oporność obserwowana u <i>Psudallesheria boydii</i> , <i>Scedosporium</i> spp., <i>Aspergillus terrerus</i> , <i>A. flavus</i> ; oporność pierwotna i wtórna notowana dla rzadkich drożdży (<i>Trichosporon beigelli</i> , <i>Candida lusitanea</i> , <i>C. guilliermondii</i>); nefrotoksyczność, anemia hemolityczna, uszkodzenie centralnego systemu nerwowego, kardiotoxyczność
Lipidowe kompleksy AmB (Ambisome, Abelect, Amphotec)	Podobny do AmB	Brak doniesień	Spektrum podobne do AMB (Fungizon), zmniejszona toksyczność
Liposomalna nystatyna (Nyotran)	Podobny do AmB	Brak doniesień	Spektrum podobne do lipidowych formułacji AmB
Fluoropirymidyny			
Flucytozyna (Ancobon)	Selektywna konwersja do toksycznego intermediatu (5 - FU), Interferencja z syntezą DNA/RNA	- Defekt permeazy cytozyny - Niedobór lub brak enzymów zaangażowanych w metabolizm 5-FC - Deregulacja szlaku biosyntezy pirymidyn	Wąskie spektrum przeciwgrzybowe; pierwotna oporność u pleśni (<i>Aspergillus</i> spp.); gwałtowny rozwój oporności wtórnej u <i>Candida</i> i <i>Cryptococcus</i> spp. w przypadku monoterapii 5-FC; toksyczność (anemia, lekopenia, trombocytopenia)
Azole			
Ketokonazol (Nizoral) Flukonazol (Diflukan)	Selektywna inhibicja zależnej od cytochromu P-450 14- α -demetylazy lanosterolu; zmiany w strukturze i funkcjonowaniu błony cytoplazmatycznej	- Upośledzenie akumulacji związków w wyniku wyrzutu poza komórkę za pośrednictwem pomp wielolekowych (ABC, MFS) - Mutacje genu kodującego 14-α-demetylazę lanosterolu (<i>ERG11</i>) prowadzące do zmian w powinowactwie związków do enzymu - Nadprodukcja ERG11p - Zmiany w szlaku biosyntezy ergosterolu	Aktywność statyczna dla drożdży, grzybów dimorficznych, dermatofitów; toksyczność (ginekomastia, hepatotoksyczność)
Itrakonazol (Soranox) Voriconazol Posakonazol* Ravukonazol*			Szerokie spektrum łącznie z <i>Apergillus</i> spp. oraz opornymi na flucytozynę gatunkami <i>Candida</i>
Alliloaminy			
Terbinafina (Lamisil)	Inhibicja epoksydazy skwalenowej	Nadekspresja pomp wielolekowych (<i>CDR1</i>, <i>CDR2</i>, <i>CaMDR1</i>)	Aktywność ograniczona do dermatofitów; zastosowanie w terapii grzybic powierzchniowych
Morfoliny			
Amorolfina	Inhibicja Δ^{14} reduktazy oraz Δ^{7-8} izomerazy sterolowej	- Nadekspresja genów kodujących Δ^{14} reduktazę (<i>ERG24</i>) lub C24 (28) reduktazę (<i>ERG4</i>) - Nadekspresja pomp wielolekowych (<i>CDR1</i>, <i>CDR2</i>)	Działanie fungistatyczne i grzybobójcze wobec dermatofitów i drożdżaków
Echinokandyny			

Kapsofungina (Cancidas) Mikafungina (FK463)* V-echinokandyna *	Inhibicja syntazy β -1, 3- glukanu ściany komórkowej grzybów; wzrost wrażliwości na lizę osmotyczną	Mutacje genu kodującego syntazę β-1,3 glukanu prowadzące do zmian w powinowactwie enzymu	Szerokie spektrum za wyjątkiem <i>Cryptococcus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Sporothrix</i> , <i>Trichosporon</i> spp.
Różne			
Nikkomyцина Z*	Inhibicja syntazy chityny	Zmiana spektrum substratowego bądź zanik permeaz oligopeptydowych	Ograniczone działanie wobec <i>Candida</i> spp., zwiększona aktywność w stosunku do grzybów o dużej zawartości chityny w ścianie komórkowej takich jak np. <i>Coccidioides immitis</i> czy <i>Blastomyces dermatidis</i>
FMDP-peptydy*	Inhibicja syntazy glukozamino -6-fosforanu	Zanik permeaz oligopeptydowych	Wysoka aktywność przeciwgrzybowa i przeciwbakteryjna wobec szerokiego spektrum drobnoustrojowego; niekorzystne parametry farmakokinetyczne, niestabilność w surowicy krwi
Pradymicyny* (BMS 181184)	Tworzenie kompleksów z mannoproteinami	Brak doniesień	Działanie fungicydne wobec dermatofitów i grzybów filamentujących; oporność obserwowana w przypadku <i>Fusarium</i> spp; toksyczność (hapatotoksyczność, indukowanie apoptozy)
Sordaryny*	Inhibicja czynnika elongacyjnego EFT2	Brak doniesień	Wysoka aktywność w stosunku do patogennych grzybów, łącznie z <i>Candida</i> spp., <i>C. neoformans</i> , <i>P. carinii</i> , oraz niektórych grzybów filamentujących (<i>Aspergillus falvus</i> , <i>A. fumigatus</i>)
Kationowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe* (Histatyna)	Indukowanie zmian w strukturze błony plazmatycznej (w przypadku histatyn - zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondrium)	Utrata funkcji mitochondrialnych	Działanie fungicydne w stosunku do <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i> , obniżona aktywność wobec <i>C. glabrata</i>

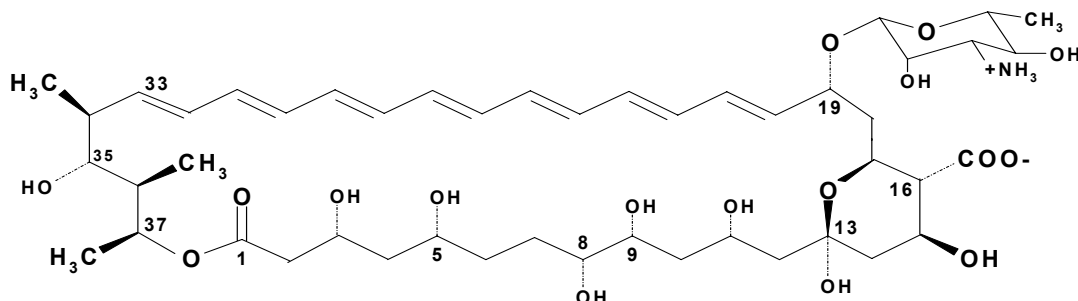
*w fazie badań

Brak chemoterapeutyku przeciwgrzybowego o pożądanym cechach skłania do intensywnych poszukiwań nowych, ulepszonych preparatów o działaniu przeciwgrzybiczym. Poszukiwania te prowadzone są w oparciu o różnorodne strategie, które zasadniczo koncentrują się na:

- poszukiwaniu nowych celów molekularnych dla chemoterapeutyków przeciwgrzybowych i projektowaniu związków wykorzystujących te cele
- poprawie właściwości związków znanych na drodze racjonalnych modyfikacji ich struktury
- opracowaniu nowych form leku.

Od ponad 40 lat jedynym lekiem łączącym w sobie większość cech dobrego antybiotyku przeciwgrzybowego pozostaje amfoterycyna B (AmB) (Rys. 1), stosowana jako lek z wyboru w leczeniu grzybic układowych i rozsianych, jak również w terapii niektórych zakażeń pierwotniakowych (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*) [15,16], chorób prionowych [17] oraz infekcji wywołanych przez *Plasmodium falciparum* [18]. Niemniej jednak mimo licznych zalet związek ten jest jednym z najbardziej toksycznych chemoterapeutyków, wywołującym wiele poważnych efektów ubocznych (Tab.1). Ponadto zastosowanie kliniczne AmB w znacznym stopniu limituje

również jej słaba rozpuszczalność w wodzie, utrudniająca podawanie leku [19]. Do niedawna jedyną dostępną komercyjnie formą AmB był Fungizon, buforowany kompleks antybiotyku z detergentem, deoksycholem sodu. Ten anionowy surfaktant tworzy micelną zawiesinę antybiotyku, która może być podawana dożylnie [19,20].



Rys. 1. Struktura chemiczna amfoterycyny B.

Wprowadzenie do leczenia lipozomalnej AmB (Ambisome, Ampholiposome) oraz jej kompleksów z fosfolipidami (Abelect, ABLC) i siarczanem cholesterolu (Amphocil/Amphotec, ABCD) pozwoliło na znaczną redukcję toksyczności, przy jednoczesnym zachowaniu skuteczności działania porównywalnej do Fungizonu [21-25]. Za najbardziej prawdopodobną przyczynę poprawy indeksu terapeutycznego tych preparatów uważa się monomeryzację antybiotyku. Przypuszcza się, że preparaty lipidowe działają jako rezerwuary wolnej, monomerycznej AmB, która uznawana jest za aktywną i nietoksyczną formę antybiotyku, natomiast obecność detergentu zapobiega procesowi agregacji [26]. Niestety, nowe formy AmB w znacznym stopniu zmieniają właściwości farmakokinetyczne wyjściowego antybiotyku, a konsekwencje fizjologiczne tych zmian nie zostały jak dotąd do końca wyjaśnione. Ponadto wysoki koszt terapii ogranicza powszechne stosowanie tych preparatów [27].

Poszukiwania optymalnej formy leku ciągle trwają. Niezwykle obiecująca wydaje się, zaproponowana ostatnio, możliwość zastosowania nanocząstek jako nowego nośnika AmB. W strukturach tego typu antybiotyk jest inkorporowany do lipidowych nanosfer bądź rozpuszczany w matriks lipidowej, a następnie uwalniany na drodze dyfuzji i erozji cząstek. W badaniach na myszach potwierdzono efektywność działania kilku eksperymentalnych form antybiotyku opracowanych zgodnie z tą koncepcją m.in. NS-718 (Nippon Shinyaku Co., Japan) [28,29] oraz SLN (ang. *solid lipid nanoparticle*) [30,31]. Zaletą nanocząstek w porównaniu do form lipozomalnych jest przede wszystkim niski koszt produkcji oraz zdecydowanie większa stabilność. Wśród innych eksperymentalnych formułacji AmB szereg korzystnych właściwości,

łącznie z odpornością na degradację w przewodzie pokarmowym, stwierdzono w przypadku CAMB (Cochelates), zawierających antybiotyki zamknięte w wielocylinicznych micellach formowanych spontanicznie w obecności jonów wapnia w zawieszynie fosfatydyloseryny [32,33,34]. Znane są również konjugaty AmB z biodegradowalnymi rozpuszczalnymi w wodzie polimerami jak np. arabinogalaktanem, które jak się przypuszcza na podstawie wstępnych badań, mogą w korzystny sposób modulować farmakokinetykę leku [35,36,37].

Alternatywną drogą poprawy indeksu terapeutycznego AmB są chemiczne modyfikacje jej struktury. Strategia ta stosowana jest od wielu lat w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej w grupie badawczej kierowanej przez prof. E. Borowskiego, gdzie prowadzi się badania nad projektowaniem i syntezą pochodnych AmB, zmierzające do otrzymania preparatu pozbawionego głównych wad tego cennego antybiotyku tj. toksyczności i słabej rozpuszczalności [4]. Osiągnięto już zdecydowany postęp w poprawie rozpuszczalności pochodnych AmB [38] i pierwsze wyniki wskazujące na możliwość uzyskania na drodze modyfikacji chemicznych pochodnych o radykalnie obniżonej toksyczności [4,39,40]. Według najbardziej prawdopodobnej hipotezy, sformułowanej przez E. Borowskiego, czynnikiem struktury pochodnych AmB odpowiedzialnym za istotną poprawę selektywnej toksyczności jest duży objętościowy podstawnik w obrębie „głowy polarnej” cząsteczki antybiotyku, zdolny do indukowania efektu zawady sterycznej [4,41-44]. Przypuszcza się, iż mechanizm wysokiej selektywności zawadzonych przestrzennie pochodnych polega na braku lub ograniczonej zdolności tego typu związków do agregowania się z występującym w komórkach zwierzęcych cholesterolem w letalny (permeabilizujący) kanał, pomimo zachowanego powinowactwa do tego sterolu i zdolności do tworzenia kompleksu pierwotnego. Zjawisko to nie występuje w przypadku komórek grzybowych, gdzie kompleksy antybiotyk-ergosterol formują efektywnie działające kanały bez przeszkód. Proponowana koncepcja mechanizmu selektywnej toksyczności tej cennej pod względem właściwości grupy pochodnych AmB wymaga weryfikacji oraz dalszych dogłębnych badań, przede wszystkim obejmujących większą liczbę pochodnych AmB o zwiększonej selektywnej toksyczności. Ponadto z punktu widzenia możliwości zastosowania niskotoksycznych pochodnych AmB w terapii niezbędnym elementem, który należy uwzględnić w prowadzonych badaniach jest aktywność tych związków wobec opornych szczepów grzybowych, zarówno tych o oporności specyficznej

(mutanty sterolowe) jak i wielolekoopornych (MDR). Zwłaszcza ten drugi aspekt dotyczący problemu oporności wielolekowej ma obecnie niezwykle istotne znaczenie. AmB zachowuje bowiem unikalną wśród związków przeciwgrzybowych aktywność wobec szczepów MDR [45], niemniej jednak mechanizm tego zjawiska nie został jak dotąd wyjaśniony. Niewiele jest również danych o aktywności pochodnych AmB względem szczepów MDR. Pochodna N-alkilowa, MFAME [46] wykazuje taką aktywność, jednakże mechanizm tego zjawiska również nie jest znany. Liczna, otrzymana ostatnio, nowa grupa zawadzonych przestrzennie N-aminoacylowych pochodnych AmB, modulująca korzystnie selektywną toksyczność [40] może dostarczyć szerszych informacji na temat wpływu modyfikacji chemicznych AmB na zachowanie aktywności związków względem szczepów MDR.

Racjonalne poszukiwanie pochodnych AmB o pożądanym cechach farmakologicznych i fizykochemicznych wymaga zatem wyjaśnienia szeregu problemów dotyczących mechanizmu właściwości tej klasy związków na poziomie molekularnym. Niniejsza praca doktorska stanowi próbę znalezienia odpowiedzi na niektóre z tych problemów.

2. Część teoretyczna

2.1. Mechanizm działania amfoterycyny B

Wrażliwość komórek na AmB i większości innych makrolidów polienowych jest uwarunkowana występowaniem w ich błonie komórkowej steroli: głównie ergosterolu (grzyby) lub cholesterolu (komórki zwierzęce). Istnieje wiele dowodów eksperymentalnych potwierdzających słuszność hipotezy sterolowej działania AmB. Wykazano m.in, że:

- spektrum antybiotyczne AmB obejmuje jedynie drobnoustroje eukariotyczne, głównie te zawierające ergosterol [47]
- występowanie oporności na polieny jest wynikiem obniżenia zawartości sterolu w komórkach lub zmian w jego strukturze [48,49]
- wrażliwość komórek zwierzęcych na AmB jest spowodowana obecnością cholesterolu [19,50].

Efekty indukowane przez AmB w komórkach grzybowych jak i zwierzęcych mają charakter pleiotropowy i zależą od wielu różnych czynników, takich jak: stężenie antybiotyku, sposób dawkowania, skład podłoża oraz inne warunki eksperymentalne. Jak wykazano, w zakresie niskich stężeń antybiotyków działa wobec komórek patogennych statycznie hamując ich wzrost, podczas gdy w wyższych stężeniach wywołuje efekt bólczy prowadząc do śmierci [50]. Zaobserwowano, że wzbogacenie podłoża wzrostowego kationami np. Mg^{+2} i K^{+} ochrania w specyficzny sposób komórki grzybowe przed działaniem AmB [51]. W określonych warunkach może dochodzić nawet do odwracania i reperacji uszkodzeń wywołanych przez antybiotyk zarówno w komórkach grzybowych jak i zwierzęcych [52-54]. Z kolei w komórkach traktowanych AmB w dawkach subpermeabilizujących stwierdza się zdolność antybiotyku do stymulacji niektórych funkcji komórkowych. W komórkach *C. albicans* wzrost zdolności do tworzenia kolonii [55] indukowany przez AmB, przypisano wiązaniu antybiotyku z kwasami tłuszczowymi ściany komórkowej. Wnioskowanie to zostało poparte wynikami badań nad mikonazolem, w przypadku którego to związku

zaobserwowano bardzo podobny efekt. Stymulacyjną aktywność AmB potwierdzono również dla komórek zwierzęcych, w tym komórek systemu immunologicznego. Antybiotyk przejawia zdolność nie tylko do indukcji dla tego typu komórek wzrostu kolonii, ale również stymuluje syntezę DNA, RNA i białek [56].

Mimo intensywnych badań, dokładny mechanizm działania AmB nie został jak dotąd do końca wyjaśniony. Przyjmuje się powszechnie, że działanie AmB opiera się na indukowaniu zmian w strukturze i przepuszczalności błony plazmatycznej. Dotyczy to zarówno komórek grzybowych jak i zwierzęcych. Antybiotyk wnika do błony, tworzy kompleksy z występującymi w błonie sterolami, kompleksy te następnie asocjują w przebijające błonę kanały. Struktura tych kanałów jest ciągle hipotetyczna, a ich jonoselektywność nie została w pełni ustalona. Pierwszym przejawem uszkodzenia błony jest zwiększenie jej przepuszczalności dla jonów jedno- i dwuwartościowych oraz małych cząstek polarnych [50,57]. Prowadzi to do zaburzenia homeostazy komórkowej, zaniku gradientów jonów i wynikającego z nich potencjału błonowego. Z rozładowaniem gradientów jonowych wiąże się przede wszystkim działanie grzybobójcze. Natomiast działanie grzybobójcze AmB nie zawsze można wyjaśnić zwiększeniem przepuszczalności błony i właściwościami jonoforowymi antybiotyku. Udział selektywności uszkodzenia błony w efekcie grzybobójczym i toksycznym (komórki zwierzęce) nie jest do końca wyjaśniony. Jako mechanizm odpowiedzialny za toksyczność zaproponowano również peroksydację lipidów wywołaną przez silnie reaktywne rodniki tlenowe generowane w wyniku autooksydacji znajdującego się w błonie polieny [50,58]. Ponadto stwierdzono bezpośredni wpływ AmB na jonowe pompy błonowe: ATPazę protonową w komórkach grzybów [59] oraz ATPazę sodowo-potasową w komórkach zwierzęcych [60]. Konsekwencją inhibicji tych pomp błonowych jest zanik gradientu jonów dostarczających energii do aktywnego transportu metabolitów. Elementy mechanizmu działania przeciugrzybowego i toksycznego AmB przedstawiono na Rys. 2.

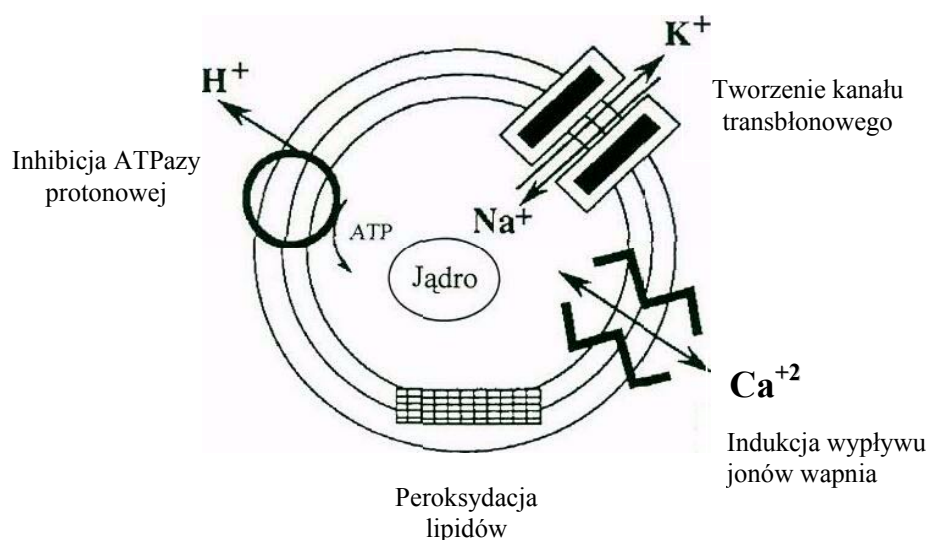
Przez długi czas uważano, że błona komórkowa jest jedynym miejscem działania AmB. Wnioskowanie to opierano na fakcie, iż sterol w komórkach eukariotycznych jest zlokalizowany głównie w błonie komórkowej i jego zawartość w wewnątrzkomórkowych strukturach błonowych jest bardzo niska. Okazało się jednak, że antybiotyk wykazuje zdolność do przenikania do wnętrza komórki i internalizacji. W licznych badaniach prowadzonych na komórkach zwierzęcych stwierdzono możliwość wchłaniania antybiotyku do komórki na drodze fagocytozy w przypadku makrofagów

[61] i endocytozy dla komórek jajnika chomika chińskiego (CHO, ang. *Chinese Hamster Ovary*) [62]. Niewiadomym jest jednak jak dotąd, czy w komórkach grzybowych endocytoza antybiotyku również ma miejsce. Warto w tym miejscu dodać, iż istotną rolę w procesie wchłaniania AmB przez komórki zwierzęce przypisuje się lipoproteinom o niskiej gęstości (LDL) oraz receptorom LDL [63,64]. W konsekwencji wiązania się AmB z LDL dochodzi prawdopodobnie do blokowania fuzji pomiędzy endosomami a lizosomami, co może być źródłem niepożądanych efektów toksycznych wywoływanych przez antybiotyk. Wydają się to potwierdzać wyniki badań eksperymentalnych. Stwierdzono między innymi, że: i) toksyczność AmB związanej z LDL jest wyższa aniżeli ta obserwowana dla antybiotyku w wolnej formie (badania na szczurach) [65]; ii) inhibicja oddziaływań AmB-lipoproteiny koreluje z obniżeniem toksyczności AmB zastosowanej w formie kompleksów z surfaktantami (badania na myszach) [26]; iii) toksyczność AmB wobec komórek nerkowych linii LLC PK1 jest zredukowana w przypadku, gdy komórki pozbawione są zdolności do ekspresji receptorów LDL [66]. Ponadto sugeruje się, że wysoka toksyczność AmB może być związana ze zdolnością do modyfikowania struktury LDL w wyniku zmian oksydacyjnych wywołanych przez antybiotyk [67]. Zwraca się również uwagę na istotne znaczenie dla toksyczności AmB oddziaływań antybiotyku nie tylko z lipoproteinami, ale także z innymi białkami surowicy krwi, przede wszystkim albuminą [63]. Przypuszcza się, że HSA (HSA, ang. *human serum albumin*) może modulować farmokinetykę AmB poprzez wpływ na stan agregacji antybiotyku. Albumina prawdopodobnie jest „nośnikiem” zdeagregowanej i nietoksycznej w stosunku do komórek zwierzęcych formy antybiotyku [68-70]. Jednocześnie w badaniach z wykorzystaniem sztucznych błon lipidowych, stwierdzono, iż AmB związana z albuminą ciągle zachowuje wysoką aktywność względem błon zawierających ergosterol, co sugeruje bezpośredni transfer antybiotyku z białka do błony [71].

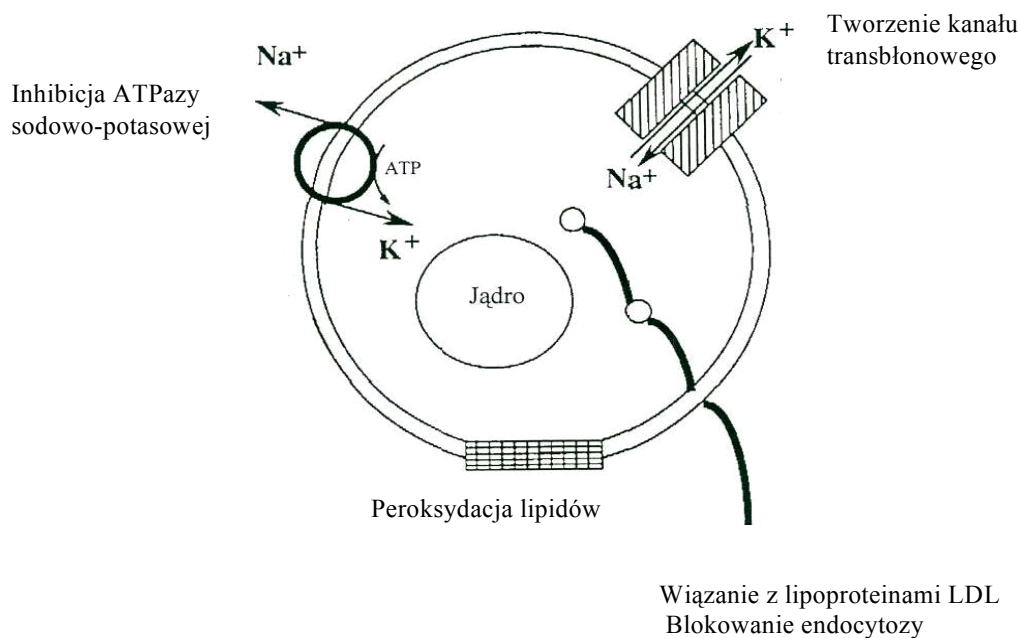
Z uwagi na wielokierunkowość przedstawionych powyżej efektów działania AmB nie udało się jak dotąd wyjaśnić ostatecznie mechanizmu aktywności antybiotyku w stosunku do komórek grzybowych i zwierzęcych. Nie udało się również uzyskać jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o właściwą przyczynę selektywnej toksyczności antybiotyku. Intensywne poszukiwania rozwiązania tego zagadnienia doprowadziły do sformułowania szeregu różnych koncepcji. Najważniejsze z nich, wśród których wymienia się: i) ilościowe i jakościowe różnice w oddziaływaniu związku z

ergosterolem i cholesterolem; ii) stabilność i charakterystyka kanału tworzonego w błonach zawierających odpowiednio ergo- i cholesterol; iii) struktura roztworów wodnych antybiotyku, zostaną zaprezentowane w kolejnych rozdziałach niniejszej rozprawy. Omówione hipotezy zostaną rozszerzone o nowe koncepcje selektywności zaproponowane dla niskotoksycznych pochodnych AmB.

a)



b)



Rys. 2. Elementy mechanizmu działania AmB na komórki grzybowe **(a)** i zwierzęce **(b)** [19].

2.2. Struktura kanału błonowego tworzonego przez AmB

Brak jest bezpośrednich danych doświadczalnych dotyczących struktury kanału błonowego tworzonego przez AmB. Pozostaje więc ona ciągle w sferze hipotez i przypuszczeń. Zaproponowano trzy modele powstawania takiego kanału odpowiadające różnym mechanizmom zaburzenia struktury błony:

- cząsteczka związku wiąże się ze steroidem tworząc kompleks pierwotny, a następnie kilka cząsteczek kompleksu asocjuje i tworzy kanał przepuszczalny dla jonów i małych cząsteczek organicznych (model de Kruiffa i Demela) [72]
- sekwencyjny mechanizm tworzenia kanałów wodnych, zgodnie z którym amfoterycyna B oddziałuje z fosfolipidami tworząc niewodną prepore, a następnie łączy się ze sterolami zawartymi w błonie tworząc kompletny kanał wodny (model Cohena) [73,74]
- związek zaburza strukturę błony niezależnie od obecności sterolu (model Hartsela) [75].

Za najlepiej odpowiadający rzeczywistości model tworzenia kanału w błonie lipidowej uważa się koncepcję de Kruijffa, zgodnie z którą pora wodna składa się z dwóch identycznych półpor, zlokalizowanych w obu warstwach błony i ustawionych względem siebie „ogon do ogona”. Każda półpora zbudowana jest z ośmiu naprzemiennie ułożonych cząsteczek AmB i ośmiu cząsteczek sterolu. Polarna "głowa " AmB oraz grupa hydroksylowa sterolu kontaktują się z roztworem wodnym po obu stronach błony. Sterol oddziałuje ponadto ze sprzężonym układem wiązań podwójnych antybiotyku oraz lipidami błonowymi. Kształt kompleksu pierwotnego AmB-sterol w przekroju poprzecznym zbliżony jest do trójkąta o kącie wierzchołkowym 23°. Osiem takich kompleksów tworzy baryłkowatą półporę, lipofilową od zewnątrz a hydrofilową w środku. Dwie półpory tworzące funkcjonalną porę stabilizują wiązania wodorowe pomiędzy grupami OH na węglu C-35 poszczególnych cząsteczek antybiotyku [72]. Utworzenie kanału o takiej strukturze jest możliwe wówczas, gdy antybiotyk ma dostęp do obydwu powierzchni biwarstwy lipidowej (DLC, ang. *double length channel*). Gdy antybiotyk podawany jest tylko po jednej stronie błony formowany jest kanał o pojedynczej długości - SLC (SLC, ang. *single length channel*). Dwie struktury tego typu

zestawione w konfiguracji „ogon do ogona” mogą utworzyć kanał DLC [76,77]. Oba typy kanałów mają zdolność do przepuszczania jonów, i w zależności od parametrów błonowych (np. skład lipidowy, grubość błony) oraz dostępności AmB, SLC jak i DLC mogą koegzystować i funkcjonować. Przypuszcza się, że w warunkach medycznego stosowania AmB najbardziej prawdopodobne jest powstawanie kanałów tylko typu SLC, z uwagi na aplikowanie antybiotyku jedynie od strony zewnątrzkomórkowej błony plazmatycznej. Kwestia ta jest jednak dyskusyjna biorąc pod uwagę doniesienia o zdolności AmB do penetracji do wnętrza komórki i internalizacji antybiotyku, co zostało potwierdzone eksperymentalnie między innymi w oparciu o fluorescencyjną metodę transferu energii [43,44,64]. Wydaje się zatem, że antybiotyk może działać równie efektywnie od strony zewnątrzkomórkowej, jak i wewnątrzkomórkowej błony. W badaniach z zastosowaniem sztucznych czarnych błon lipidowych (BLM) zaobserwowano, że kanały o pojedynczej długości wykazują większą selektywność przepuszczalności w stosunku do jednowartościowych kationów aniżeli anionów [77-80]. Ponadto, jak stwierdzono na podstawie prac eksperymentalnych nad kanałami AmB formowanymi w dużych i małych pęcherzykach lipidowych, selektywność względem jonów zależy od stężenia antybiotyku [81]. Mimo, iż SLC wykazuje selektywność w stosunku do kationów, różnica w przepuszczalności jonów nie jest jednak znacząca, i w warunkach fizjologicznych zarówno dodatnio jak i ujemnie naładowane jednowartościowe jony są transportowane za pośrednictwem obu typów kanałów. Przypuszcza się, że niska selektywność jonowa wynika prawdopodobnie z dużych rozmiarów kanału formowanego przez AmB. Średnicę kanału szacuje się na około 7-10 Å, co stanowi wartość znacznie większą aniżeli w przypadku wielu kanałów białkowych [57].

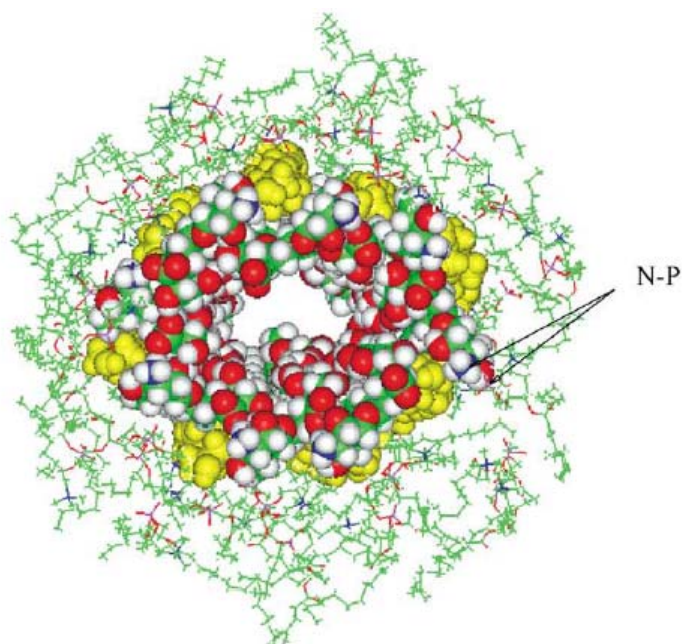
Symulacje komputerowe kompleksu polien-sterol zdają się wskazywać na istotną rolę oddziaływań międzycząsteczkowych między grupami aminowymi i karboksylowymi cząsteczek AmB wchodzących w skład kanału. Wykazano, że tego typu interakcje mogą być odpowiedzialne za stabilizację półpory poprzez tworzenie pierścienia wiązań wodorowych od strony zewnętrznej błony. Osłabienie tych wiązań w przypadku pochodnych AmB z podstawioną grupą karboksylową i/lub aminową prowadzi do utworzenia kanału o mniejszej trwałości. Obliczenia wykonane metodami dynamiki molekularnej sugerują również, że kanał AmB - ergosterol ma większą średnicę niż kanał AmB – cholesterol [82], Rys. 3, co może pociągać za sobą większą wydajność w transporcie jonów w przypadku kanału tworzonego z udziałem

ergosterolu. Wykazano również większą stabilność kanału AmB-ergosterol dzięki zdecydowanie silniejszej sieci wiązań wodorowych pomiędzy sąsiednimi cząsteczkami antybiotyku [82,83]. Istotną rolę przypisuje się także specyficznym interakcjom AmB z fosfolipidami błonowymi [83]. Stwierdzono, że DPPC (fosfatydylocholina) może silnie oddziaływać z cząsteczką AmB poprzez atomy tlenu grupy fosforanowej formując wiązanie wodorowe z jedną z grup hydroksylowych aminocukru. Przypuszcza się, że tego typu interakcje odpowiedzialne są za przemieszczanie się („trafficking”) antybiotyku wewnątrz błony jak również destrukcję struktury kanału [83].

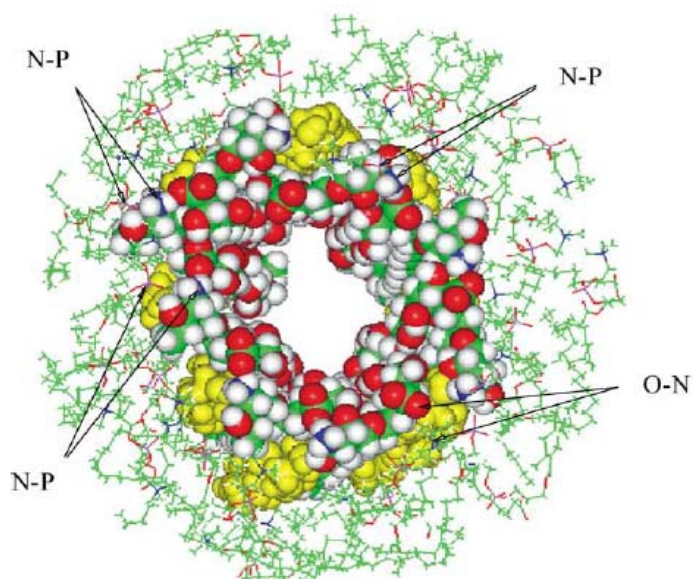
Wyniki ostatnich symulacji interakcji pomiędzy AmB i powierzchnią błony lipidowej uzyskane techniką dynamiki molekularnej sugerują, że cząsteczka antybiotyku przyjmuje orientację wertykalną, prostopadłą do powierzchni błony [57,84]. Uzyskano wyniki wskazujące, że cząsteczka AmB, poprzez grupę karboksylową, bardzo silnie oddziałuje z grupą aminową cząsteczek DMPC. Oddziaływania tego rodzaju nie są przypadkowe a cząsteczki antybiotyku łącznie z cząsteczkami fosfolipidów wykazują tendencję do dyfuzji lateralnej. Na tej podstawie sugeruje się, że penetracja błony lipidowej przez pojedyncze cząsteczki AmB jest mało prawdopodobna. Zdolność AmB do formowania monowarstw na granicy faz woda/powietrze [85-88] wydaje się potwierdzać tę sugestię. Zasugerowano, że na powierzchni błony cząsteczki antybiotyku formują najpierw supramolekularne kompleksy, które dopiero w dalszej kolejności ulegają reorganizacji do utworzenia kanału. Co ciekawe, obecność takich supramolekularnych struktur zawierających wiele cząsteczek AmB zaobserwowano ostatnio przy użyciu metod mikroskopii sił atomowych (AFM, ang. *Atomic Force Microscopy*) [89]. Pojawiły się ponadto przypuszczenia [82,83,90,91], że w reorganizacji kompleksów i/lub wnikaniu cząsteczek antybiotyku do wnętrza błony istotną rolę odgrywać mogą cząsteczki sterolu.

Wiele danych wskazuje na to, że mechanizm tworzenia kanału, jego trwałość i charakterystyka przepuszczalności decydują o selektywnej toksyczności amfoterycyny B.

a)



b)



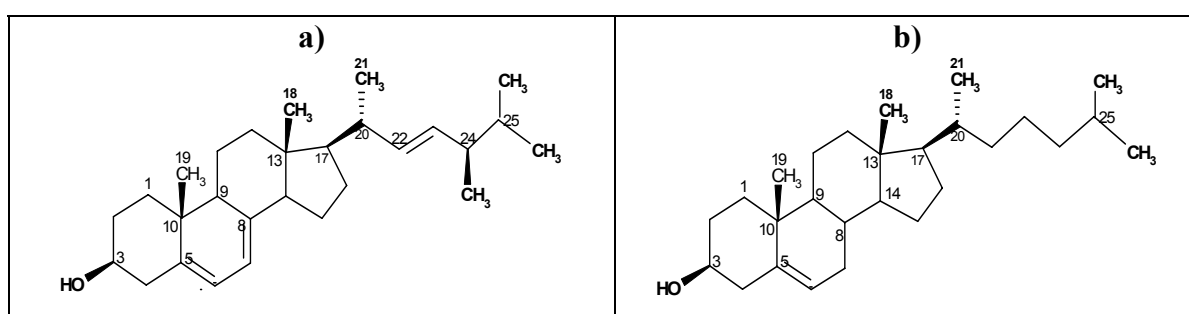
Rys. 3. Struktury kanałów AmB-sterol otrzymane metodą MD [82]; **a)** kanał AmB–cholesterol **b)** kanał AmB–ergosterol. Niebieski-atomy azotu, czerwony-atomy tlenu, zielony-atomy węgla AmB. Sterol oznaczono kolorem żółtym. Strzałki ilustrują oddziaływania pomiędzy zaznaczonymi atomami AmB i DMPC.

2.3. Podstawy selektywnej toksyczności amfoterycyny B

Możliwość zastosowania amfoterycyny B i innych makrolidów polienowych w terapii grzybic układowych wynika z ich nieco większej toksyczności w stosunku do zawierających ergosterol komórek grzybowych niż w stosunku do zawierających

cholesterol komórek ssaków. Obserwacja ta zasugerowała, że podstawą selektywnej toksyczności AmB jest różnicowe powinowactwo tego antybiotyku do błon zawierających różne sterole.

Potwierdzono to w doświadczeniach z zastosowaniem układów bimolekularnych i różnych błon modelowych [19,50,57,92-94]. Jak wynika z porównania struktur obu steroli, Rys. 4, ergosterol posiada w łańcuchu bocznym i pierścieniu B dodatkowe wiązania podwójne C=C oraz grupę metylową w pozycji C-24 łańcucha bocznego. Elementy te nie występują w cholesterolu. Różnica w budowie obu steroli jest jednak zbyt mała, by związek nie był toksyczny także dla komórek zwierzęcych [4,19].



Rys. 4. Struktura **a)** ergosterolu **b)** cholesterolu.

Według zaproponowanego molekularnego modelu kompleksu pierwotnego [92-95] polien-sterol w tworzeniu i stabilizacji tego kompleksu kluczową rolę odgrywają siły:

- wiążące – oddziaływania hydrofobowe Van der Waasa, π -elektronowe między układem sprzężonych wiązań podwójnych AmB a wiązaniami podwójnymi cząsteczki sterolu, oraz układ wiązań wodorowych z udziałem sprotonowanej grupy aminowej reszty cukrowej – mykozaminy, anionem karboksylanowym AmB i grupą hydroksylową sterolu w pozycji 3 β ; uważa się, że ze względów sterycznych, w układzie tym może brać udział cząsteczka wody
- orientujące – rozkład geometryczny punktów wiążących wpływający na geometrię kompleksu (Rys. 5).

Typy wiązań stabilizujących kompleks antybiotyk-sterol są takie same zarówno dla cholesterolu jak i ergosterolu. Niemniej jednak wydaje się, że w przypadku ergosterolu

oddziaływania wiążące są dużo silniejsze z powodu obecności dwóch dodatkowych wiązań podwójnych. Jedno z nich (Δ^7), umożliwia występowanie silniejszych aniżeli dla cholesterolu oddziaływań π -elektronowych. Natomiast obecność drugiego z tych wiązań w łańcuchu alifatycznym zmienia jego konformację. W konsekwencji łańcuch boczny ergosterolu jest wyprostowany w przeciwieństwie do cholesterolu, w przypadku którego dochodzi do zgięcia łańcucha i wyraźnego odchylenia od płaszczyzny układu steroidowego. Taka konformacja może utrudniać powstawanie kompleksu pierwotnego bądź czynić go bardziej podatnym na niekorzystne wpływy zewnętrzne [93,95].

Istotną rolę w różnicowym oddziaływaniu AmB z oboma sterolami może odgrywać rozkład punktów wiążących, który wpływa na geometrię powstałego kompleksu. Z kolei kompleksy o odmiennej geometrii mogą różnić się tendencją do agregacji w letalny kanał błonowy. Dodatkowy punkt wiążący w cząsteczce ergosterolu (dodatkowe oddziaływanie π -elektronowe) może stabilizować określoną geometrię kompleksu.

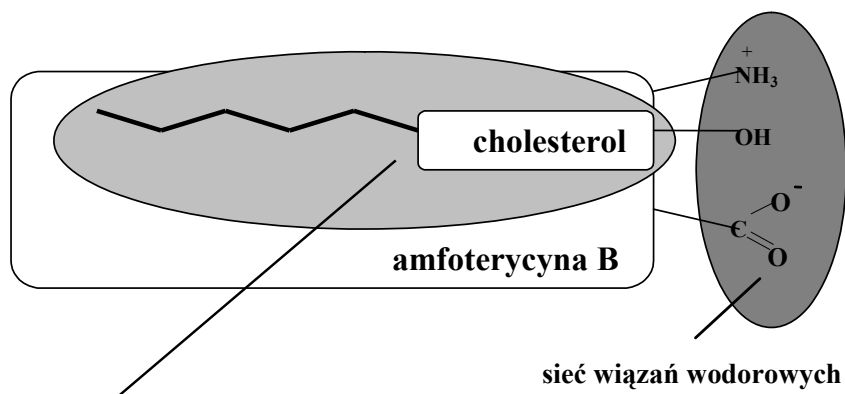
Badania nad oddziaływaniem AmB oraz jednej z jej pochodnych - MFAME z błonami lipidowymi, komórkami grzybowymi, zwierzęcymi i bakteryjnymi wykazały, że sterole nie są jedynymi składnikami błon wiążącymi antybiotyki [43,44]. Wydaje się, że istotne znaczenie dla aktywności AmB oraz jej pochodnych ma zdolność do specyficznego oddziaływania z fosfolipidami błonowymi, co stwierdzono w oparciu o wyniki licznych doświadczeń w układach modelowych [19,50] oraz eksperymentów przeprowadzonych z udziałem monowarstw lipidowych Langmuira [96,97]. Przypuszcza się, że kompleksacja z fosfolipidami może prowadzić do zmniejszenia ilości wolnej monomerycznej formy antybiotyku zdolnej do selektywnego oddziaływania ze sterolami błonowymi [96].

Tak więc sama obecność antybiotyku w błonie nie jest wystarczająca dla zwiększenia jej przepuszczalności, jak również działania toksycznego. Wiele wskazuje na to, iż wbudowane w błonę cząsteczki antybiotyku nie zawsze mogą utworzyć efektywnie działający kanał.

W świetle powyższych faktów, rola prostej hipotezy sterolowej w selektywnej toksyczności AmB oraz jej pochodnych wydaje się ograniczona. Różnicowe powinowactwo do steroli błonowych nie wyjaśnia obniżenia toksyczności pochodnych antybiotyku w stosunku do komórek gospodarza. Poznanie podstaw tego zjawiska

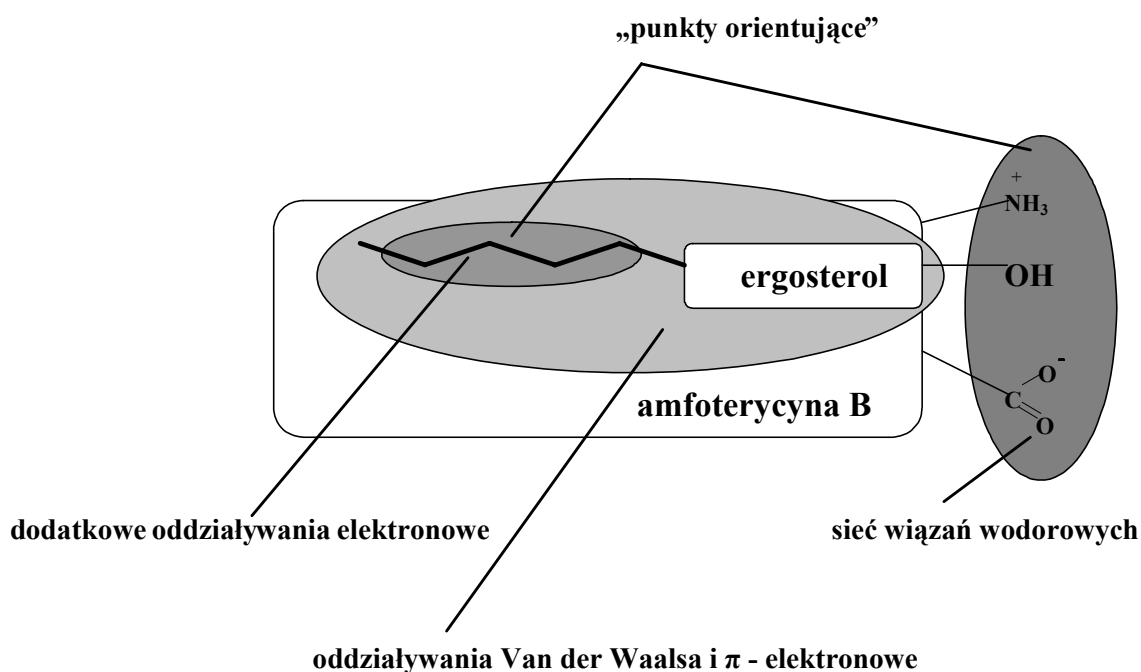
wymaga uwzględnienia innych czynników natury fizykochemicznej, wśród których istotne znaczenie przypisuje się zagadnieniu struktury roztworów wodnych antybiotyku.

a)



oddziaływania Van der Waalsa i π – elektronowe

b)



Rys. 5. Koncepcyjne modele kompleksów **a)** AmB- cholesterol; **b)** AmB- ergosterol [95].

2.4. Stan amfoterycyny B w roztworach wodnych

W środowisku wodnym AmB ulega procesowi asocjacji dając w efekcie pozostającą w stanie równowagi mieszaninę składającą się z monomeru oraz

rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych agregatów. Wzajemne proporcje tych składników zależą od stężenia antybiotyku, składu środowiska wodnego oraz sposobu przygotowania roztworu. Przyczyną silnej tendencji AmB do agregacji jest jednocześnie występowanie w cząsteczce fragmentów hydrofobowych (chromofor polienowy) i silnie polarnych (aminocukier, grupa karboksylowa, fragment poliolowy). W środowisku wodnym cząsteczki tego typu pod wpływem oddziaływań hydrofobowych agregują tworząc asocjaty o hydrofilowej powierzchni i hydrofobowym wnętrzu.

2.4.1. Agregaty amfoterycyny B

Stwierdzono, iż w roztworach wodnych AmB występuje głównie w formie wielkocząsteczkowych agregatów [98]. Z formą monomeryczną mamy do czynienia jedynie przy bardzo niskich stężeniach, rzędu 10^{-7} M lub niższych [99,100]. Przy stężeniach powyżej 10^{-6} M przeważają formy zagregowane. Maksymalne stężenie formy monomerycznej w roztworach o fizjologicznym pH oszacowano na $1,5 \times 10^{-6}$ M [101].

Spośród wielu znanych sposobów badania zjawiska agregacji w przypadku AmB największe zastosowanie znalazły metody spektroskopowe w zakresie bliskiego nadfioletu i światła widzialnego. W zakresie niskich stężeń AmB ($c < 10^{-7}$ M) w obszarze 420-320 nm obserwuje się 4 pasma absorpcji przy 409, 385, 365, 347 nm. Intensywność tych pasm wzrasta wraz z długością fali osiągając dla pasma 409 nm wartość molowego współczynnika ekstynkcji równą $1,6 \times 10^5$ [$M^{-1}cm^{-1}$]. Widmo to przypisywane jest monomerycznej formie antybiotyku. Wraz ze wzrostem stężenia antybiotyku obserwuje się zmiany wyglądu widm odzwierciedlające przebieg agregacji: zanik maksimum absorpcji przy 409 nm (typowego dla monomeru) i pojawienie się nowych pasm absorpcyjnych przy 420, 385, 360 i około 340 nm, charakterystycznych dla form zagregowanych. Najintensywniejsze jest szerokie pasmo, którego maksimum występuje przy długości fali około 340 nm. W widmach CD proces asocjacji odzwierciedla pojawienie się silnego dubletu ekscytacyjnego ze środkiem przy około 340 nm. Zmiany obserwowane w widmach CD w zależności od stężenia antybiotyku są wynikiem formowania się małych oligomerów, najprawdopodobniej dimerów [100-103]. Dalsze etapy procesu agregacji nie prowadzą do zdecydowanych zmian we właściwościach spektroskopowych. Jednak staranna analiza zestawów widm wodnych roztworów AmB o różnych stężeniach ujawnia, że w widmach tych brak jest punktów izosbestycznych. Wskazuje to na obecność co najmniej 3 form spektralnych. Tak więc

proces agregacji AmB ma charakter co najmniej dwustopniowy. W roztworze oprócz monomeru występują małocząsteczkowe rozpuszczalne oligomery (dimery ?) oraz wielkocząsteczkowe agregaty.

Niewiele wiadomo na temat właściwości fizykochemicznych agregatów AmB. Zastosowanie metody Zimma do analizy światła rozpraszanego przez wodno-alkoholowe roztwory AmB o stężeniu w zakresie 10^{-5} - 10^{-4} M pozwoliło określić masę cząsteczkową agregatów na około 2×10^6 daltonów [98]. Te wielkocząsteczkowe agregaty ulegają łatwo sedymentacji podczas wirowania. Wykorzystano ten fakt przy badaniach mechanizmu procesu agregacji [38].

Nie ma bezpośrednich danych eksperymentalnych dotyczących struktury zagregowanych form AmB. Bazując na klasycznych technikach spektroskopowych zaproponowano kilka różnych hipotez [102-106]. Według modeli proponowanych przez Ernst i współaut. [102] jak również Hemenger i współaut. [104] duże agregaty mają strukturę helikoidalną złożoną z dimerów formowanych przez cząsteczki AmB. Odminną koncepcję zaproponowano natomiast w naszej Katedrze [105,106]. Zgodnie z nią za silny sygnał w widmach CD odpowiedzialne są dimery o silnie asymetrycznej, chiralnej budowie. Z kolei Barwicz i współaut. [107] wysunęli zupełnie inną koncepcję, zgodnie z którą AmB ulega w wodzie spontanicznej agregacji do formy hydrofilowych cylindrów zawierających około 5 cząsteczek AmB. Twory te mogą następnie formować większe agregaty łącząc się według schematu „głowa do głowy” lub równolegle. Koncepcja ta jednak nie wyjaśnia zmian obserwowanych w widmach CD.

W oparciu o symulacje komputerowe zaproponowano w naszej Katedrze [105,106] strukturę dimeru w środowisku wodnym. Według tego modelu cząsteczki AmB tworzące dimer ułożone są „głowa do ogona”, a chromofory przyjmują konformację umożliwiającą zmniejszenie oddziaływań hydrofobowych. Zasugerowano, że za stabilizację struktury dimeru poza oddziaływaniami hydrofobowymi odpowiedzialne jest wiązanie wodorowe pomiędzy tlenem w pierścieniu mykozaminy jednej cząsteczki a grupa hydroksylową 35-OH drugiej. Specyficzna asymetryczna struktura dimeru, znajdująca swoje odzwierciedlenie w widmie CD, jest wynikiem oddziaływań wewnątrz- oraz międzycząsteczkowych, w tym również oddziaływań z rozpuszczalnikiem.

Informacje na temat procesu agregacji pochodnych AmB są ograniczone. Wiadomo jedynie, że związki te ulegają również procesowi agregacji, przy czym wydaje się, że w niektórych przypadkach agregacja zatrzymuje się na etapie

oligomerów, których struktury są odmienne niż dla wyjściowego antybiotyku. Zagadnienie to próbowano wyjaśnić używając dimerów AmB [108]. Dimery te uzyskano łącząc grupy aminowe dwóch cząsteczek AmB przy pomocy kwasów dikarboksylowych o różnej długości. Związki te wykazują podobne właściwości spektroskopowe jak agregaty AmB, lecz ich aktywność biologiczna jest zdecydowanie odmienna: wykazują dużą zdolność do hemolizy krwinek czerwonych, przy jednoczesnym braku aktywności w stosunku do komórek grzybowych. Sugeruje to, że mechanizm działania tych związków może być inny niż zagregowanych form AmB i jej pochodnych [108,109].

Ostatnio wykazano, że sole z serii Hofmeistera silnie wpływają na stopień agregacji AmB i niektórych jej pochodnych (AME, AMA, AcAmB, AcAME, AcAMA) [110]. Jony należące do tej serii przejawiają zdolność do zmian fizykochemicznych właściwości wody [111-114], a w związku z tym modulują rozpuszczalność wielu związków w roztworach wodnych. Dokładny mechanizm tego zjawiska nie jest znany [112-144], ale przypuszcza się, że struktura wody, oddziaływania elektrostatyczne i siły dyspersji odgrywają tutaj kluczową rolę [112]. Kosmotropy (np. siarczany, cytryniany, fosforany) działają jako stabilizatory struktury wody obniżając rozpuszczalność związków zaburzających strukturę ciekłej wody, podczas gdy chaotropy (trichlorooctany, tiocyjaniany, nadchlorany, mocznik) wywołują efekt odwrotny poprzez wprowadzanie silnych zaburzeń w sieć wiązań wodorowych między cząsteczkami wody. Okazuje się, iż w obecności anionów kosmotropowych dochodzi do redukcji zawartości formy monomerycznej AmB i wzrostu udziału form zagregowanych antybiotyku. Z kolei aniony chaotropowe i mocznik wywołują efekt odwrotny. Co ciekawe, w przypadku tiocyjanianów i trichlorooctanów zaobserwowano całkowitą monomeryzację AmB. Autorzy podkreślają, iż wpływ różnych jonów na proces agregacji wyraźnie zależy od ładunku wypadkowego cząsteczki antybiotyku [110].

2.4.2. Agregacja a selektywna toksyczność

W wielu pracach eksperymentalnych wykazano, że formą aktywną dla błon ergosterolowych są zarówno rozpuszczalne agregaty jak i formy monomeryczne, w przeciwieństwie do błon cholesterolowych. Postuluje się, że są one wrażliwe tylko na formy zasocjowane [76,101,115]. Według jednej z hipotez wyjaśniających naturę selektywności monomerów, w przypadku błon ergosterolowych tworzą się w nich

kompleksy AmB z ergosterolem, które następnie agregują tworząc kanały. Natomiast w błonach zawierających cholesterol pora formowana jest przez dimery i rozpuszczalne oligomery antybiotyku, połączone „głowa do ogona”. Cholesterol nie uczestniczy bezpośrednio w tworzeniu kanału, a jego obecność powoduje zwiększanie sztywności biwarstwy lipidowej i ułatwienie wnikania dimerów bądź oligomerów w strukturę błony [116]. Wobec faktu toksyczności agregatów AmB dla komórek zwierzęcych zasugerowano, że utrudnienie agregacji powinno zredukować toksyczność antybiotyku. W oparciu o wieloetapowy model asocjacji, zgodnie z którym pierwszym etapem jest dimeryzacja monomerów do bardziej hydrofilowych dimerów wysunięto wnioski, że zmiany strukturalne cząsteczki prowadzące do zmniejszenia tendencji do dimeryzacji mogą zwiększać rozpuszczalność [117]. Udowodniono, że nadanie cząsteczce wypadkowego ładunku elektrycznego skutkuje spadkiem zdolności do agregacji oraz wzrostem rozpuszczalności związku w wodzie [38]. Proces agregacji jest utrudniony także w przypadku wprowadzenia na grupę aminową dużego objętościowego podstawnika zdolnego do indukowania efektu zawady przestrzennej [4,42-44].

Wyniki najnowszych badań procesów tranzytacji monomer/dimer AmB w roztworach oraz błonach lipidowych przeprowadzone z zastosowaniem spektroskopii fluorescencyjnej wyraźnie potwierdzają istotne znaczenie struktury tworzonych form zagregowanych w zjawisku selektywnej toksyczności antybiotyku [118-120]. Analiza widm fluorescencji AmB w układzie 2-propanol-woda ujawniła obecność dodatkowego w stosunku do głównego pasma absorpcyjnego, widma wzbudzenia z wyraźną strukturą oscylacyjną [118]. W oparciu o teorię rozszczepienia ekscytonowego oraz zależność van't Hoff'a pasmo to przypisano formom dimerów AmB. Biorąc pod uwagę obserwowane przesunięcia położenia maksimum wzbudzenia i emisji fluorescencji dla monomeru i dimeru, wyznaczono stopień dimeryzacji AmB w różnych układach, zarówno z udziałem ergosterolu jak i cholesterolu. Na podstawie uzyskanych wyników, stwierdzono, że różnica selektywności AmB wobec steroli błonowych związana jest nie tyle ze stopniem agregacji, co z organizacją struktur zagregowanych jak również średnicą formowanych porów [118-120].

Ze względu na duże kontrowersje odnośnie roli agregacji AmB w selektywnej toksyczności szczegółowe poznanie tego zjawiska staje się obecnie problemem, od rozwiązania którego może zależeć postęp w racjonalnych modyfikacjach tego cennego antybiotyku.

2.5. Pochodne AmB o obniżonej toksyczności

Wyniki licznych prac eksperymentalnych jak i obliczeń teoretycznych, z zastosowaniem metod modelowania molekularnego wykazały, że chemiczne modyfikacje struktury cząsteczki AmB w rejonie „polarniej głowy” obejmującej grupę karboksylową oraz aminową w reszcie mykozaminy wpływają na aktywność biologiczną antybiotyku [82,92,117]. Na podstawie badań prowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii zasugerowano, iż związki o polepszonej selektywnej toksyczności powinny: **1)** posiadać duży objętościowy podstawnik na grupie aminowej, ale pod warunkiem zachowania w strukturze związku atomu azotu zdolnego do protonowania w warunkach fizjologicznych; **2)** być obdarzone wypadkowym dodatnim ładunkiem elektrycznym w fizjologicznym pH, najkorzystniej w konsekwencji protonowania grupy aminowej; **3)** jako dodatkowy korzystny czynnik - zawierać zablokowaną grupę karboksylową [4,92,121,122].

Zaprojektowano i zsyntetyzowano dwie generacje kationowych pochodnych AmB [4]. Związki pierwszej grupy, zmodyfikowane na grupie karboksylowej (estry, amidy) wykazują kilkakrotną poprawę selektywnej toksyczności (między innymi AME i AMA) w porównaniu z antybiotykiem wyjściowym [122-126]. Podstawą korzystnych zmian właściwości tych związków jest zanik dodatkowej siły wiążącej (wiązania wodorowego pomiędzy grupą hydroksylową sterolu a anionem karboksylanowym) w cząsteczce antybiotyku. W przeciwieństwie do silnie wiążącego ergosterolu (dodatkowe oddziaływanie elektronowe dzięki obecności rejonu o zwiększonej gęstości elektronowej) brak dodatkowej siły wiążącej ma większe znaczenie dla obniżenia powinowactwa do cholesterolu. Ponadto pochodne pierwszej generacji dobrze rozpuszczają się w wodzie z uwagi na to, że ulegając protonowaniu obdarzone są ładunkiem dodatnim [38].

Wprowadzenie dużego objętościowego podstawnika w pochodnych drugiej generacji (pochodne N-alkilowe i N-aminoacylowe), zdolnego do wywoływania efektu zawady przestrzennej pozwoliło na dalszą optymalizację właściwości antybiotyku poprzez zakłócenie oddziaływania z cholesterolem, ale nie z ergosterolem. Wśród tej grupy pochodnych AmB radykalną poprawę selektywnej toksyczności uzyskano dla estru metylowego *N*-metylo-*N*-D-fruktopyranozyloamfoterycyny B (MFAME) [39]. MFAME zachowuje wszystkie korzystne właściwości AmB, łącznie z aktywnością w stosunku do szczepów wielolekoopornych (MDR) [46], a równocześnie posiada ok. 100-krotnie obniżoną toksyczność wobec komórek zwierzęcych [39,41-44]. Związek

ten został opatentowany [127]. Niestety, z uwagi na złożoność procesu syntezy oraz niską jego wydajność, MFAME nie znalazła zastosowania w praktyce. Również inna niskotoksyczna pochodna AmB, ester metylowy *N*-D-ornityloamfoterycyny B (Orn-AME) [128] została zdyskwalifikowana ze względu na stwierdzoną silną cerebrotoksyczność [129,130].

Ostatnio wachlarz otrzymanych dotychczas na drodze racjonalnych modyfikacji cząsteczki antybiotyku wyjściowego związków drugiej generacji rozszerzony został w prowadzonych w katedrze Technologii Leków i Biochemii badaniach o nową grupę zawadzonych przestrzennie *N*-aminoacylowych pochodnych amfoterycyny B, tzw. serię K, w których podstawnikami na grupie aminowej cząsteczki AmB są reszty aminokwasów, zarówno w formie izomerów L jak i D [40]. Ze wstępnych oznaczeń aktywności biologicznej tych związków wynika, że zachowują one aktywność przeciwgrzybową macierzystego antybiotyku a jednocześnie wykazują zróżnicowaną toksyczność w stosunku do komórek zwierzęcych. Ponadto, tworzą z kwasami i zasadami rozpuszczalne w wodzie sole, jak również rozpuszczalne w wodzie kompleksy z deoksycholanem sodu bądź innymi związkami kompleksotwórczymi. Zaletą związków z serii K, szczególnie istotną z punktu widzenia możliwości aplikacyjnych, jest nieskomplikowana i wydajna procedura ich otrzymywania [40].

Omówione w poprzednich rozdziałach rozprawy czynniki odpowiedzialne za selektywną toksyczność AmB nie wyjaśniają w pełni działania niskotoksycznych pochodnych antybiotyku z zawadą przestrzenną. Jak wykazano eksperymentalnie [41] poprawa selektywnej toksyczności MFAME, nie może być determinowana jedynie różnicowym powinowactwem antybiotyku do steroli błonowych. W układach alkoholowo-wodnych monomeryczne formy zarówno MFAME jak i AmB tworzą kompleksy z ergosterolem jak i cholesterolem. W przypadku obu związków obserwuje się nieco większe powinowactwo do ergosterolu aniżeli cholesterolu - dla MFAME zdolność do rozróżniania steroli jest jedynie nieznacznie większa. Różnice w powinowactwie są zbyt małe, by można im było przypisać radykalne obniżenie toksyczności MFAME w stosunku do komórek ssaków. Wydaje się również, że stan antybiotyku w roztworze, istotny dla selektywności działania AmB [76,101], nie jest czynnikiem o istotnym znaczeniu dla selektywności MFAME. Wykazano wprawdzie, że efektywność działania MFAME na krwinki czerwone jest związana z istnieniem w środowisku wodnym agregatów o różnych właściwościach spektroskopowych i różnej aktywności permeabilizacyjnej, jednakże nie ma wyraźnej korelacji pomiędzy stopniem

asocjacji a wysoką selektywnością związku [41,42]. Podobną prawidłowość zaobserwowano także w przypadku innych pochodnych o obniżonej toksyczności [131]. Różnicowe powinowactwo antybiotyku do błony cytoplazmatycznej również nie stanowi podstawy selektywnej toksyczności MFAME. Oznaczenie stopnia wiązania MFAME oraz AmB z błonami komórek grzybowych, zwierzęcych i bakteryjnych, przeprowadzone metodą fluorescencyjną opartą o transfer energii między sondą błonową a chromoforem polienowym, pozwoliło stwierdzić, iż powinowactwo antybiotyku do komórki jest niezależne od jej wrażliwości [43,44]. Zdolność oddziaływania antybiotyku z komórką nie jest zatem determinowana wyłącznie obecnością i strukturą sterolu. Poza tym, sama obecność antybiotyku w błonie nie zawsze jest wystarczająca dla zwiększenia jej przepuszczalności, jak i działania toksycznego.

Na podstawie badań z udziałem monowarstw lipidowych Langmuira stwierdzono ostatnio, że inna selektywnie działająca, zawadzona przestrzennie pochodna AmB – PAME (ester metylowy 1-piperydopropionilo amfoterycyny B), ulega w błonie bardzo silnemu wiązaniu przez fosfolipidy. W efekcie tej immobilizacji jedynie niewielka ilość antybiotyku pozostaje w wolnej, niezwiązanej formie monomerycznej, zdolnej do oddziaływania ze sterolami błonowymi. W tak niskim stężeniu antybiotyk wiąże się preferencyjnie z ergosterolem [96].

Najnowsze doniesienia dotyczące niskotoksycznych pochodnych AmB wskazują na istnienie specyficznych różnic w „zachowaniu się” antybiotyku wyjściowego i pochodnych wewnątrz dwuwarstwy lipidowej o różnym składzie sterolowym. W oparciu o metody modelowania molekularnego stwierdzono, że dwie selektywne pochodne AmB - SAME (ester metylowy N-(N'-3-dimetyloaminopropylosukcynimido amfoterycyny B) oraz wspomniana wyżej PAME wykazują zdolność do wnikania do głębszych aniżeli AmB hydrofobowych obszarów błony [132]. Wydaje się, iż penetracja błony przez antybiotyk zależy od jej grubości i zmniejsza się w kolejności: czysta DMPC >> DMPC/Chol > DMPC/Erg [133]. Czynniki te mogą mieć ważne znaczenie dla mechanizmu tworzenia kanałów błonowych. W „grubych” błonach prawdopodobnie formowane są kanały o podwójnej długości - DLC. Pochodne głębiej penetrujące błonę przypuszczalnie wykazują mniejszą skłonność do tworzenia tego typu kanałów w błonach, których grubość jest mniejsza. Stąd też aktywność jonoforowa pochodnych AmB powinna być mocniej zaznaczona w błonach zawierających ergosterol aniżeli cholesterol. Ponadto stwierdzono, że modyfikacje chemiczne w

rejonie głowy polarnej cząsteczki AmB (zwłaszcza wprowadzenie podstawnika na grupę aminową) prowadzą do przesunięcia równowagi konformacyjnej w kierunku konformacji, w której antybiotyk wydaje się posiadać większą skłonność do formowania kompleksu pierwotnego ze sterolem. Uważa się, że tego typu zmiany konformacyjne powinny dodatkowo zwiększać efektywność działania antybiotyku w stosunku do błon ergosterolowych bez modyfikacji aktywności wobec błon cholesterolowych [134]. Poza tym stwierdzono, że dodatkowa grupa aminowa wprowadzona do struktury PAME i SAME jest zdolna do formowania wiązań wodorowych z fosfolipidami i może przejąć rolę macierzystej grupy aminowej AmB. Wartym podkreślenia jest fakt, iż zdolność ta jest zdecydowanie większa dla błon zawierających ergosterol aniżeli cholesterol [132].

W związku z wykluczeniem roli różnicowego powinowactwa do steroli, powinowactwa do błony plazmatycznej jak i struktury roztworów wodnych jako czynników odpowiedzialnych za wysoką selektywność działania MFAME oraz biorąc pod uwagę ostatnie przedstawione wyżej doniesienia dotyczące innych niskotoksycznych związków zaproponowano nową koncepcję mechanizmu selektywnej toksyczności zawadzonych przestrzennie pochodnych AmB. Zasugerowano mianowicie, że niska toksyczność tego typu związków jest spowodowana ograniczoną zdolnością do tworzenia w błonach cholesterolowych letalnych (permeabilizujących) kanałów [44]. Natomiast w przypadku błon ergosterolowych, funkcjonalne kanały formowane są bez przeszkód.

Pełne wyjaśnienie natury molekularnej selektywnej toksyczności pochodnych amfoterycyny B z zawadą przestrzenną jest warunkiem koniecznym do zaprojektowania i syntezy związków o maksymalnie obniżonej toksyczności. Uzyskanie związków o korzystnym indeksie terapeutycznym stanowiłoby fundamentalne osiągnięcie w terapii, zwłaszcza w obliczu notowanego w ciągu ostatnich lat wzrostu częstotliwości występowania układowych infekcji grzybowych. Pochodne serii K są szczególnie przydatne przy próbie zrozumienia natury selektywnej toksyczności AmB i jej pochodnych. Pomimo bardzo zbliżonej budowy chemicznej wykazują one podobną, wysoką aktywność w stosunku do komórek grzybowych i bardzo zróżnicowaną toksyczność w stosunku do komórek ssaków.

Wiele innych, poza Katedrą Technologii Leków i Biochemii, ośrodków naukowych na świecie prowadzi intensywne poszukiwania niskotoksycznych pochodnych AmB na drodze modyfikacji struktury antybiotyku wyjściowego, wykorzystując w tym celu różnorodne strategie. Najciekawszą z proponowanych wydaje się koncepcja wysunięta przez Carreirę i współaut. [135], w oparciu o którą zsyntetyzowano konjugaty zawierające 4 cząsteczki AmB kowalencyjnie związane z rdzeniem kaliks[4]arenu. Tego typu makromolekuły przyjmują konformację stożkową imitującą strukturę transmembranowego kanału. Jak stwierdzono na podstawie wstępnych badań, tak zorganizowane tetramery AmB, wykazują podobną, a w niektórych przypadkach nawet wyższą, aktywność przeciwgrzybową w porównaniu do antybiotyku wyjściowego. Jednocześnie, zaobserwowano znaczące (co najmniej 10-krotne) obniżenie hemotoksyczności tych nowych konjugatów AmB. Warto w tym miejscu wspomnieć również o innym interesującym typie modyfikacji struktury AmB opartym o tworzenie dimerów, w których cząsteczki antybiotyku są połączone poprzez grupy aminowe (*N, N*-dimery) [108,136] bądź reszty karboksylowe (*C, C*-dimery) [137]. Ostatnio udało się otrzymać również kowalencyjne dimery AmB typu C-N, z łącznikiem pomiędzy grupami: aminową a karboksylową dwóch cząsteczek antybiotyku [138]. Niektóre spośród otrzymanych w ten sposób związków wydają się interesujące z uwagi na ich korzystniejsze w zestawieniu z natywną AmB właściwości [108,136-138]. Szczególnie obiecujące okazały się *N,N* – diaminoalkilo pochodne AmB charakteryzujące się wyższą niż wyjściowy antybiotyk aktywnością przeciwgrzybową i niską toksycznością [139].

2.6. Oporność komórek grzybowych

Klasycznie termin „oporność” odnosi się do organizmów wykazujących działanie chorobotwórcze mimo zastosowania maksymalnego stężenia leku w miejscu infekcji.

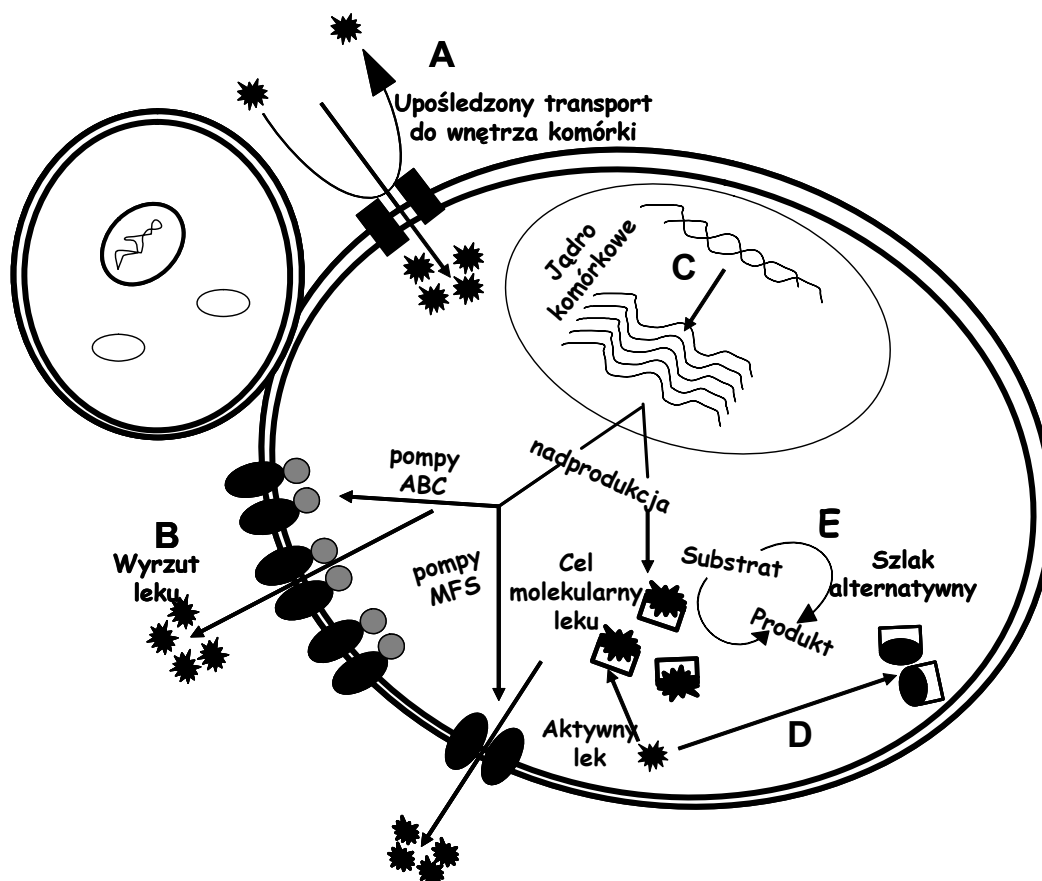
Oporność komórek grzybowych można zasadniczo sklasyfikować jako:

- pierwotną (naturalną) prezentowaną bez uprzedniej ekspozycji na lek
- nabytą rozwijającą się na skutek stabilnych lub przejściowych zmian genotypowych po ekspozycji na chemoterapeutyk, w ramach której wyróżnia się oporność specyficzną (np. monoterapia 5 fluorocytozyną) oraz oporność wielolekową (MDR).

Ponadto z punktu widzenia terapeutycznego istotne jest również pojęcie „oporności klinicznej” definiowanej jako zdolność patogenu, który w oparciu o testy laboratoryjne *in vitro* powinien być wrażliwy na stosowany lek, do rozwoju bądź ponownej infekcji w warunkach klinicznych. Ten typ oporności może być wynikiem wadliwego działania systemu obronnego gospodarza np. na skutek neutropenii, obecności obcego materiału w organizmie (protezy, cewniki), produkcji toksyn przez patogen jak również w wyniku nietypowej farmakokinetyki leku lub wadliwego dawkowania [10].

Obecnie problemem najbardziej niepokojącym jest rozwój oporności wielolekowej – MDR, definiowanej jako oporność patogenu na szerokie spektrum leków niespokrewnionych ze sobą funkcjonalnie ani też strukturalnie. Zjawisko to nie ogranicza się wyłącznie do patogenów ludzkich, ale rozszerza się ekspansywnie w obrębie całej skali ewolucyjnej [5,6,7,13].

Fenomen oporności wielolekowej jest wieloczynnikowy i wykorzystuje kombinacje różnorodnych mechanizmów, co schematycznie zilustrowano na Rys. 6. Generalnie przyjmuje się, że u podstaw MDR leży głównie nadekspresja białek błonowych, tzw. pomp eksportujących ksenobiotyki, należących do różnych klas definiowanych w oparciu o niezbędne dla ich działania źródła energii. Wykazano, że grzyby posiadają przynajmniej dwa typy tego rodzaju pomp białkowych: rodzina ABC (ATP-binding Cassette) oraz MFS (Major Facilitator Superfamily). Spektrum substratowe grzybowych pomp eksportujących jest szerokie i obejmuje większość leków używanych w terapii zakażeń grzybiczych, łącznie z flukonazolem i itrakonazolem.



Rys. 6. Główne mechanizmy oporności lekowej w komórkach grzybów [3,5-7]; **A**) upośledzenie transportu leku do wnętrza komórki w wyniku zmian w składzie ściany komórkowej bądź błony plazmatycznej; **B**) eksport leku za pośrednictwem transporterów ABC lub MFS; **C**) nadekspresja genów kodujących cel molekularny np. 14- α -demetylazę lanosterolu (*ERG11*) i/lub błonowe pompy białkowe np. *CDR1*, *CDR2* i *CaMDR1*; **D**) zmniejszenie lub utrata zdolności do wiązania leku na skutek zmian celu molekularnego (mutacje punktowe) np. Erg11p (P45014DM); **E**) aktywacja alternatywnego szlaku (np. $\Delta^{5,6}$ -desaturaza w biosyntezie ergosterolu).

2.6.1. Mechanizmy oporności grzybów na amfoterycynę B

Generalnie oporność grzybów na AmB i inne polieny ma charakter oporności specyficznej. W odniesieniu do tego typu związków nie notuje się przypadków występowania zjawiska oporności wielolekowej.

Mimo wieloletniego stosowania makrolidów polienowych w klinice, doniesienia o oporności specyficznej są ograniczone w zasadzie do mniej rozpowszechnionych gatunków *Candida*, jak *Candida lusitaniae*, *C. glabrata* i *C. guilliermondii* [140-142] oraz niektórych pleśni (*Fusarium* spp., *P. boydii*) [1]. Niemniej jednak pacjenci z upośledzonym układem oporności, szczególnie ci cierpiący na choroby nowotworowe, znajdują się w sferze wysokiego ryzyka. Stwierdzono, iż szczepy kliniczne odporne na flukonazol i często wykazujące oporność krzyżową w stosunku do innych azoli,

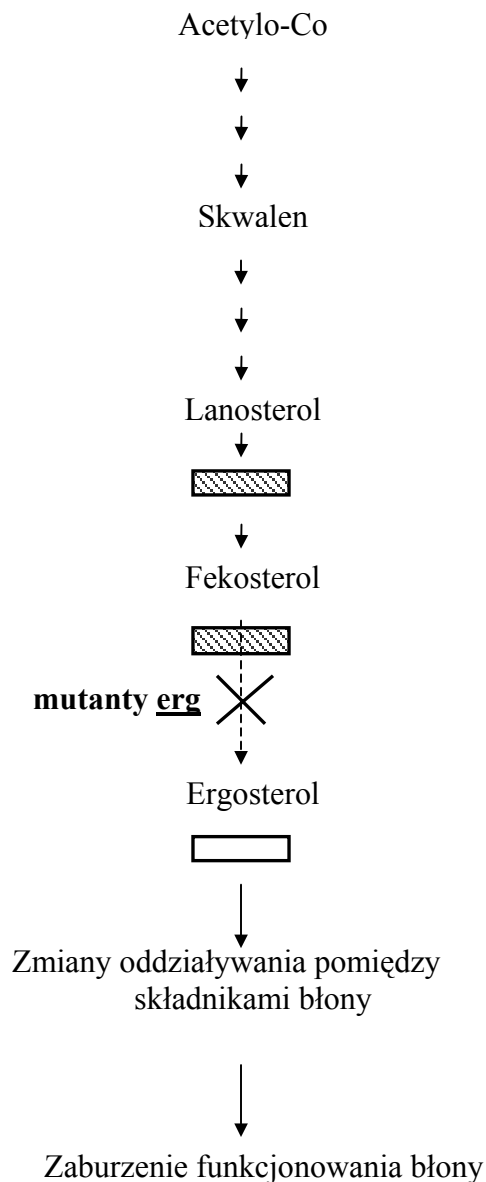
przejawiają zdolność do kształtowania oporności krzyżowej również w stosunku do antybiotyków polienowych [143-146].

Według teorii Hamiltona-Millera [48,49] oporność na polieny pojawia się w wyniku zmian ilościowych lub jakościowych w zawartości sterolu w komórkach. Zgodnie z tą hipotezą, komórki ze zmodyfikowanym sterolem powinny wiązać mniejsze ilości polienów aniżeli komórki wrażliwe. Ograniczona zdolność do oddziaływania polienów z komórkami mutantów może być uwarunkowana [140] :

- obniżeniem całkowitej zawartości ergosterolu w komórce
- zastąpieniem niektórych bądź wszystkich steroli stanowiących miejsca wiązania polienów przez takie, które wiążą polieny słabiej
- reorientacją lub maskowaniem steroli w taki sposób, że wiązanie się z polienami jest utrudnione.

Mutacje dotyczące enzymów biosyntezy ergosterolu wydają się najbardziej charakterystycznym mechanizmem oporności u *Candida* i genetycznie podobnego, niepatogenicznego modelu drożdży - *Saccharomyces cerevisiae*. Ergosterol jest ważnym składnikiem błony plazmatycznej drożdży, pełni bowiem rolę bioregulatora płynności i asymetrii błony, a w konsekwencji integralności błonowej. Ponadto wykazano, że sterole biorą również udział w proliferacji komórek, a ich prekursory zaangażowane są w biosyntezę glikolipidów jak również prenylację białek [147]. Istnieje szereg dowodów potwierdzających korelację pomiędzy zawartością i składem steroli w komórce a jej wrażliwością na polieny. Mutanty ergosterolowe *Candida albicans* w związku z defektem w szlaku biosyntezy ergosterolu akumulują różne intermediaty (Rys. 7). Powoduje to zmiany we właściwościach fizykochemicznych błony w porównaniu z błoną szczepów produkujących ergosterol. W oparciu o dwie niezależne metody: technikę FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), w której śledzi się lateralną ruchliwość sondy lipidowej FAST-Dil (wyższy współczynnik dyfuzji w mutantach erg) oraz fluorescencję sondy DPH w świetle spolaryzowanym (niższa w mutantach erg) stwierdzono większą płynność błony mutantów ergosterolowych [148]. Pesti wykorzystując mutanty -erg wykazał, że wyczerpanie ergosterolu prowadzi do obniżenia asymilacji glicerolu, metyloglukozydów, kwasu DL-mlekowego, L-sorbozy, L-arabinozy i rybiotolu [149-151]. Prasad i współaut. zaobserwowali również redukcję transportu wielu aminokwasów u mutantów erg2 i erg16 w porównaniu z dzikim

szczepem. Niemniej jednak nie wykazano zasadniczych różnic w poziomie ATPazy błonowej i ruchu protonów sprzężonego z pobieraniem aminokwasów. Stąd też postulowano, że u podstaw obserwowanego ograniczenia transportu leży nie różnica w stanie energetycznym komórek mutantów i szczepu dzikiego, ale prawdopodobnie obniżenie zawartości ergosterolu [152]. Fryberg wykazał mniejszą wrażliwość na AmB szczepów zawierających Δ^8 -sterole w stosunku do tych posiadających Δ^7 -sterole. Podobnie rzadka oporność na AmB u *Cryptococcus* spp. wynika z defektu $\Delta^{8,7}$ – izomerazy sterolowej, co prowadzi w konsekwencji do akumulacji ergosta-5,8,22-trienolu, ergosta-8,22-dienolu, fekosterolu, ergosta-8-enolu i obniżenia zawartości ergosterolu - głównego sterolu wrażliwych komórek [10,140]. Niemniej jednak należy podkreślić, że znane są mutanty odporne na AmB zawierające profil steroli dzikiego szczepu. Zaobserwowano je dla *Cryptococcus neoformans*, który wykazuje minimalne jedynie zmiany w składzie ilościowym steroli i nie wykazuje żadnych zmian jakościowych. W niektórych przypadkach notuje się nawet wzrost poziomu ergosterolu u mutantów opornych np. *C. guilliermondii* uzyskanych w warunkach mutagenезы z użyciem N-metyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidyny [152]. Oporność na antybiotyki polienowe nie może być zatem ograniczana jedynie do redukcji zawartości ergosteroli w błonie. Mechanizm oporności może angażować również różnice w poziomie aktywności katalaz zdolnych do kontrolowania oksydacyjnych zmian powodowanych przez lek oraz subtelne zmiany w strukturalnych cechach błony, które pozostają nie do końca wyjaśnione. Istnieją doniesienia sugerujące, że działanie polienów może mieć również wpływ na zmiany zawartości innych komponentów komórkowych np. składników ściany komórkowej (chityna, β -glukany) [153-155], kwasów tłuszczowych i fosfolipidów błonowych [148,152,156]. Pesti wykazał wzrost aktywności syntazy chityny u mutantów ergosterolowych, co może być uwarunkowane zmianami w aktywności błony, a w konsekwencji wzrostem dostępności zymogenicznej formy syntazy chityny dla czynników aktywujących lub trypsyny. Z kolei specyficzne wzbogacenie komórek *Saccharomyces cerevisiae* w fosfatydyloetanolaminę zapewnia selektywną ochronę przed działaniem antybiotyków polienowych [152].

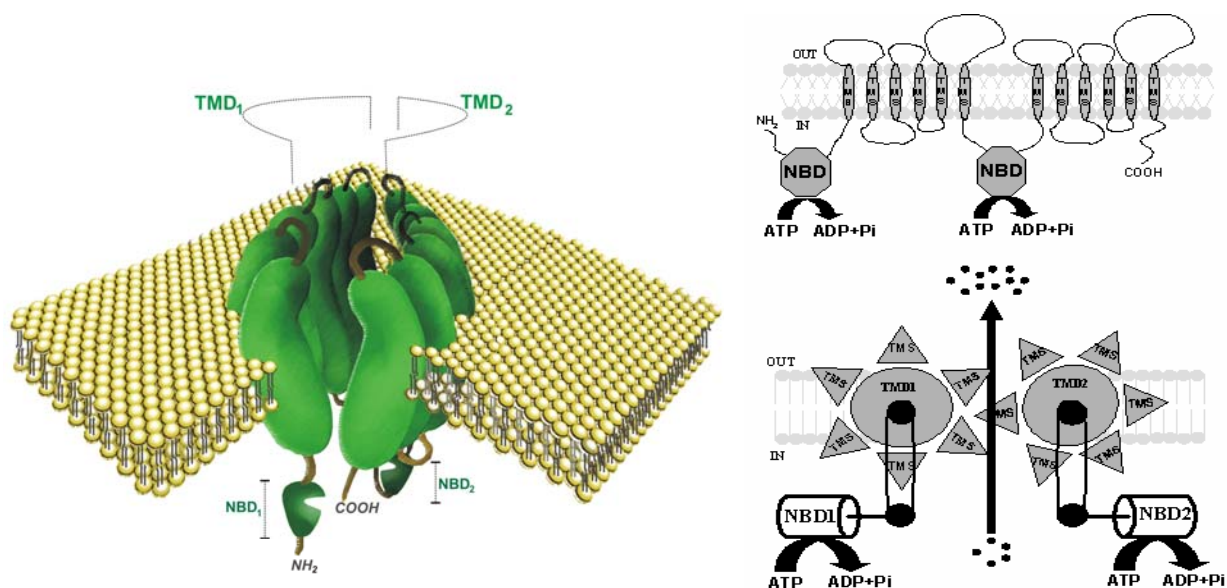


Rys. 7. Miejsce uszkodzenia szlaku biosyntezy ergosterolu w mutantach ergosterolowych (*erg*) i jego konsekwencje [152].

2.6.2. Oporność wielolekowa komórek grzybowych

Transportery **ABC**, jedna z klas pomp eksportujących, posiadają wspólną 4 – domenową strukturę złożoną z dwóch integralnych domen błonowych **MSD** (ang. *Membrane Spanning Domains*) (każda zawiera 6 lub 7 transmembranowych segmentów) oraz dwóch domen cytoplazmatycznych **NBD** (ang. *Nucleotide Binding Domains*), które sprzęgają hydrolizę ATP z transportem substratów (tzw. region Walker A i B) (Rys. 8)

[157,158].

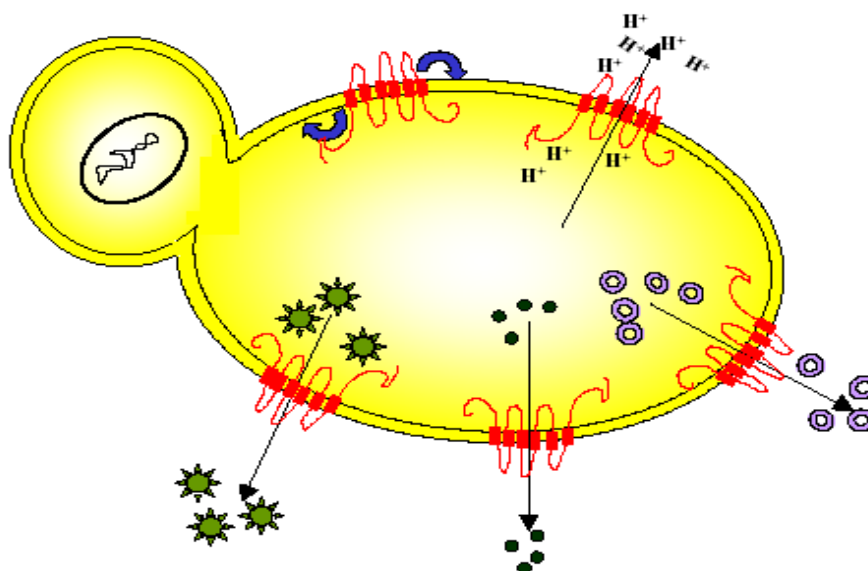


Rys. 8. Przypuszczalna topologia transportera ABC [3,5-7,159].

Poznanie kompletnej sekwencji genomu *Saccharomyces cerevisiae* ujawniło obecność co najmniej 30 transporterów ABC. W oparciu o podobieństwo sekwencyjne pogrupowano je w 6 rodzin: PDR, MDR, MRP/CFTR, RLI, YEF3 i ALDP [158]. Pierwsza z wymienionych grup jest najliczniejsza i należy do niej większość transporterów odpowiedzialnych za eksport leków. Wśród głównych pomp wielolekowych u *S. cerevisiae* wymienia się Pdr5p, Snq2p oraz Yor1p, które charakteryzują się bardzo szerokim spektrum substratowym, obejmującym m.in. leki przeciwgrzybowe, przeciwnowotworowe, herbicydy.

Przykładem jednego ze zidentyfikowanych do tej pory transporterów ABC u *Candida albicans* jest białko CDR1 zaangażowane w oporność na flukonazol i inne azole. Gen kodujący ten transporter został sklonowany przez Prasada na drodze komplementacji mutanta *pdr5 S. cerevisiae* i jak wykazano przejawia strukturę homologiczną do ludzkiej P-glikoproteiny będącej pompą wielolekową odpowiedzialną za oporność nowotworów na wiele chemoterapeutyków [160,161]. Zważywszy na ogromną różnorodność i niską specyficzność transporterów ABC przypuszcza się, że są one zaangażowane nie tylko w zjawisko oporności. Ostatnie dowody potwierdzają, że te multifunkcjonalne białka pośredniczą w istotnych funkcjach fizjologicznych jak: patogenezę bakteryjną, transdukcję sygnału, różnicowanie komórek i szereg innych (Rys. 9). Ponadto wykazano, że transportery ABC mają zdolność do translokacji fosfolipidów, co stwierdzono dla Cdr1p oraz jego homologów: Cdr2p i Cdr3p. Należy

przy tym podkreślić, że Cdr1p i Cdr2p, których nadekspresja prowadzi do MDR wykazują aktywność flopazy kierując fosfolipidy na zewnątrz komórki, podczas gdy Cdr3p nie zaangażowane w nadawanie oporności działa jako flipaza. Na tej podstawie wnioskuje się, że zdolność do transferu fosfolipidów jest fizjologiczną rolą białek ABC niezależnie od ich udziału w eksporcie leków [3,5-7,162-165].

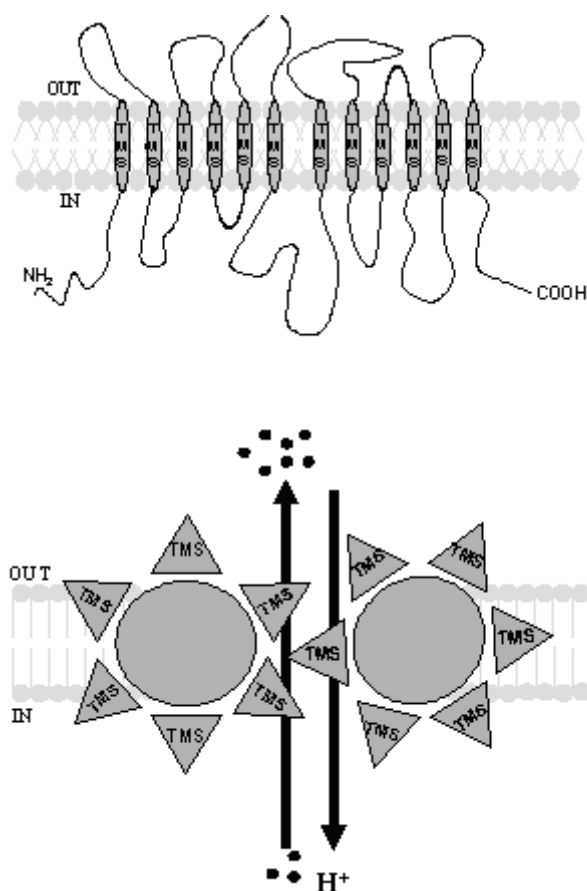


Funkcja	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida albicans</i>
Transport leków/jonów nieorganicznych (●)	PDR5 , <i>SNQ2, YOR1, YCF1</i>	CDR1 , <i>CDR2</i> , <i>CaYOR1</i>
Eksport steroidów (★)	PDR5 , <i>SNQ2</i>	CDR1
Sekrecja sex feromonów peptydowych (ang. <i>mating pheromones</i>) (●) (np. a-faktor)	* <i>STE6</i>	* <i>HST6</i>
Translokacja fosfolipidów 	PDR5 <i>YOR1?</i>	CDR1 <i>CDR2</i> , * <i>CDR3</i> , * <i>CDR4</i>
Regulator transportu jonów (H ⁺)	-	CDR1

Rys. 9. Wieloczynnikowa rola transporterów typu ABC w komórkach drożdży. Transportery ABC nie zaangażowane w zjawisko oporności wielolekowej jak *CDR3*, *CDR4*, *STE6* oraz *HST6* (oznaczone symbolem *) zostały również ujęte w zestawieniu w celu podkreślenia ich szczególnych funkcji. *SNQ2* (Sensitivity to 4-nitroquinoline N-oxide); *YOR1* (Yeast Oligomycin Resistance); *YCF1* (Yeast Cadmium Factor) [164,165].

Druga klasa pomp błonowych - **MFS** definiowana jest jako rodzina permeaz zbudowanych z 2 jednostek strukturalnych o 6 transmembranowych α – helikalnych segmentach połączonych cytoplazmatyczną pętlą (Rys. 10). W odróżnieniu od transporterów ABC nie zawierają one domeny wiążącej ATP. Źródłem energii tego typu nośników jest chemiosmotyczny gradient jonowy (PMF-proton motive force) [3,5-

7]. Chociaż MFS mogą działać jako uniportery, symportery i antyportery, dominuje ostatni z wymienionych typów transportu: protony tworzące gradient migrują do komórki, a cząsteczki substratu są pompowane na zewnątrz. Przypuszcza się, że w rozpoznawanie substratu zaangażowane są regiony C-terminalne „połówek” transporterów MFS, natomiast regiony N-terminalne odpowiadają za translokację protonów. Analiza filogenetyczna pozwoliła wyodrębnić w rodzinie MFS skupiającą kilkaset białek, dwie różne grupy ze względu na obecność 12 lub 14 segmentów transmembranowych (TMS - *Transmembrane Segments*) [166,167].



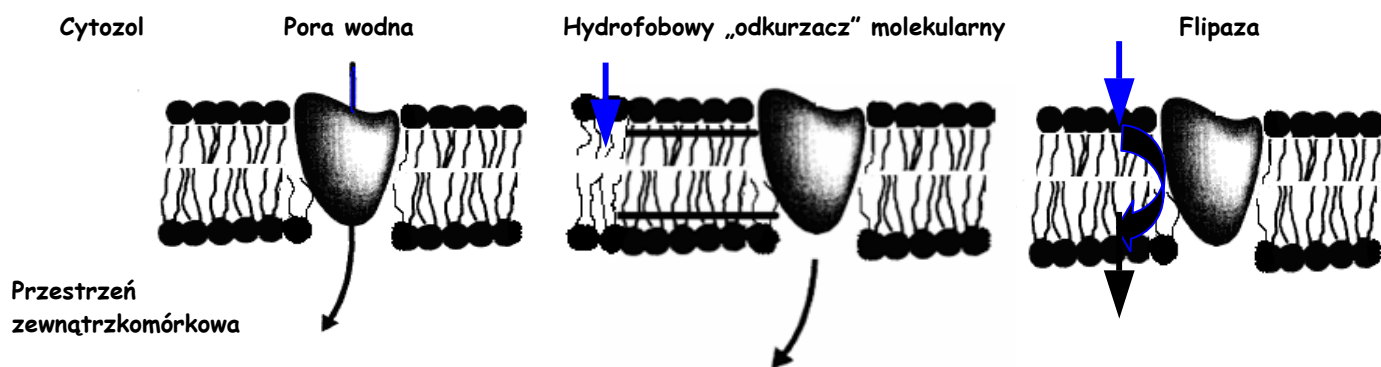
Rys. 10. Przypuszczalna topologia transportera MFS [5-7].

Biorąc pod uwagę typ aktywności, białka MFS klasyfikuje się na 5 klas zaangażowanych odpowiednio w: **a)** oporność lekową; **b)** transport cukrów; **c)** transport intermediatów cyklu Krebsa; **d)** antyport ufosforylowanych estrów (fosforan heksozy, fosfoglicerynian); **e)** import oligosacharydów [167].

W komórkach *Saccharomyces cerevisiae* zidentyfikowano 28 transporterów MFS, z których kilka wykazuje istotne znaczenie w oporności jak np. FLR1p

zaangażowany w oporność w stosunku do cykloheksimidu, flukonazolu, nadtlenu wodoru i związków kadmu. Z kolei w przypadku *Candida albicans* kluczową rolę przypisuje się CaMDR1p oraz FLU1p. Gen kodujący pierwsze z wymienionych białek, znany początkowo jako *BEN^r* został wyizolowany przez Flinga [168] oraz Prasada i współaut. [169]. Nadekspersja *CaMDR1* w komórkach *S. cerevisiae* prowadzi m. in. do oporności na benomyl, metotreksat, cykloheksimid [170,171]. Specyficznym substratem dla drugiego z transporterów pozostaje natomiast flukonazol oraz jak wykazano ostatnio również kwas mykofenolowy [172].

Mimo intensywnych badań nad funkcjonowaniem pomp wielolekowych ciągle istnieje szereg kontrowersji dotyczących mechanizmu, według którego białka błonowe transportują ksenobiotyki z wnętrza komórki do środowiska zewnętrznego. Zaproponowano kilka różnych modeli (Rys. 11).

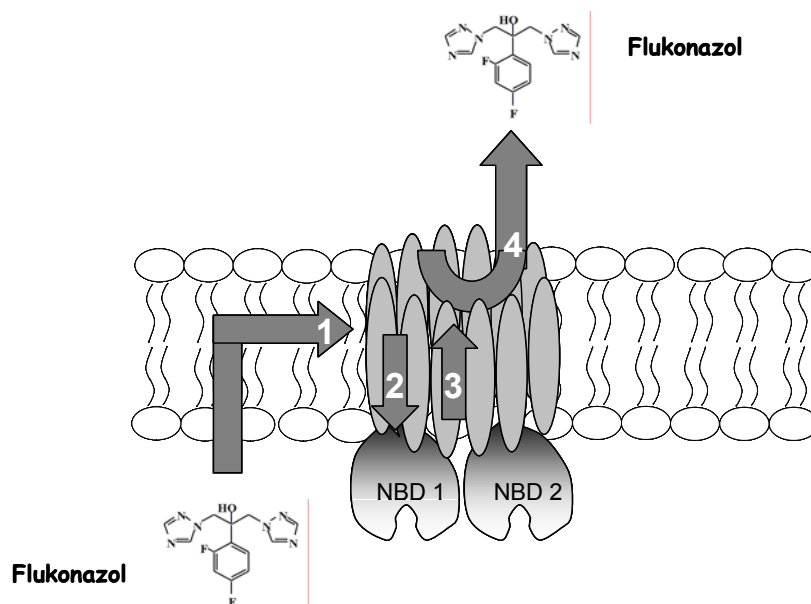


Rys. 11. Przypuszczalne mechanizmy transportu leków przez transportery błonowe [173].

Według konwencjonalnego modelu pory wodnej substrat jest wiązany od strony cytozolowej a następnie translokowany przez dwuwarstwę lipidową i uwalniany do zewnątrzkomórkowej fazy wodnej, po czym następuje reorientacja wolnych stron wiązania transportera. Model „odkurzacza molekularnego” zakłada z kolei, że hydrofobowe związki są „wysysane” z cytoplazmatycznej warstwy błony i usuwane na zewnątrz. Alternatywnie, transportery MDR mogą działać jako flipazy translokując leki w kierunku od wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony, skąd na drodze dyfuzji cząsteczki dostają się do środowiska zewnątrzkomórkowego [173].

W oparciu o obserwacje ludzkich transporterów MDR1/MRPs zaproponowano ostatnio przypuszczalną sekwencję etapów usuwania leków z komórek grzybowych za pośrednictwem transporterów błonowych [174], zilustrowaną na Rys. 12 na przykładzie

flukonazolu. Należy jednak podkreślić, że jest to jedynie hipoteza, której potwierdzenie wymaga dowodów eksperymentalnych.



Rys. 12. 1) oddziaływanie leku z miejscem wiązania (DBS; *Drug Binding Site*) zlokalizowanym w rejonie TMS (*Transmembrane Segments*); 2) związanie leku może stymulować hydrolizę ATP w obszarze NBD; 3) hydroliza ATP w NBDs inicjuje zmiany konformacyjne w TMDs (*Transmembrane Domains*); 4) reorganizacja prowadzi do uwolnienia i wyrzutu leku na zewnątrz komórki. Żaden z etapów (1-4) nie został dla związków azolowych udowodniony eksperymentalnie [174].

Generalnie przyjmuje się, iż klasyczny substrat transporterów grzybowych stanowią hydrofobowe związki o jednoznacznym ładunku elektrycznym penetrujące błonę komórkową głównie na drodze pasywnej dyfuzji [1]. Istotne znaczenie dla efektywności eksportu pomp błonowych może mieć również rozmiar usuwanego ksenobiotyku co stwierdzono w przypadku transportera Pdr5p [175]. Badania prowadzone nad funkcjonowaniem Cdr1p wykazały, że białko to ma zdolność do wyrzutu tak różnorodnych związków jak: inhibitor syntezy białek - cykloheksimid, lek przeciwnowotworowy - tamoxifen, jonoforowy peptyd - nigercyna, modyfikator MDR - trifluoperazyna, bloker kanałów wapniowych - verampamil [176] czy też ludzkie hormony sterydowe - β -estradiol i kortykosteron [177]. Spektrum substratowe pomp eksportujących jest zatem bardzo szerokie i obejmuje związki o zróżnicowanej strukturze i mechanizmie działania. Sugeruje się nawet możliwość posiadania przez transportery białkowe kilku miejsc wiążących zdolnych do rozpoznawania zupełnie niepodobnych do siebie związków. Ostatnio stwierdzono że w przypadku transportera

Pdr5p z *S. cerevisiae* można mówić o istnieniu co najmniej 3 takich miejsc, przy czym niektóre substraty mogą oddziaływać nawet z więcej niż jednym z nich [175].

W literaturze niewiele jest informacji na temat wpływu mutacji odpowiedzialnych za zjawisko oporności wielolekowej na działanie makrolidów polienowych. Wiadomo jedynie, iż większość szczepów MDR zachowuje wrażliwość na związki działające na poziomie błony komórkowej jak: amfoterycyna B [45] i zasadowe oligopeptydy [178]. Wyniki opublikowanych do tej pory badań sugerują, że mechanizm działania tego typu związków na wielolekooporne komórki grzybów zależy od struktury antybiotyku jak również typu wklonowanego genu kształtującego MDR [46,160,169,176].

Nystatyna będąca bliskim analogiem AmB jest wymieniana wśród wielu różnych związków (mikonazol, winblastyna, ludzkie hormony sterydowe) indukujących ekspresję *CDR1* w komórkach *C. albicans* [177]. Z kolei w przypadku szczepów *S. cerevisiae* transformacja genem *CDR1* prowadzi do przywrócenia oporności wrażliwych komórek w stosunku do wielu leków (azole, cykloheksimid, chloramfenikol) łącznie z nystatyną. Z drugiej strony na drodze komplementacji szczepu *S. cerevisiae* (JG436) z delecją *PDR5* (nadwrażliwość na cykloheksimid) uzyskano szereg transformantów, które jak stwierdzono eksperymentalnie wykazują zróżnicowany profil wielolekooporności. Generalnie ten typ transformacji prowadzi do oporności na chloramfenikol, cykloheksimid, mikonazol z równolegle obserwowaną nadwrażliwością w stosunku do oligomycyny, nystatyny i 2,4 dinitrofenolu [160]. Wykazano, że otrzymane transformanty w różnym stopniu reagują na działanie antybiotyków polienowych. Wśród szeregu mutantów testowanych w kierunku oporności krzyżowej na nystatynę, filipinę i AmB większość z nich zachowywała podobną wrażliwość jak szczep wyjściowy. W przypadku kilku transformantów zaobserwowano jednakże wzmocnioną wrażliwość na działanie filipiny i nystatyny, podczas gdy wrażliwość w stosunku do AmB pozostała niezmienną [160]. Sugeruje się, że zróżnicowane profile wielolekooporności mogą być wynikiem funkcjonowania alterantywnego mechanizmu oporności, który zakłada występowanie kilku różnych form (alleli) genów MDR/PDR odpowiedzialnych za zjawisko MDR [176]. W wyniku specyficznych mutacji w odpowiedzi na bodźce środowiskowe dochodzi do zmiany powinowactwa kodowanych przez nie transporterów w stosunku do substratów, co w konsekwencji prowadzi do obserwowanych zmian we wrażliwości mutantów MDR [160,168,179].

Ostatnio stwierdzono, że w komórkach transformanta szczepu AD1234568 wyposażonego w transporter białkowy Cdr1p nystatyna konkuruje o miejsce wiązania z IAAP (jodoaryloprazosyną) - analogiem substratu (prazosyny) ludzkiej P-glikoproteiny. Wiązanie to może być efektywnie blokowane przez modulator - disulfiram (Antabuse), co w efekcie prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia leku i zwiększa efektywność jego działania [180].

W świetle przedstawionych powyżej faktów można stwierdzić, iż dostępne w literaturze informacje odnośnie działania nystatyny w stosunku do szczepów wielolekoopornych nie są spójne. Dyskusyjna wydaje się kwestia zdolności transporterów Cdr1p do eksportu tego antybiotyku. Według jednych źródeł spektrum substratowe pomp Cdr1p obejmuje nystatynę, według innych natomiast antybiotyk ten nie jest wymieniany wśród substratów tego rodzaju transporterów błonowych.

Z kolei doniesienia na temat amfoterycyny B, podobnej pod względem strukturalnym do nystatyny, w aspekcie zjawiska MDR są ograniczone. Badania porównawcze prowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii nad działaniem AmB i jej niskotoksycznej pochodnej - MFAME na szczepy *S. cerevisiae* wrażliwy (JG436) oraz oporny (PS12-4) zawierający transporter Cdr1p wykazały, że testowane antybiotyki zachowują aktywność w stosunku do szczepów z wykształconą wielolekoopornością. Badane związki indukują w przypadku obu szczepów stymulację komórek (wzrost zdolności komórek traktowanych antybiotykiem do tworzenia kolonii), permeabilizację błony oraz efekt toksyczny [46]. Niemniej jednak molekularny mechanizm, według którego AmB oraz jej pochodna przezwyciężają zjawisko MDR nie został jak dotąd wyjaśniony. Racjonalne wytłumaczenie tego fenomenu wymaga rozważenia szeregu różnych możliwych hipotez. Należy w tym miejscu zwrócić uwagę na fakt, iż zarówno natywna, jak i chemicznie modyfikowana AmB, oprócz wiązania z błoną plazmatyczną wykazuje zdolność do penetracji do wnętrza komórki i internalizacji, co zostało potwierdzone eksperymentalnie w oparciu o fluorescencyjną metodę transferu energii [42,43]. W związku z tym zachowanie aktywności względem szczepów wielolekoopornych przez tego typu związki może być wynikiem tak różnorodnych efektów jak: a) inhibicja genów MDR na różnych etapach; b) inhibicja posttranslacyjnej modyfikacji białek transportowych; c) zakłócenie funkcjonowania domen wiążących ATP w pompach błonowych; d) nieodwracalna inaktywacja białek transportowych; e) brak właściwości substratowych dla pomp eksportujących.

3. Cel i zakres pracy

Zespół naukowy „Chemoterapii Molekularnej” Katedry Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej od wielu lat kontynuuje badania, które koncentrują się na poszukiwaniu nowych leków przeciwgrzybowych o korzystnych właściwościach farmakologicznych. W ramach tych badań prowadzone są prace nad projektowaniem i syntezą pochodnych amfoterycyny B zmierzające do otrzymania pochodnej pozbawionej głównych wad tego cennego antybiotyku tj. toksyczności i słabej rozpuszczalności w wodzie. Istotnym osiągnięciem w tym zakresie było otrzymanie pochodnych z zawadą przestrzenną zlokalizowaną w „polarnej głowie” cząsteczki AmB. Pochodne te zachowują aktywność przeciwgrzybową wyjściowego antybiotyku, a równocześnie wykazują obniżoną toksyczność w stosunku do komórek zwierzęcych. Mechanizm wysokiej selektywności działania tego typu związków nie został jak dotąd w pełni wyjaśniony.

Celem badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej jest bliższe poznanie czynników i mechanizmów, leżących u podstaw poprawy selektywnej toksyczności zawadzonych przestrzennie pochodnych AmB oraz ich aktywności względem opornych szczepów grzybowych (mutanty sterolowe oraz wielolekooporne). Włączenie do tych badań większej liczby związków (seria K) stwarza możliwość weryfikacji, omówionej w poprzednich rozdziałach rozprawy, hipotezy o istotności zawady przestrzennej w strukturze pochodnych AmB jako elementu odpowiedzialnego za wzrost selektywności działania tego typu związków. Zagadnienia te wymagają podjęcia wielokierunkowych badań, w których należy uwzględnić szereg aspektów zarówno o charakterze biologicznym jak i fizykochemicznym dotyczących działania tej klasy związków na poziomie molekularnym. Realizacja tych zadań badawczych może mieć istotne znaczenie dla racjonalnego projektowania dalszych syntez niskotoksycznych pochodnych AmB.

Do badań wyselekcjonowano związki o różnym stopniu selektywnej toksyczności. Należą do nich zarówno związki referencyjne (AmB, AMA, AMPA oraz MFAME) jak i nowe pochodne N- aminoacylowe.

Zakres realizowanych w ramach niniejszej pracy badań obejmuje następujące zagadnienia:

- 1) ogólna charakterystyka właściwości biologicznych wytypowanych związków:
 - i) oznaczenie aktywności przeciwgrzybowej (MIC) wobec szczepu standardowego *Candida albicans* ATCC 10261 jako modelu komórek patogennych zawierających ergosterol
 - ii) określenie aktywności permeabilizacyjnej i hemolitycznej w stosunku do krwinek czerwonych jako reprezentanta zawierających cholesterol komórek gospodarza (EK₅₀ i EH₅₀)
- 2) charakterystyka wrażliwości szczepów reprezentujących różne mechanizmy oporności tj. mutantów ergosterolowych *Candida albicans* posiadających defekt w szlaku biosyntezy ergosterolu (oporność specyficzna) oraz szczepów *Saccharomyces cerevisiae*, wyposażonych w pompy eksportujące typu ABC i MFS (oporność wielolekowa)
 - i) porównanie aktywności przeciwgrzybowej (MIC, MFC) oraz permeabilizacyjnej (wymiana H⁺/K⁺)
 - ii) oznaczenie powinowactwa AmB i pochodnych do błon opornych komórek grzybowych w oparciu o fluorescencyjną metodę transferu energii
 - iii) określenie stabilności wiązania AmB i pochodnych do błon mutantów MDR (z zastosowaniem sond molekularnych i spektrofotometrii)
 - iv) działanie AmB i wybranych pochodnych na komórki grzybowe znakowane rodaminą R6G, znanym substratem pomp MDR (metoda spektrofotometryczna)
- 3) podstawy selektywności działania badanych związków:
 - a) analiza składu roztworów wodnych AmB i wybranych pochodnych w oparciu o spektroskopię absorpcyjną UV-VIS
 - i) identyfikacja liczby i typów form spektralnych tworzonych przez badane związki w roztworach wodnych o różnym składzie z zastosowaniem zaawansowanych technik chemometrycznych (metoda głównych składowych - PCA, iteracyjna procedura samouzgodnienia - MCR-ALS)

- ii) określenie wpływu składu środowiska wodnego na proces agregacji (stężenie i rodzaj soli, wpływ pH)
 - iii) określenie wpływu modyfikacji chemicznych na przebieg procesu agregacji (wpływ zawady przestrzennej oraz stanu jonowego cząsteczki na stan antybiotyku w roztworze)
 - iv) ustalenie związku między formą antybiotyku w roztworze a toksycznością
- b)** określenie wydajności kanałów błonowych indukowanych przez różne formy zagregowane AmB i pochodnych w pęcherzykach zawierających ergosterol lub cholesterol (metoda fluorymetryczna oparta o przepuszczalność błony dla protonów).

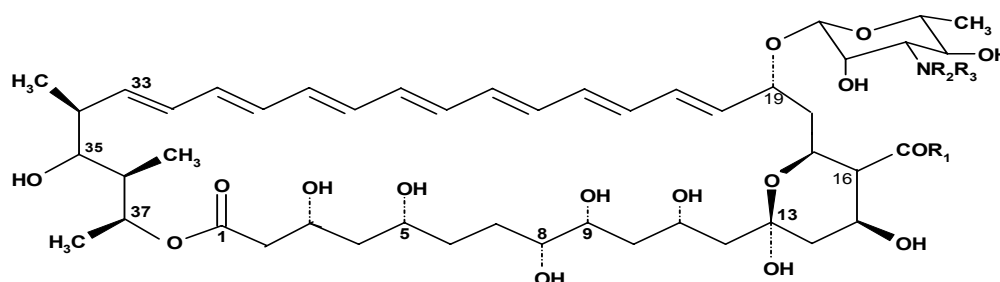
4. Część eksperymentalna

4.1. Materiały

4.1.1. Antybiotyki

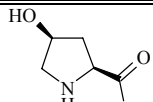
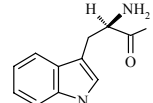
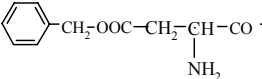
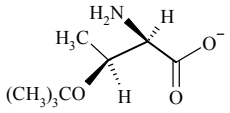
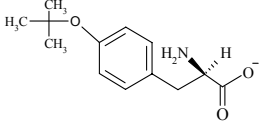
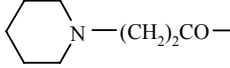
Struktury wytypowanych do badań związków zestawiono w Tab. 2.

Tabela 2. Struktura AmB i badanych pochodnych.



Lp.	Związek	Nazwa	R ₁	R ₂	R ₃
1	AmB	amfoterycyna B	-OH	-H	-H
2	AMA	amid 3- <i>N,N</i> -dimetyloamionopropylowy amfoterycyny B	-NH(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	-H	-H
3	AMPA	amid 4-metylopiperazynowy amfoterycyny B		-H	-H
4	MFAME	ester metylowy <i>N</i> -metylo- <i>N</i> -D-fruktopiranozylo amfoterycyny B	-OCH ₃	-CH ₃	
5	K ₆	<i>N</i> - <i>O</i> - <i>t</i> -butylotryozylo amfoterycyna B	-OH		-H
6	K ₉	<i>N</i> - <i>O</i> ^β - <i>t</i> -butyloaspartylo amfoterycyna B	-OH		-H
7	K ₁₀	<i>N</i> - <i>O</i> ^γ - <i>t</i> -butyloglutamylo amfoterycyna B	-OH		-H
8	K ₁₆	<i>N</i> - <i>O</i> - <i>t</i> -butyloserylo amfoterycyna B	-OH		-H
9	K ₁₇	<i>N</i> - <i>O</i> - <i>t</i> -butylo treonylo amfoterycyna B	-OH		-H
10	K ₁₉	D-prolilo amfoterycyna B	-OH		-H

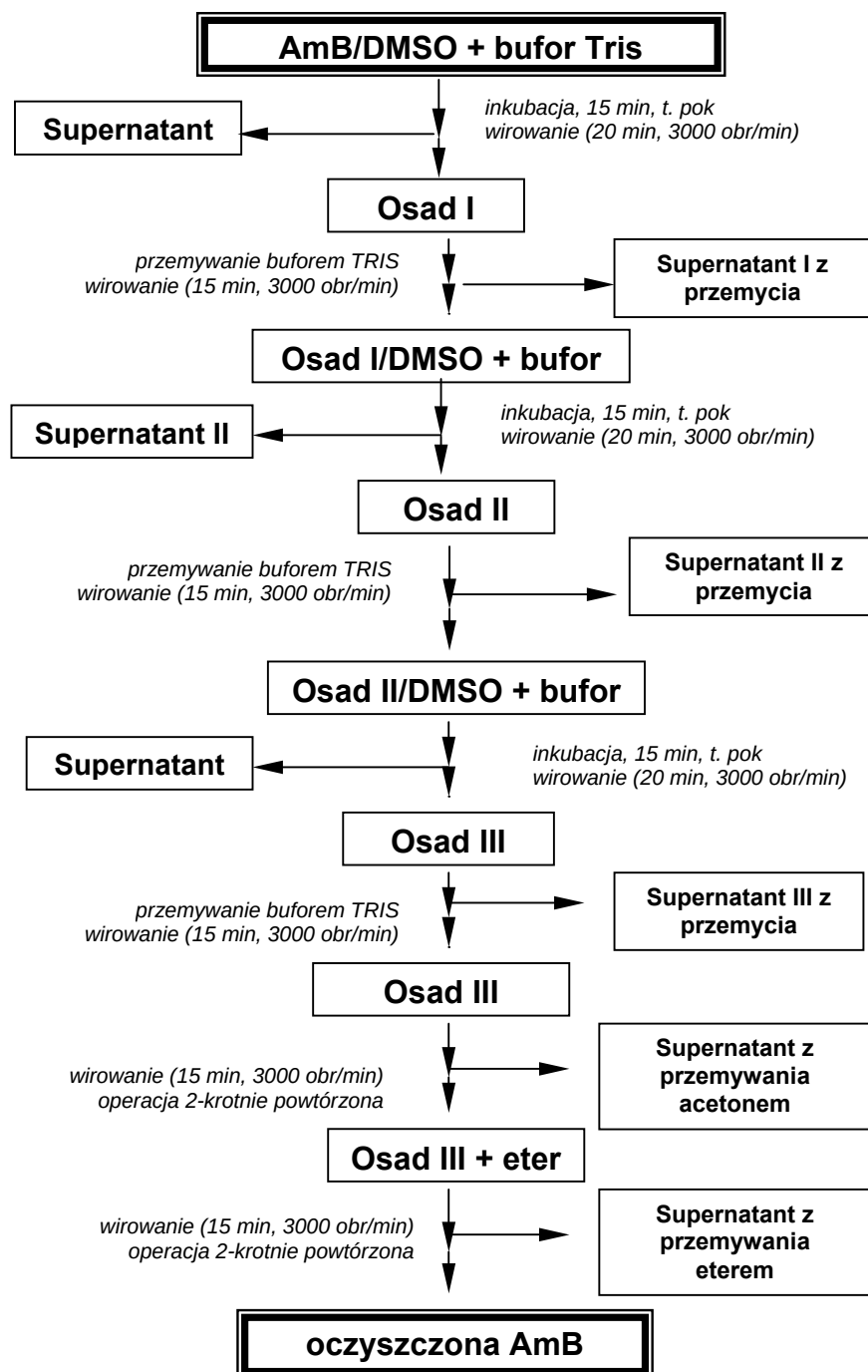
Tabela 2 c.d.

11	K ₂₀	4-hydroksy-prolilo amfoterycyna B	-OH		-H
12	K ₂₁	D-tryptofanylo amfoterycyna B	-OH		-H
13	K ₂₄	<i>N</i> -O ^β - benzyloaspartylo amfoterycyna B	-OH		-H
14	K ₃₄	<i>N</i> -O- <i>t</i> -butylo-D-treonylo amfoterycyna B	-OH		-H
15	K ₃₅	<i>N</i> -O- <i>t</i> -butylo-D-tyrozylo amfoterycyna B	-OH		-H
16	PAMB	<i>N</i> -1-piperydynopropionylo amfoterycyna B	-OH		-H

Amfoterycyna B pochodziła z firmy Sigma-Aldrich, natomiast badane pochodne zsyntezowano w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej [39,40,181]. AMA oraz MFAME stosowane były do badań w formie L-asparaginianów. Stężenia antybiotyków wyznaczano spektrofotometrycznie w oparciu o molowy współczynnik ekstynkcji ($\epsilon_{408} = 160\,000\text{ [M}^{-1}\text{ cm}^{-1}\text{]}$) antybiotyków w metanolu.

4.1.1.1. Oczyszczanie amfoterycyny B

Handlowy preparat amfoterycyny B (Sigma), który wykorzystywano w pomiarach spektrofotometrycznych, poddawano uprzedniemu oczyszczaniu celem odseparowania homologu AmB – amfoterycyny A (28,29-dihydro amfoterycyna B). Oczyszczanie prowadzono według opracowanej przez siebie metody, której schemat przedstawiono na Rys. 13.



Rys. 13. Schemat metody oczyszczania AmB.

Procedura oczyszczania

Antybiotyk rozpuszczono w 1,2 ml DMSO w stężeniu 20 mg/ml, dodano powoli do 120 ml buforu Tris, o pH = 6,80 i inkubowano przez 15 min w temp. pok. Następnie próbkę poddawano wirowaniu (20 min, 3000 obr/min), a osad jednokrotnie przemywano 45 ml buforu Tris. Po ponownym odwirowaniu (15 min, 3000 obr/min), osad rozpuszczano bardzo starannie mieszając w niewielkiej ilości DMSO (1,5 ml), po czym powoli dodano do 60 ml buforu Tris. Po 15 min inkubacji w temp. pokojowej próbkę odwirowywano (20 min, 3000 obr/min). Otrzymany osad ponownie rozpuszczono w ok. 1 ml DMSO i powtarzano ciąg operacji wytrącania i ponownego przemywania buforem. W celu przyspieszenia suszenia w końcowych etapach osad traktowano 25 ml acetonu, a po odwirowaniu (15 min, 3000 obr/min) tą samą czynność powtórzono z eterem dietylowym. Otrzymany produkt suszono w eksykatorze próżniowym. Czystość AmB oceniano na podstawie charakterystycznych widm absorpcyjnych. W celu oceny efektywności opracowanej metody oczyszczania AmB wykonano również widma UV-VIS supernatantów zebranych na poszczególnych etapach.

4.1.1.2. Badane pochodne

Wszystkie badane pochodne pochodzą z Katedry Technologii Leków i Biochemii. Amid 3 – dimetyloaminopropylowy amfoterycyny B (AMA) otrzymany został według procedury opisanej przez Falkowskiego [181]. Amid 4-metylopiperazynowy amfoterycyny B (AMPA) zsyntetyzowano z AmB oraz odpowiedniej aminy w oparciu o metodę wykorzystującą DPPA, której szczegóły podano w opracowaniu Falkowski i współaut. [181] oraz Bolard i współaut. [182]. Ester metylowy *N*-metylo-*N*-D-fruktopyranozylo amfoterycyny B (MFAME) otrzymywano według procedury opracowanej przez Grzybowską i współaut. [39] wychodząc z *N*-D-fruktopyranozylo amfoterycyny B formowanej w reakcji AmB i D-glukozy z równoczesnym przegrupowaniem Amadori'ego.

Pochodne z serii K otrzymywano na drodze acylowania AmB w rozpuszczalnikach organicznych lub ich mieszaninie aminokwasami z aktywowaną grupą karboksylową, korzystnie w postaci estrów aktywnych bądź Fmoc-chronionych aminokwasów z grupą aminową pierwszo- lub drugorzędową. Grupę ochronną usuwano przy pomocy 1,5-diazobicyklo[4.3.0.]non-5-enu (DBN) a surowy produkt wydzielano na drodze wytrącenia eterem etylowym i oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym [40]. Wszystkie badane pochodne AmB nie zawierają amfoterycyny

A. Zanieczyszczenie tym homologiem AmB zostaje efektywnie wyeliminowane w toku syntezy i izolacji końcowych produktów.

4.1.2. Pożywki:

agar, bacto-pepton, YNB, AM3 pochodziły z firmy Difco, glukoza z koncernu Polfa-Kraków, mieszanina aminokwasów (Yeast Synthetic Dropout Medium Supplement Without Uracil) z firmy Sigma-Aldrich.

4.1.3. Odczynniki:

DMSO, FCCP, Walinomycyna, EPC, sterole, surowica ludzka, albumina surowicy ludzkiej (HSA), sondy fluorescencyjne: TMA-DPH i R6G pochodziły z firmy Sigma, natomiast pyranina zakupiona została w firmie Molecular Probes. Stosowane sole nieorganiczne oraz rozpuszczalniki były produktami firmy Polskie Odczynniki Chemiczne i charakteryzowały się stopieniem czystości cz.d.a.

4.1.4. Badane komórki

Badania prowadzono na dwóch typach komórek:

- *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, jako modele komórek patogennych zawierających ergosterol
- ludzkie erytrocyty, jako reprezentant zawierających cholesterol komórek gospodarza.

Szczegółowe zestawienie wszystkich stosowanych w badaniach szczepów grzybowych, łącznie z krótką ich charakterystyką oraz odpowiednimi odnośnikami literaturowymi zestawiono w Tabeli 3.

Standardowy szczep *Candida albicans* ATCC 10261 stosowany w badaniach pochodził z kolekcji Katedry Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej. Mutanty ergosterolowe *Candida albicans* oraz transformaty szczepów JG436 i AD *Saccharomyces cerevisiae* otrzymano od prof. R. Prasada, School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University, New Delhi, India. Szczep *S. cerevisiae* JG436 został z kolei udostępniony do badań przez prof. J. Golin z Catholic University of America, Washington, a szczep AD1234568 pochodził z kolekcji prof. A. Goffeau z Université Catholique de Louvain, Belgium. Natomiast szczepy kliniczne *C. albicans* zostały podarowane KTLiB przez profesora J. Morschhäusera z Uniwersytetu w Würzburgu w Niemczech.

Krwinki czerwone izolowano z krwi ludzkiej, udostępnionej przez Wojewódzką Stację Krwiodawstwa w Gdańsku.

Tabela 3. Charakterystyka badanych szczepów grzybowych.

Szczep	Charakterystyka	Odnosićnik literaturowy
<i>C. albicans</i> ATCC 44829	adenino-zależny szczep produkujący ergosterol 33 ERG ⁺ , <i>ade</i> ⁻	[149-151,183]
<i>C. albicans</i> ATCC 44830	mutant ergosterolowy; <i>erg16</i> , <i>ade</i> ⁻ ; z defektem genu kodującego 5,6-dehydrogenazę sterolową	[149-151,183]
<i>C. albicans</i> ATCC 44831	mutant ergosterolowy; <i>erg2</i> , <i>ade</i> ⁻ ; z defektem genu kodującego $\Delta^8 \Delta^7$ – izomerazę sterolową	[149-151,183]
<i>C. albicans</i> Gu4	izolat kliniczny wrażliwy na działanie flukonazolu	[184]
<i>C. albicans</i> Gu5	izolat kliniczny oporny na działanie flukonazolu poprzez nadprodukcję <i>CDR1</i> i <i>CDR2</i>	[184]
<i>S. cerevisiae</i> JG436	Mata, <i>pdr5::Tn5</i> , <i>leu2</i> , <i>met5</i> , <i>ura3-52</i> , <i>mak71</i> , <i>KRB1</i>	[185]
<i>S. cerevisiae</i> JGCaMDR1	JG436 transformowany genem <i>CaMDR1</i>	[186]
<i>S. cerevisiae</i> AD1234568	Mata, <i>pdr1-3</i> , <i>his</i> , <i>ura3</i> , <i>pdr5Δ</i> , <i>snq2Δ</i> , <i>pdr10Δ</i> , <i>pdr11Δ</i> , <i>pdr15Δ</i> , <i>yor1Δ</i> , <i>ycf1Δ</i>	[158]
<i>S. cerevisiae</i> ADCDR2	AD 1234568 transformowany genem <i>CaCDR2</i>	[163]
<i>S. cerevisiae</i> ADCaMDR1	AD 1234568 transformowany genem <i>CaMDR1</i>	[186]
<i>S. cerevisiae</i> ADNC-36	AD 1234568 transformowany genem <i>CaALK8</i>	[187]

4.2. Aktywność w stosunku do komórek grzybowych

4.2.1. Przechowywanie i namnażanie szczepów

Szczepy grzybowe przechowywano i namnażano w podłożach o następującym składzie:

1. *Candida albicans* (C.a.) , *erg-2* i *erg-16* :

- wzrostowe: stałe - bacto-pepton 1%; glukoza 2%; yeast extrat 1%; agar 2 % oraz płynne - bacto-pepton 1%; glukoza 2%; yeast extrat 1% (YEPG)
- do oznaczania aktywności : bacto-pepton 1%; glukoza 2%; NaCl 0,5%.

2. *Saccharomyces cerevisiae*:

1) AD1234568, JG436 :

- wzrostowe: stałe – glukoza 2%; YNB 0,17%; siarczan amonu 0,5%; uracyl 0,003 %; mieszanina aminokwasów (Yeast Synthetic Dropout Medium Supplement Without Uracil; 1,92 g/l); agar 2% oraz płynne o identycznym składzie z pominięciem agaru
- do oznaczania aktywności: glukoza 2%; YNB 0,17%; siarczan amonu 0,5%; uracyl 0,003 %; mieszanina aminokwasów (Yeast Synthetic Dropout Medium Supplement Without Uracil; 1,92 g/l), NaCl 0,5 %

b) ADCaMDR1; ADCDR2; ADNC-36; JGCaMDR1

- wzrostowe stałe – glukoza 2%; YNB 0,17%; siarczan amonu 0,5%; mieszanina aminokwasów (Yeast Synthetic Dropout Medium Supplement Without Uracil; 1,92 g/l); agar 2 % oraz płynne o identycznym składzie z pominięciem agaru
- do oznaczania aktywności: glukoza 2%; YNB 0,17%; siarczan amonu 0,5%; uracyl 0,003 %; mieszanina aminokwasów (Yeast Synthetic Dropout Medium Supplement Without Uracil; 1,92 g/l); NaCl 0,5 %

3. *Candida albicans* Gu4 i Gu5:

- wzrostowe: stałe - bacto-pepton 1%; glukoza 2%; yeast extrat 1%; agar 2 % oraz płynne - bacto-pepton 1%; glukoza 2%; yeast extrat 1% (YEPG)
- do oznaczania aktywności : Antibiotic Medium 3 (AM3); glukoza 2%.

4.2.2. Oznaczanie aktywności grzybostatycznej (MIC) i grzybobójczej (MFC)

4.2.2.1. Metoda klasyczna

MIC oznaczano metodą seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym. Komórki grzybowe z 24 – godzinnej hodowli w temp. 30 °C zawieszano w podłożu płynnym w stężeniu 10^6 kom/ml (gęstość optyczna zawiesiny $OD_{660} \sim 0,1$) i rozcieńczano 10- krotnie. Zawiesinę dzielono na 2 ml porcje. Antybiotyk rozpuszczano w DMSO bezpośrednio przed doświadczeniem i przygotowywano seryjne rozcieńczenia o stężeniach 100 – krotnie wyższych od badanych stężeń końcowych. Do 2 ml zawiesiny

dodawano po 20 μ l roztworu antybiotyku o odpowiednim stężeniu, natomiast do zawiesiny kontrolnej 20 μ l DMSO. Po 48 godzinach inkubacji komórek z antybiotykiem w 30 °C mierzono gęstość optyczną poszczególnych zawiesin przy 660 nm. Jako MIC przyjmowano najniższe stężenie antybiotyku hamujące wzrost w podłożu płynnym w stopniu $\geq 90\%$ w porównaniu do kontroli wzrostu komórek. W celu wyznaczenia MFC pobierano 20 μ l zawiesiny komórek z próbek, w których po 48 godzinach inkubacji z antybiotykiem nie stwierdzono wzrostu i zaszczipiano w 2 ml świeżego podłoża płynnego. Najniższe stężenie, dla którego nie obserwowano wzrostu komórek po 48 godzinach inkubacji w 30°C uznawano za MFC.

4.2.2.2. Oznaczanie aktywności grzybostatycznej (MIC) wg procedury zalecanej przez NCCLS [188]

MIC oznaczano metodą seryjnych rozcieńczeń w 96 – studzienkowych mikropłytkach (Medlab), w podłożu AM3 wzbogaconym o dodatek 2% glukozy. Komórki grzybowe z 24 – godzinnej hodowli w temp. 30 °C zawieszano w podłożu płynnym w stężeniu 10^6 kom/ml (gęstość optyczna zawiesiny $OD_{660} \sim 0,1$) i rozcieńczano w stosunku 1:50, aby uzyskać 2×10^4 komórek na ml. Tak przygotowane inoculum dodawano w objętości 100 μ l do każdej ze studzienek zawierającej po 100 μ l podłoża z dodatkiem antybiotyków o odpowiednich stężeniach (końcowe stężenie antybiotyku zawarte w zakresie 0,00788 – 4 μ g/ml). W przypadku każdego z oznaczeń uwzględniono kontrolę pożywki (bez dodatku komórek) oraz kontrolę wzrostu komórek. Inkubację komórek z antybiotykiem prowadzono przez 24 h w temp. 30°C. Gęstość optyczną poszczególnych zawiesin mierzono dla długości fali $\lambda = 620$ nm za pomocą czytnika mikropłytek (Labsystem, Multiscan Bichromatic). Jako MIC w odczycie automatycznym przyjmowano najniższe stężenie antybiotyku powodujące zahamowanie wzrostu w podłożu płynnym w stopniu $\geq 90\%$ w porównaniu do kontroli wzrostu komórek [189,190].

4.2.3. Oznaczanie aktywności permeabilizacyjnej

4.2.3.1. Monitorowanie ruchu protonów (Δ pH)

Komórki grzybowe z wczesnej fazy stacjonarnej (hodowla 18-godzinna w podłożu płynnym, 30 °C) odwirowywano (10 min, 3000 obr/min), trzykrotnie przemywano wodą destylowaną dejonizowaną i zawieszano w wodzie do uzyskania

stężenia komórek 2 mg suchej masy /ml (1 ml zawiesiny o gęstości optycznej $OD_{660} \sim 1$ zawiera 0,5 mg suchej masy).

Zmiany pH zawiesiny śledzono przy użyciu pH-metru (CPI-551, Elmetron). Z uwagi na labilność pH niebuforowanej zawiesiny drożdży wyjściowe pH ustalano przez dodatek odpowiedniej ilości 0,01 M HCl. Po 15 min stabilizacji rejestrowano zmiany pH zawiesiny w czasie indukowane działaniem antybiotyku o stężeniu 2 μ M. Po upływie 20 min zwiększano stężenie antybiotyku do 10 μ M i kontynuowano rejestrację pH. Wyniki zilustrowano w postaci zależności $\Delta pH = f(t)$.

4.2.3.2. Wpływ potasu z komórek

18-godzinną hodowlę komórek grzybowych w podłożu płynnym odwirowywano (10 min, 3000 obr/min), przemywano trzykrotnie roztworem soli fizjologicznej i zawieszano w soli fizjologicznej do uzyskania stężenia komórek 2 mg suchej masy/ml. Antybiotyki rozpuszczano w DMSO, a następnie sporządzano roztwory zawierające antybiotyk w stężeniu 100-krotnie wyższym od stężenia końcowego w zawieszynie. Pomiar ilości jonów potasu uwalnianych do środowiska w wyniku działania antybiotyku prowadzono przy zastosowaniu pH-jonometru (CPI-501, Elmetron). Jonoselektywną elektrodę potasową wprowadzano do zawiesiny komórek, po 10-15 min stabilizacji dodawano antybiotyk o odpowiednim stężeniu i rejestrowano kinetykę wypływu potasu. Na wykresach przedstawiono wypływ potasu w funkcji czasu. Ilość uwolnionego potasu wyrażano w procentach, przyjmując jako 100% ilość potasu uwolnionego z komórek kontrolnych ogrzewanych przez 10 min w temp. 100 °C.

4.2.3.3. Kinetyka wymiany H^+/K^+

Przeprowadzono równoczesny pomiar ruchu H^+/K^+ w zawieszynie komórek (hodowla 18-godzinna w podłożu płynnym, 30 °C). Komórki grzybowe z 18-godzinnej hodowli w podłożu płynnym, po odwirowaniu (10 min, 3000 obr/min), trzykrotnym przemyciu wodą destylowaną dejonizowaną zawieszano w wodzie do uzyskania stężenia komórek odpowiadającego 2 mg suchej masy/ml. Następnie do zawiesiny komórek wprowadzano elektrodę mierzącą pH oraz jonoselektywną elektrodę potasową; po 15 min stabilizacji dodawano antybiotyk (stężenie końcowe w zawieszynie 10 μ M) i

rejestrowano jednocześnie kinetykę zmian pH oraz wypływu potasu. Wyniki zilustrowano w postaci zależności ($\% \Delta \text{pH}_c$; $\% \Delta \text{K}^+ = f(t)$), gdzie:

- $\% \Delta \text{pH}_c$ wyznaczano w stosunku do całkowitej zmiany pH obserwowanej dla danego szczepu w wyniku działania antybiotyku
- $\% \Delta \text{K}^+$, czyli ilość jonów potasu uwalnianych do środowiska, obliczono przyjmując jako 100% ilość potasu uwolnionego z komórek kontrolnych ogrzewanych przez 10 min w temp. 100 °C.

4.2.4. Oznaczenie powinowactwa do błon komórek grzybowych

Oznaczenie powinowactwa AmB i pochodnych do błon komórek grzybowych przeprowadzono dla dwóch grup szczepów reprezentujących różne mechanizmy oporności tj. mutanty ergosterolowe *Candida albicans* (erg-2, erg-16) oraz mutanty wielolekooporne *Saccharomyces cerevisiae* (ADCaMDR1, ADCDR2).

4.2.4.1. Określenie stopnia wiązania z komórkami grzybów fluorescencyjną metodą transferu energii

Roztwór wyjściowy sondy fluorescencyjnej TMA-DPH sporządzano w DMSO w stężeniu 2 mM. Antybiotyki rozpuszczano również w DMSO, przygotowując roztwory zawierające antybiotyk w stężeniu 100-krotnie wyższym od stężenia końcowego w zawiesinie. Komórki grzybowe z 18-godzinnej hodowli w podłożu płynnym, po odwirowaniu (10 min, 3000 obr/min) i trzykrotnym przemyciu zawieszano w soli fizjologicznej w przypadku mutantów ergosterolowych oraz w 0,1 M KCl dla mutantów MDR *S. cerevisiae* do uzyskania stężenia 10^6 kom/ml (gęstość optyczna zawiesiny $\text{OD}_{660} \sim 0,1$). Wybór odpowiedniego medium podyktowany został zachowaniem żywotności komórek w warunkach oznaczenia (metodyka oznaczenia punkt 4.2.4.2.). Pomiar fluorymetryczny na spektrometrze luminescencyjnym Perkin-Elmer LS-55 prowadzono w temp. 37 °C z mieszaniem. Do 2 ml zawiesiny komórek dodawano 2 μl roztworu TMA-DPH (stężenie końcowe sondy 2 μM), a następnie po około 5 min (stabilizacja poziomu fluorescencji) dodawano 2 μl roztworu antybiotyku i rejestrowano zmiany intensywności fluorescencji w czasie. Długości fal wzbudzenia i emisji wynosiły odpowiednio 427 nm i 365 nm, a szerokość stosowanych szczelin 2,5 i 5 nm. Dla tych długości fal mierzono wartość absorpcji w zawiesinach komórkowych,

odpowiednio przed i po dodaniu antybiotyku. Pomiar spektrofotometryczny prowadzono z zastosowaniem spektrofotometru UV-Vis Beckman Model 3600.

Wydajność transferu energii E , między sondą inkorporowaną do błony a polienami wyznaczano według poniższego wzoru [191]:

$$E = 1 - (F/F_0), \quad F = F' \times 10^{(A1+A2)/2}$$

F - intensywność fluorescencji po dodaniu antybiotyku do zawiesiny komórek

F_0 - intensywność fluorescencji przed dodaniem antybiotyku do zawiesiny komórek

$F' = F$ - wartość fluorescencji po dodaniu antybiotyku skorygowana ze względu na absorpcję

$A1, A2$ -absorpcja polieny przy długości fali 365 nm (wzbudzenie) i 427 nm (emisja)

4.2.4.2. Oznaczenie zdolności komórek grzybowych do tworzenia kolonii (c.f.u.)

Żywotność komórek grzybowych w warunkach pomiarów spektrofluorymetrycznych badano w oparciu o zdolność do tworzenia kolonii (c.f.u.). Zawiesiny komórek po 30 min inkubacji w 37 °C z sondą fluorescencyjną i antybiotykiem o żądanym stężeniu, rozcieńczano 10, 100, 1000 – krotnie i wysiewano na podłoże agarowe (skład wg pkt 4.2.1) wzbogacone w zależności od szczepu odpowiednio w 0,9% NaCl lub 0,1 M KCl. Ilość utworzonych kolonii komórek grzybowych liczono po 72 godz (mutanty ergosterolowe) i 96 godz. (mutanty MDR *S. cerevisiae*) inkubacji w 37 °C. Porównywano liczbę kolonii z zawiesiny komórek kontrolnych (100%) i poddanych działaniu antybiotyku. Zdolność do tworzenia kolonii (c.f.u.) wyrażano w % kontroli.

4.2.5. Określenie stabilności wiązania do błon komórek grzybów wielolekoopornych

Oznaczenie przeprowadzono dla standardowego szczepu *Saccharomyces cerevisiae* **AD1234568** oraz mutantów **ADCaMDR1** i **ADCDR2** wyposażonych w białkowe pompy eksportujące odpowiednio typu MFS i ABC. Pomiar wykonano w 2 wariantach:

1) zawiesinę komórek w środowisku 0,1 M KCl preinkubowano 20 min w 37°C z sondą TMA-DPH (stężenie końcowe 2 μM), po czym komórki odwirowywano (5min, 3000 obr/min), zawieszano w świeżym medium, następnie po około 5 min stabilizacji

poziomu fluorescencji dodawano do zawiesiny antybiotyk, a po 15 min dodawano glukozę (stężenie końcowe w zawieszynie 50 mM) i rejestrowano zmiany intensywności fluorescencji w czasie

2) zawiesinę komórek w 0,1 M KCl preinkubowano 20 min w 37°C z antybiotykiem oraz sondą TMA-DPH (stężenie końcowe 2 μ M), po czym komórki odwirowywano (5 min, 3000 obr/min), zawieszano w świeżym medium i rejestrowano zmiany intensywności fluorescencji w czasie w warunkach a) braku źródła energii b) obecności glukozy (stężenie końcowe w zawieszynie 50 mM).

4.2.6. Określenie wpływu AmB i wybranych pochodnych na komórki grzybów wielolekoopornych znakowanych rodaminą 6G

Badania transportu rodaminy R6G „do” i „z” komórek wielolekoopornych szczepów *S. cerevisiae* wykonano wg procedury opisanej przez Maesaki i współaut. [192] z kilkoma modyfikacjami. Komórki grzybowe z 14 – godzinnej hodowli zawieszano w świeżym podłożu płynnym (YNBG) w stężeniu 10^8 kom/ml (gęstość optyczna zawiesiny $OD_{660} \sim 1$) i inkubowano w temp. 30 °C przez 4 h. Odświeżone komórki odwirowywano (5 min, 5000 obr/min) i trzykrotnie przemywano wodą destylowaną. Następnie komórki zawieszano w 0,1 M KCl do uzyskania stężenia 10^8 kom/ml i inkubowano 1 h z wytrząsaniem (150 rpm) w temp. 30 °C. Roztwór wyjściowy R6G sporządzano w DMSO w stężeniu 10 mM. Zawiesinę komórek z barwnikiem (stężenie końcowe 10 μ M) inkubowano przez 10 min (do momentu osiągnięcia stabilnego poziomu akumulacji R6G w komórkach) w ciemności w temp. 30°C. Komórki znakowane R6G szybko odwirowywano (3 min, 9000 obr/min), jednokrotnie przemywano i zawieszano w 0,1 M KCl. W eksperymencie mającym na celu określenie wpływu AmB oraz pochodnych na proces eksportu R6G z komórek grzybowych do zawiesiny tak przygotowanych komórek dodawano rozpuszczony w DMSO antybiotyk (stężenie końcowe w zawieszynie 2 μ M) i preinkubowano 10 min. Próbkki kontrolne traktowano odpowiednią ilością DMSO zamiast antybiotykiem. Pomiary prowadzono w warunkach obecności i braku źródła energii (glukoza). W czasie $t = 0$ tj. bezpośrednio po dodaniu glukozy pobierano z obu porcji zawiesiny („z” i „bez” glukozy) podwójne 2 ml próbki i odwirowywano (3 min, 9000 obr/min). Absorbancję supernatantów zebranych z poszczególnych próbek mierzono przy długości fali 527 nm z zastosowaniem spektrofotometru UV-VIS Perkin Elmer, λ 45. Po 10, 20, 40 oraz 50 min dalszej inkubacji pobierano kolejne próbki, odwirowywano i

dokonywano pomiarów spektrofotometrycznych. Jako odnośnik stosowano 0,1 M KCl oraz supernatant z komórek kontrolnych. Stężenie R6G eksportowanej z komórek grzybowych wyznaczano w oparciu o krzywą wzorcową sporządzoną przez miareczkowanie roztworu 0,1 M KCl.

4.3. Oznaczanie aktywności w stosunku do krwinek czerwonych

4.3.1. Oznaczanie aktywności permeabilizacyjnej i hemolitycznej

Krew rozcieńczano roztworem soli fizjologicznej i odwirowywano w temp. 4°C, 10 min, 3000 obr/min. Supernatant i warstwę białych krwinek usuwano, a krwinki czerwone przemywano dwukrotnie zimnym roztworem soli fizjologicznej.

Antybiotyki rozpuszczano w DMSO, a następnie sporządzano roztwory zawierające antybiotyk w stężeniu 100 krotnie wyższym od stężenia końcowego w zawiesinie. Odpowiednie ilości roztworów antybiotyku dodawano do soli fizjologicznej, po czym dodawano gęstą zawiesinę krwinek w proporcjach 1:25 (końcowe stężenie komórek wynosiło 10^8 komórek /ml). Po inkubacji w łaźni wodnej przez 30 min, w temp. 25°C do zawiesiny wprowadzano jonoselektywną elektrodę potasową podłączoną do woltomierza i mierzono stężenie jonów potasu. Ilość uwolnionego potasu wyrażano w % przyjmując jako 100% stężenie jonów potasu w hemolizacie otrzymanym przez zawieszenie krwinek w wodzie w stosunku 1:25. Równolegle z wpływem potasu oznaczano ilość uwalnianej hemoglobiny w każdej z badanych próbek. W tym celu odwirowywano 1 ml zawiesiny przez 4 min, 3000 obr/min. Następnie mierzono gęstość optyczną supernatantu rozcieńczonego 10 - krotnie solą fizjologiczną przy długości fali 540 nm. Hemolizę wyrażano w % w stosunku do całkowicie zlizowanej próbki.

4.4. Aktywność względem dużych pęcherzyków lipidowych (REV)

4.4.1. Otrzymywanie dużych jednowarstwowych pęcherzyków lipidowych (REV)

Duże jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe (REV) o składzie EPC: cholesterol (80:20); EPC: ergosterol (90:10) otrzymywano metodą odparowywania w fazach odwróconych według Szoki i Paphadjopoulou [193]. EPC stosowano bez uprzedniego oczyszczania,

natomiast ergosterol i cholesterol poddawano przed użyciem dwukrotnej krystalizacji z etanolu.

Sterole rozpuszczano w chloroformie w stężeniu 100 mM. Odpowiednie ilości tak przygotowanych roztworów lipidów mieszano w kolbce okrągłodennej o pojemności 50 ml, a następnie odparowywano chloroform pod zmniejszonym ciśnieniem w atmosferze argonu. Utworzoną warstwę lipidową rozpuszczano w 6 ml eteru dietylowego [stężenie lipidów (EPC+sterol) 20 μ mol], poczym dodawano 2 ml buforu potasowego (100 mM K_2SO_4 , 20 mM KH_2PO_4 ; pH = 7,1) zawierającego 20 mM pyraninę. Otrzymaną w ten sposób dwufazową mieszaninę sonifikowano 5 min (Sonifikator typ: Soniprep 150, Sanyo) do momentu uzyskania trwałej emulsji (3 min). Następnie usuwano fazę organiczną przez powolne odparowywanie pod zmniejszonym ciśnieniem w atmosferze argonu, w temp. pokojowej. W trakcie odparowywania zachodzą charakterystyczne zmiany właściwości reologicznych zawartości kolbki związane ze zmianami organizacji lipidów. Początkowo formowany jest lepki żel, który w ciągu 10-15 min zaczyna ulegać rozpadowi przechodząc w postać wodnej zawiesiny, w której zawieszone są fragmenty żelu i pojedyncze pęcherzyki. Całkowity rozpad fazy żelowej oznacza przejście do ostatniego etapu procedury - sezonowania. Podczas kilkunastu minut utrzymywania zawiesiny pęcherzyków w temperaturze wyższej od temperatury tranzykcji i pod obniżonym ciśnieniem dochodzi do usunięcia resztek rozpuszczalnika i ostatecznego uformowania się pęcherzyków.

Z uwagi na dużą niejednorodność rozmiarów otrzymywanych w ten sposób pęcherzyków w dalszej kolejności zawiesinę poddawano homogenizacji na drodze przetłaczania (ekstrudcji) przez poliwęglanowe filtry membranowe (Nucleopore Corp., Pleasanton) o średnicy porów 0,8 μ m. W ostatnim etapie procedury w celu oddzielenia pęcherzyków z zamkniętą w nich pyraniną od tej części, która nie uległa zamknięciu stosowano natomiast filtrację żelową na kolumnie PD10 Sephadex G-25.

4.4.2. Oznaczanie stężenia fosfolipidów

Stężenie fosfolipidów w dużych jednowarstwowych pęcherzykach lipidowych (REV) oznaczano według kolorymetrycznej metody Stewarda [194] opartej na formowaniu kompleksu pomiędzy cyjanożelazianem amonowym a EPC.

W pierwszej kolejności sporządzano wyjściowe roztwory chloroformowe EPC o stężeniu 1 i 10 nmol/ μ l, po czym odpowiednie ilości tak przygotowanych roztworów

dodawano do 3 ml chloroformu, by uzyskać stężenie końcowe EPC w zakresie od 10 do 120 nmol/ μ l. Do każdej z próbek dodawano po 3 ml roztworu koloranta o składzie: 27,03 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 30,4 g NH_4SCN na 1 l H_2O . Cyjanożelazian amonowy nie rozpuszcza się w chloroformie, ale jego kompleks z EPC jest łatwo rozpuszczalny i w momencie zmieszania ulega rozdziałowi w fazie chloroformowej. Powstały dwufazowy układ początkowo intensywnie wytrząsano ręcznie przez 2 min, a następnie poddawano wirowaniu (20 min, 3000 obr/min; temp. pok.). Z każdej z badanych próbek pobierano za pomocą pipety Pasteura dolną warstwę chloroformową i dokonywano pomiaru gęstości optycznej dla długości fali 488 nm. W razie konieczności przeprowadzano klarowanie pobranego materiału poprzez dodatek szczypty bezwodnego siarczanu sodu. W oparciu o uzyskane wyniki wykreślano krzywą wzorcową dla kompleksu EPC:kolorant, na podstawie której wyznaczano dokładne stężenie fosfolipidów w próbkach pęcherzyków traktowanych w sposób opisany powyżej.

4.4.3. Oznaczanie aktywności permeabilizacyjnej względem dużych pęcherzyków lipidowych (REV) metodą fluorymetryczną

W celu oceny zdolności AmB i wybranych pochodnych do permeabilizacji błony pęcherzyków lipidowych, zawierających odpowiednio ergosterol lub cholesterol, zastosowano metodę opartą na monitorowaniu zmian intensywności fluorescencji pyraniny jako wewnątrzpęcherzykowego indykatora pH [76].

Pomiar fluorymetryczny prowadzono na spektrometrze luminescencyjnym Perkin-Elmer LS-55 w temp. pok z mieszaniem. Intensywność emisji fluorescencji pyraniny mierzono w czasie dla długości fali 510 nm przy wzbudzeniu 460 nm, stosując szczeliny o szerokości odpowiednio 5,0 i 10 nm. Do 2 ml zawiesiny pęcherzyków lipidowych w buforze potasowym (100 mM K_2SO_4 , 20 mM KH_2PO_4 ; pH = 7,1) otrzymanych wg metody opisanej w punkcie 4.4.1. dodawano w pierwszej kolejności 5 μ l H_2SO_4 , by wygenerować gradient pH ($\text{pH}_{\text{zew}} = 6,6$). Następnie do układu wprowadzano 5 μ l 0,2 mM FCCP w etanolu i 2 μ l roztworu antybiotyku w DMSO o odpowiednim stężeniu. Po 10 min dodawano 5 μ l walinomycyny (stężenie końcowe 2,5 μ M) celem określenia maksymalnej zmiany fluorescencji.

Schemat obliczeń [76]:

Zważywszy na fakt, że zmiany fluorescencji pyraniny są liniowo zależne od zmian pH, gradient pH wynosi 0,53 a objętość pęcherzyków REV jest pomijalna w stosunku do

objętości zewnętrznego środowiska, procent wypływu potasu indukowany przez antybiotyk wyznaczano w oparciu o poniższe zależności:

$$\Delta [H^+] = \Delta [K^+] = 0,78 \times 10^{-7} \times 10^{0,0053x}$$

x – procent zmian fluorescencji obserwowany po dodaniu antybiotyku względem zmian indukowanych działaniem walinomycyny

$$P = 56(10^{0,0053x} - 1)$$

P – procent wypływu potasu indukowany przez antybiotyk w porównaniu do całkowitego wypływu notowanego w obecności walinomycyny

4.5. Spektrofotometryczne badanie stanu antybiotyku w roztworze

Przebieg procesu agregacji AmB i pochodnych badano w roztworach wodnych o składzie: woda, 155 mM NaCl (sól fizjologiczna), 150 mM NaCl buforowany 5mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ (PBS; pH = 7,4), bufor Tris (pH = 6,8). Widma absorpcyjne testowanych związków wykonano przy użyciu spektrofotometru UV-VIS, Lambda 45, Perkin Elmer w zakresie długości fali 550 – 300 nm. Wyniki rejestrowano w formie cyfrowej z gęstością próbkowania 1 nm. Stosowano kuwety o długości drogi optycznej 10; 2; 1; 0,5 cm dobrane odpowiednio w zależności od badanych stężeń antybiotyku.

4.5.1. Zawartość form rozpuszczalnych

Seryjne rozcieńczenia AmB i pochodnych przygotowano w DMSO w stężeniach 100-krotnie wyższych od żądanych stężeń końcowych. Następnie po 40 µl roztworu antybiotyku dodawano do 4 ml roztworu wodnego o odpowiednim składzie. Wodne roztwory AmB i pochodnych o stężeniach w zakresie od 0,5 do 50 µM inkubowano 2 godziny z mieszaniem w temperaturze pokojowej. Następnie dzielono je na dwie 2 ml porcje: a i b. Rejestrowano widmo absorpcyjne próbki a oraz próbki a rozcieńczonej metanolem w stosunku objętościowym 1:1 (a'). Próbkę b odwirowywano (11000 obr/min, 10 min), sporządzano widmo uzyskanego supernatantu oraz supernatantu rozcieńczonego metanolem w proporcji 1:1 (b').

Stężenie AmB oraz pochodnych określano w oparciu o wartość absorbancji przy długości fali 408 nm dla roztworów wodnych oraz 409 nm w przypadku roztworów alkoholowo-wodnych. Całkowite stężenie antybiotyku (C_t) wyznaczano na podstawie widma próbki a', stężenie monomeru (C_m) w oparciu o próbkę b, do określenia stężenia

form rozpuszczalnych: monomerów i rozpuszczalnych oligomerów wykorzystano natomiast próbkę b'. Stężenia agregatów rozpuszczalnych (C_r) oraz nierozpuszczalnych (C_{nr}) obliczano według wzoru:

$$C_r = (C_m + C_{ro}) - (C_m)$$

$$C_{nr} = (C_t) - (C_m + C_{ro})$$

gdzie:

($C_m + C_{ro}$) - stężenie antybiotyku w próbkach b'

Biorąc pod uwagę, iż wartość molowego współczynnika absorpcji ϵ_m dla monomeru badanego związku zależy od polarności rozpuszczalnika, wyznaczono wartość tego parametru w roztworach wodnych i mieszaninach roztwór wodny-metanol. W tym celu wykreślono zależność molowej absorpcji próbek a, b oraz a', b' przy długości fali odpowiednio 409 nm i 408 nm w funkcji stężenia antybiotyku. Wartość ϵ_m wyznaczano na drodze ekstrapolacji stężenia do wartości 0. Wyniki zestawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Zestawienie wartości molowych współczynników absorpcji dla AmB i pochodnych w roztworach wodnych oraz alkoholowo-wodnych.

Związek	$\epsilon_{ma} [M^{-1}cm^{-1}]$	$\epsilon_{ma'} [M^{-1}cm^{-1}]$	$\epsilon_{mb} [M^{-1}cm^{-1}]$	$\epsilon_{mb'} [M^{-1}cm^{-1}]$
AmB	87 902	160 000	145 775	160 000
K₉	145 644	131 363	148 732	131 363
K₁₀	130 465	129 870	119 092	129 870
K₁₉	130 560	139 860	152 330	139 860
K₂₀	118 821	137 931	138 635	137 931
PAMB	88 976	150 660	92 831	150 660

4.5.2. Identyfikacja liczby i typów form spektralnych

Roztwory wyjściowe AmB i badanych pochodnych sporządzone w DMSO dodawano do roztworów wodnych o odpowiednim składzie uzyskując stężenia końcowe antybiotyku w zakresie 0,2 – 50 μM . Po 2 godzinach inkubacji w temp.

pokojujowej z mieszaniami rejestrowano widma UV-VIS próbek (a) oraz próbek rozcieńczonych metanolem (a') w proporcji objętościowej 1:1.

Stężenie wyjściowe antybiotyku wyznaczano na podstawie wartości absorbancji przy długości fali 408 nm dla roztworów metanolowo-wodnych. Uzyskane wartości stężeń korygowano w oparciu o równanie zależności $A = f(s)$, gdzie s to odchylenie standardowe absorbancji poszczególnych widm w zakresie 450 – 350 nm. Uwzględniając skorygowane wartości stężeń zarejestrowane widma AmB oraz pochodnych przeliczano na wartości molowych współczynników ekstynkcji i zapisano w postaci macierzy $\mathbf{W}$ złożonej z n wierszy i m kolumn. Każdy wiersz odpowiadał jednej długości fali. Wartości n wynosiły odpowiednio: $n = 151$ dla AmB , $PAMB$ i pochodnych serii K , $n = 141$ dla $AMPA$ i $n = 131$ dla AMA . Każda kolumna odpowiadała pojedynczemu roztworowi o danym stężeniu antybiotyku.

Macierz $\mathbf{W}$ poddana została następnie analizie z zastosowaniem zaawansowanych technik chemometrycznych obejmujących metodę głównych składowych, spektroskopię różniczkową oraz numeryczną dekompozycję widm.

4.5.2.1. PCA [195]

W celu określenia liczby niezależnych składników, czyli tworów spektralnych, tworzących widma składające się na poszczególne macierze $\mathbf{W}$ uzyskane dla każdego z badanych antybiotyków w każdym z testowanych środowisk macierze te analizowano metodą głównych składowych.

W pierwszym etapie każde z widm poddano standaryzacji (autoskalowaniu) zgodnie z poniższym wzorem:

$$(1) \quad w_{ij} = \frac{s_{ij} - \mu_j}{\sigma_j}$$

gdzie: s_{ij} – molowy współczynnik ekstynkcji dla i th długości fali

μ_j – wartość średnia molowych współczynników ekstynkcji j th widma

σ_j – odchylenie standardowych współczynników ekstynkcji i th widma

uzyskując w efekcie znormalizowane macierze $\mathbf{W}$. Macierz korelacji $\mathbf{C}$ konstruowano w oparciu o zależność:

$$(2) \quad \mathbf{C} = \frac{1}{n} \mathbf{W}^T \mathbf{W}$$

$$= \frac{\quad}{n}$$

W wyniku rozkładu macierzy korelacji C metodą głównych składowych uzyskano m wzajemnie ortogonalnych wektorów własnych. Z każdym wektorem własnym związana jest jednoznacznie liczba zwana wartością własną λ_i . Liczba ta charakteryzuje zasób zmienności (informacji) zawartej w danym wektorze własnym. Minimalna ilość wektorów własnych (o największych wartościach własnych) niezbędna do odtworzenia zmienności zawartej w danych wyznacza ilość niezależnych tworów spektralnych – k . Z uwagi na błąd pomiaru (szum) pierwsze k wektorów własnych może nie zawierać 100 % zmienności zawartej w zbiorze widm. W typowych zastosowaniach analizy głównych składowych wykorzystuje się najczęściej tzw. wykres osypiska. Wykazano jednak, że metoda ta zawodzi przy analizie danych spektralnych. Dlatego w niniejszej pracy zastosowano w tym celu analizę widm resztowych [196,197].

4.5.2.2. Spektroskopia pochodnych

Dla wstępnego oszacowania zawartości poszczególnych form spektralnych wykorzystano tzw. widma różniczkowe będące pochodnymi odpowiednich rzędów ze znormalizowanych widm [198]. Wykazano, że każda z form spektralnych posiada w wybranych zakresach długości fali swoiste cechy uwidaczniające się szczególnie wyraźnie na widmach różniczkowych II rzędu.

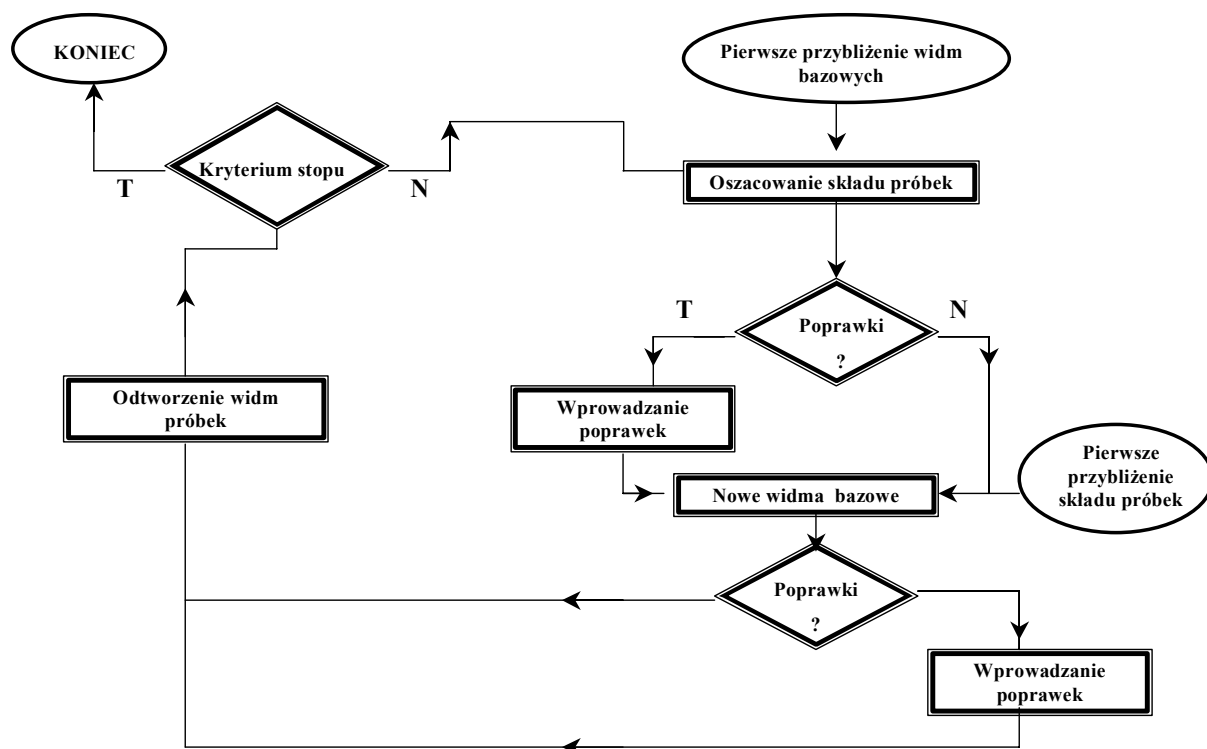
4.5.2.3. Numeryczna dekompozycja widm [199]

Jeżeli widma spełniają prawo Lamberta-Beer'a, macierz widm W można przedstawić w postaci iloczynu dwóch innych macierzy: macierzy składników B , której kolumny reprezentują widma tworów spektralnych oraz macierzy ułamków molowych X , której kolumny zawierają ułamki molowe poszczególnych tworów spektralnych.

(3) $W = BX$

Analiza głównych składowych stwarza możliwość oszacowania ilości niezależnych tworów spektralnych nie dostarcza jednak jednoznacznej informacji o widmach tych tworów. Informacja ta zawarta jest wprawdzie w wektorach własnych, niemniej jednak wektory własne uzyskano zakładając ich idealną ortogonalność, co w przypadku widm tworów spektralnych nie jest prawdziwe.

W związku z tym rozwiązanie równania (3) wymaga zastosowania techniki określanej mianem iteracyjnej procedury samouzgodnienia (NSD). Schemat działania algorytmu widm samouzgodnionych zilustrowano na Rys. 14.



Rys. 14. Schemat działania algorytmu widm samouzgodnionych.

Rozpoczęcie procedury samouzgodnienia wymaga danych inicjujących. Mogą nimi być:

- zerowe przybliżenie macierzy widm bazowych $\mathbf{B}_0$, lub
- zerowe przybliżenie macierzy ułamków molowych $\mathbf{X}_0$.

W przypadku pierwszym procedura ma przebieg:

1) Liniowa kombinacja odwróconych i zrenormalizowanych wektorów własnych wykorzystywana jest do otrzymania zerowego przybliżenia kolumn macierzy $\mathbf{B}$ (widma czystych składników). Współczynniki kombinacji dobierano ręcznie w taki sposób, by otrzymane widma bazowe spełniały dwa następujące założenia:

- i) współczynniki ekstynkcji molowych nie mogą przyjmować ujemnych wartości
- ii) ilość, pozycja oraz intensywność pasm absorpcyjnych w widmach składników powinna być zbliżona do tych samych wartości obserwowanych w zarejestrowanych widmach.

2) Przybliżenie macierzy $\mathbf{B}_0$ zastosowano do wyznaczenia macierzy ułamków molowych według wzoru:

$$\mathbf{X}_1 = [\mathbf{B}_0^T \mathbf{B}_0]^{-1} \mathbf{B}_0^T \mathbf{W} \quad (4)$$

3) Macierz $\mathbf{X}_1$ korygowano następnie biorąc pod uwagę dwie reguły:

- i) ułamki molowe nie powinny być ujemne
- ii) suma ułamków molowych poszczególnych tworów spektralnych w każdej próbce powinna wynosić 1.

By spełnić powyższe warunki ujemne elementy macierzy $\mathbf{X}_1$ sprowadzano do 0 i każda kolumna macierzy $\mathbf{X}$ została przeskalowana formując macierz $\mathbf{Y}_1$.

4) Macierz $\mathbf{Y}_1$ wykorzystano do wyznaczenia nowego przybliżenia macierzy składników $\mathbf{B}$ według wzoru:

$$\mathbf{B}_1 = \mathbf{W} \mathbf{Y}_1^T [\mathbf{Y}_1 \mathbf{Y}_1^T]^{-1} \quad (5)$$

5) Macierz $\mathbf{Y}_1$ z kroku (3) oraz macierz $\mathbf{B}_1$ z kroku (4) zastosowano następnie do obliczenia macierzy odtworzonych widm $\mathbf{V}_1$:

$$\mathbf{V} = \mathbf{B} \mathbf{Y} \quad (6)$$

Porównanie wartości z macierzy $\mathbf{V}_i$ z macierzą widm rzeczywistych pozwala ocenić stopień zgodności widm odtworzonych i rzeczywistych. Jako miarę zgodności przyjęto sumę kwadratów różnic odpowiadających sobie elementów obu macierzy:

$$\text{SKR} = \sum_i \sum_j (w_{ij} - v_{ij})^2$$

6) Powtarzając etapy od 2) do 4) po kilku cyklach iteracji uzyskiwano zadawalające samouzgodnienie wyników.

W przypadku drugim zerowe przybliżenie ułamków molowych $\mathbf{X}_0$ uzyskać można z analizy widm różniczkowych II rzędu (p. 4.5.2.2). Pozwala to wyznaczyć pierwsze przybliżenie widm bazowych $\mathbf{B}_1$. Dalszy tok postępowania jest analogiczny jak w przypadku pierwszym.

4.5.2.4. Model agregacji

Na podstawie wcześniejszych prac dotyczących procesów agregacji AmB [38] stwierdzono, że stężenie monomeru nie rośnie nieograniczenie, ale przyjmuje pewną graniczną wartość, którą określono mianem MMC (ang. *Maximal Monomer Concentration*). Występowanie maksymalnego stężenia monomeru wskazuje, że proces agregacji AmB ma charakter agregacji nieograniczonej. W pierwszym etapie agregacji dochodzi do łączenia się amfipatycznych monomerów do hydrofilowych dimerów ze stałą dimeryzacji K_D . Z etapem tym związane są wyraźne zmiany widma. W kolejnych

etapach agregacji dimery oddziałują ze sobą tworząc coraz większe agregaty ze stałą agregacji K_A . Zgodnie z modelem agregacji nieograniczonej wielkość agregatów nie jest ograniczona. Wykazano [38], że z tym etapem agregacji nie wiążą się zmiany widma.

Model:

$$\begin{array}{ll}
 M + M = D & D = K_D M^2 \\
 D + D = A_2 & A_2 = K_A D^2 = K_A K_D^2 M^4 \\
 D + A_2 = A_3 & A_3 = K_A A_2 D = K_A^2 K_D^3 M^6 \\
 \vdots & \vdots \\
 D + A_{n-1} = A_n & A_n = K_A^{n-1} K_D^n M^{2n}
 \end{array}$$

Można wykazać, że przy takim modelu agregacji stężenie zagregowanej formy antybiotyku daje się opisać zależnością:

$$\frac{2K_D M^2}{(1 - K_A K_D M^2)^2} \quad (1)$$

Stąd całkowite stężenie antybiotyku można wyrazić jako:

$$c = M + \frac{2K_D M^2}{(1 - K_A K_D M^2)^2} \quad (2)$$

a maksymalne stężenie monomeru:

$$MMC = \frac{1}{\sqrt{K_A K_D}} \quad (3)$$

Jeżeli wprowadzone zostaną nowe oznaczenia K i α takie, że:

$$K_D = K\alpha$$

$$K_A = \frac{K}{\alpha}$$

$$\text{to } K_A K_D = K^2, \text{ a zatem } MMC = \frac{1}{K};$$

W przypadku występowania więcej niż jednego typu agregatu przyjęto założenie, że powstają one niezależnie od siebie. Zawartość każdego typu agregatu (X , Y , A) opisuje przy tym taka sama zależność:

$$[X] = \frac{2K_x \alpha_x M^2}{(1 - K_x M^2)^2} \quad (4)$$

W pracy przyjęto, że proces agregacji pochodnych AmB ma taki sam charakter jak wyjściowego antybiotyku. Wartości parametrów modelu wyznaczono z iteracyjnego dopasowania równania modelu do danych doświadczalnych metodą algorytmu Simplex. Wyznaczone parametry modelu przeliczano następnie na wartości stałych dimeryzacji K_D oraz K_A .

4.5.3. Oddziaływanie z białkami surowicy ludzkiej

Oznaczenie wykonano dla AmB jako związku referencyjnego oraz dwóch wybranych pochodnych: AMA i PAMB.

Kinetykę i stabilność wiązania antybiotyku z białkiem śledzono w oparciu o spektroskopię UV-VIS. Albuminę surowicy ludzkiej (HSA) rozpuszczano w buforze PBS (pH = 7,4) sporządzając roztwór wyjściowy białka o stężeniu 1000 μM . Odpowiednie ilości roztworu HSA dodawano następnie do roztworów badanych związków o stężeniu 2 i 10 μM , przygotowanych w buforze PBS, po 2 godzinach preinkubacji w temp. pok. z mieszaniem. Miareczkowanie prowadzono w taki sposób, by uzyskać stężenie końcowe białka w zakresie 0,5 - 40 μM . Po aplikacji kolejnych porcji białka rejestrowano widma absorpcyjne badanych związków w zakresie długości fali 550-300 nm. We wszystkich pomiarach jako odnośnik stosowano próbkę buforu PBS zawierającą identyczną ilość HSA jak próbka z antybiotykiem.

W celu określenia stanu równowagi w wiązaniu badanych związków z białkiem dla najwyższego stężenia HSA (40 μM) śledzono kinetykę wiązania rejestrując kolejne widma absorpcyjne z częstotliwością 5 min przez 1 godzinę.

Surowicę ludzką, przed przystąpieniem do pomiarów spektrofotometrycznych, rozcieńczano buforem PBS w stosunku 1:5, z uwagi na silną absorbancję w zakresie 400- 300 nm pochodzącą od białek oraz barwników żółciowych. Do przygotowanej w ten sposób surowicy dodawano następnie odpowiednią ilość, sporządzonych w DMSO, wyjściowych roztworów badanych związków, tak by końcowe stężenie antybiotyku w próbce wynosiło 10 μM . Widma absorpcyjne próbek rejestrowano w zakresie długości fali 550-300 nm kolejno po upływie 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 oraz 120 min inkubacji związku z surowicą w temp. pok. z mieszaniem, stosując jako odnośnik wyjściową próbkę surowicy rozcieńczonej buforem PBS (1:5).

5. Wyniki i wnioski

5.1. Selektywna toksyczność AmB i badanych pochodnych

Właściwości biologiczne AmB i badanych pochodnych (Tab. 5) scharakteryzowano w stosunku do komórek *Candida albicans* oraz ludzkich erytrocytów, wybranych jako modele odpowiednio komórek patogennych i komórek gospodarza. Jako miarę aktywności przeciwgrzybowej przyjęto wartości dwóch parametrów charakteryzujących działanie grzybobójcze antybiotyku tj. IC₅₀ oraz MIC, natomiast toksyczność w stosunku do krwinek czerwonych badano w oparciu o pomiar wypływu potasu z erytrocytów (EK₅₀) i hemolizę (EH₅₀). Wśród testowanych związków należących do nowej generacji zawadzonych przestrzennie pochodnych N-aminoacylowych (seria „K”), cztery (K₆, K₃₅, K₁₆, K₃₄) badano z zastosowaniem innej procedury eksperymentalnej. Wyniki dla tychże związków przedstawiono w Tab. 14.

Tabela 5. Selektywna toksyczność AmB i badanych pochodnych

	<i>Candida albicans</i> ATCC 10261		Erytrocyty	
Związek	MIC [μM]	IC ₅₀ [μM]	EK ₅₀ [μM]	EH ₅₀ [μM]
AmB	0,1	0,05±0,004	1,2±0,072	1,95±0,085
AMA	0,08	0,02±0,001	13±1,41	23±1,53
AMPA	0,25	0,09±0,005	10±1,66	>100
MFAME	0,3*	0,1±0,045*	156±8,025*	>250*
K₉	0,3	0,07±0,002	61±2,58	>200
K₁₀	0,2	0,06±0,002	56±3,25	>200
K₁₇	0,45	0,2±0,009	27±1,35	>250
K₁₉	0,21	0,06±0,025	5±0,26	14±0,63
K₂₀	0,3	0,13±0,065	4±0,24	13±0,52
K₂₁	0,81	0,29±0,015	81±3,60	>200
K₂₄	0,6	0,3±0,016	50±2,25	>200
PAMB	0,235	0,13±0,085	102±5,62	>200

* źródło literaturowe [39,41-44]

MIC – minimalne stężenie związku wywołujące całkowite zahamowanie wzrostu drobnoustroju

IC₅₀ - stężenie związku powodujące zahamowanie wzrostu drobnoustroju w 50%

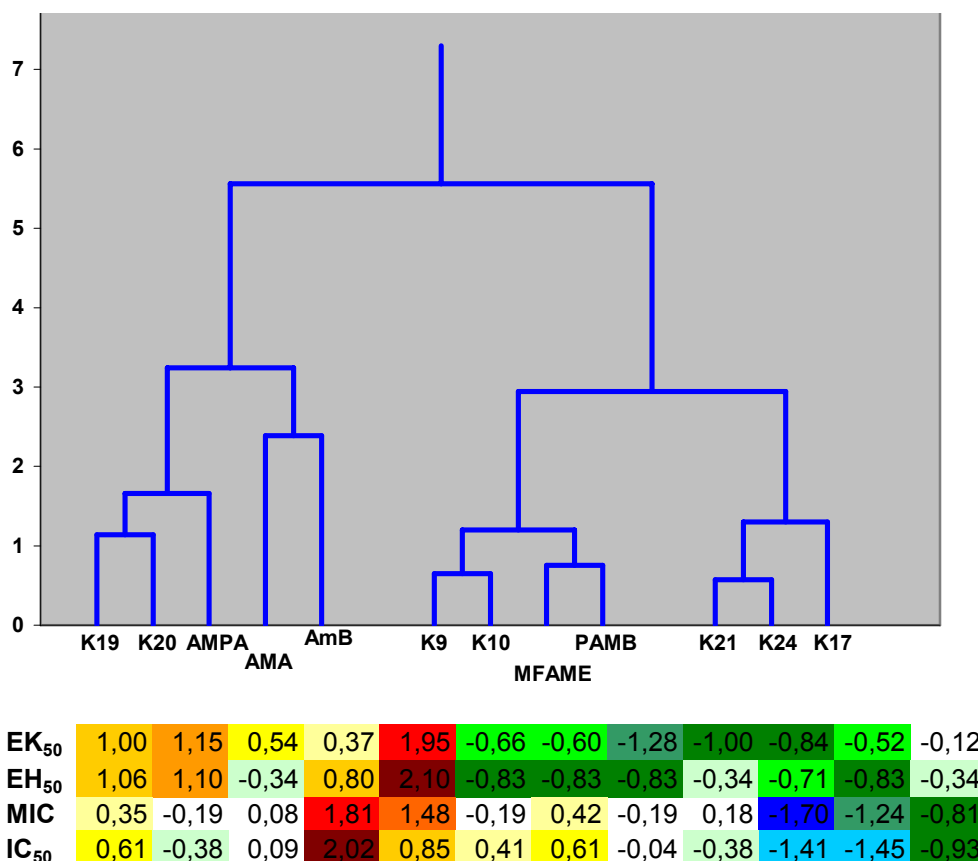
EK₅₀ – stężenie związku indukujące 50% wypływu potasu z krwinek czerwonych

EH_{50} – stężenie związku indukujące 50% wypływu hemoglobiny z krwinek czerwonych

Na podstawie zilustrowanych w Tab. 5 wyników można stwierdzić, iż badane pochodne w znacznym stopniu zachowują aktywność przeciwgrzybową wyjściowego antybiotyku a równocześnie wykazują zróżnicowaną toksyczność w stosunku do krwinek czerwonych. AMA, K_{19} , K_{20} wykazują kilkukrotną poprawę selektywnej toksyczności w porównaniu do AmB, podczas gdy w przypadku PAMB obniżenie toksyczności, podobnie jak dla MFAME, jest radykalne. Wpływ potasu z krwinek czerwonych indukowany przez te pochodne zachodzi w stężeniach ponad 100-krotnie wyższych aniżeli w przypadku AmB. Ponadto związek ten praktycznie nie indukuje hemolizy, co stwierdza się również dla K_9 , K_{10} , K_{17} , K_{21} , K_{24} . W oparciu o analizę podobieństwa wykonaną metodą najdalszego sąsiada (Rys. 15) badane związki można sklasyfikować na 3 grupy:

- związki, o wysokiej aktywności przeciwgrzybowej, indukujące w erytrocytach wypływ jonów potasu i hemolizę w podobnym zakresie stężeń: AmB, AMA, AMPA, K_{19} , K_{20}
- związki, o wysokiej aktywności przeciwgrzybowej, indukujące w erytrocytach wypływ potasu w wysokich stężeniach, niehemolityczne: MFAME, K_9 , K_{10} , PAMB
- związki o nieco obniżonej aktywności przeciwgrzybowej, indukujące wypływ potasu w zakresie średnich stężeń, niehemolityczne: K_{21} , K_{24} , K_{17} .

Na uwagę zasługuje fakt braku korelacji pomiędzy permeabilizacją erytrocytów w stosunku do jonów K^+ a aktywnością hemolityczną badanych pochodnych. Może to wskazywać na występowanie różnych mechanizmów zwiększania przepuszczalności błon erytrocytów w stosunku do jonów potasu. Być może, powszechnie uznawany dla AmB koloidoosmotyczny mechanizm hemolizy nie obowiązuje dla niektórych pochodnych. W przypadku lizy koloidoosmotycznej wartości EH_{50} i EK_{50} powinny być zbliżone. Stosunek tychże wielkości dla AmB (liza koloidoosmotyczna) wynosi 1,625. Zbliżoną wartość (2,33) obserwuje się jedynie dla pochodnej AMA (1,77), K_{19} (2,8) oraz K_{20} (3,25). W przypadku pozostałych pochodnych- niehemolizujących, stosunek EH_{50}/EK_{50} jest trudny do określenia, ze względu na jego wysokość.



Rys. 15. Diagram wiążkowy podobieństwa badanych związków wykonany metodą najdalszego sąsiada zilustrowany łącznie z barwną tabelą testów.

5.2. Aktywność w stosunku do standardowego szczepu *Candida albicans* i mutantów ergosterolowych

5.2.1. Aktywność przeciwgrzybowa (MIC, MFC)

Dla szczepu standardowego *Candida albicans* (C.a) oraz mutantów erg-2 i erg-16 posiadających defekt w szlaku biosyntezy ergosterolu wyznaczono dwa parametry charakteryzujące różne typy działania chemoterapeutyków na drobnoustroje grzybowe tzn. aktywność grzybostatyczną i grzybobójczą. Jako miarę działania grzybostatycznego przyjęto minimalne stężenie związku hamujące wzrost (MIC). Aktywność grzybobójczą wyrażono natomiast jako minimalne stężenie związku wywołujące działanie bójcze (MFC). Oznaczenia wykonano dla AmB jako antybiotyku wyjściowego oraz pochodnych o zróżnicowanej selektywnej toksyczności: AMA (mało-) i MFAME (wysoko-) selektywnej. Wyniki zestawione w Tab. 6 wyraźnie wskazują, iż zarówno AmB jak i pochodne hamują wzrost i działają grzybobójczo na wszystkie badane szczepy. W przypadku mutantów ergosterolowych notuje się około 5 - krotne obniżenie wrażliwości w porównaniu ze szczepem wyjściowym zarówno w

przypadku AmB jak i pochodnych. Warty podkreślenia jest fakt zachowania przez pochodne aktywności bójczej wyjściowego antybiotyku. Stężenie grzybobójcze AmB pokrywa się z jej stężeniem grzybostatycznym zarówno dla szczepu dzikiego jak i jego mutantów. Dla AMA i MFAME aktywność grzybobójcza jest jedynie 2-krotnie niższa od aktywności grzybostatycznej. Należy podkreślić w tym miejscu duży wpływ składu jonowego podłoża na aktywność grzybostatyczną. Przy zastosowaniu podłoża bez dodatku 0,5% NaCl różnica w wartościach MIC dla omawianych szczepów była jedynie 2-krotna (dane niepokazane).

Tabela 6. Aktywność grzybostatyczna i grzybobójcza AmB i badanych pochodnych.

Szczep	Związek	MIC [μM]	MFC [μM]
<i>Candida albicans</i> ATCC 44829 (C.a.)	<i>AmB</i>	0,054	0,054
	<i>AMA</i>	0,04	0,08
	MFAME	0,4	0,8
<i>Candida albicans</i> ATCC 44831 (erg-2)	<i>AmB</i>	0,27	0,27
	<i>AMA</i>	0,20	0,40
	MFAME	2,0	4,0
<i>Candida albicans</i> ATCC 44830 (erg-16)	<i>AmB</i>	0,27	0,27
	<i>AMA</i>	0,20	0,40
	MFAME	2,0	4,0

Komórki inkubowano z antybiotykiem 48 godz. w temp. 30°C. Gęstość optyczną zawiesiny oznaczano przy długości fali $\lambda = 660 \text{ nm}$.

5.2.2. Aktywność permeabilizacyjna

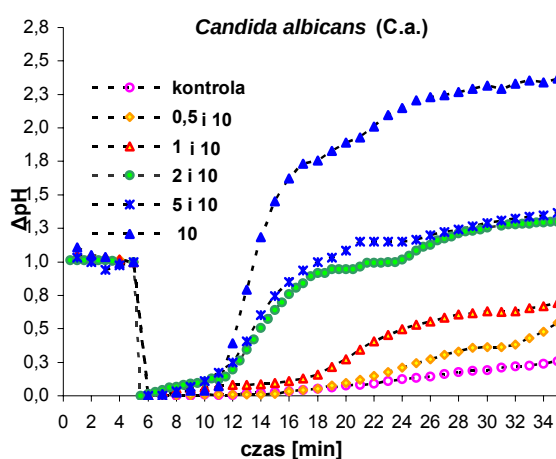
Permeabilizację błony komórek szczepu wyjściowego *Candida albicans* (C.a) oraz jednego z mutantów ergosterolowych - erg-2 indukowaną przez AmB i pochodne charakteryzowano z jednej strony w oparciu o ruch protonów (badanie zmian pH), a z drugiej poprzez wpływ potasu wewnątrzkomórkowego z komórek poddanych działaniu antybiotyku. Dodatkowo podjęto próbę określenia zależności pomiędzy tymi dwoma procesami przy zastosowaniu pomiaru pozwalającego na monitorowanie wymiany H^+/K^+ jednocześnie w tej samej zawieszynie komórek.

5.2.2.1. Ruch protonów (ΔpH) indukowany w komórkach grzybów

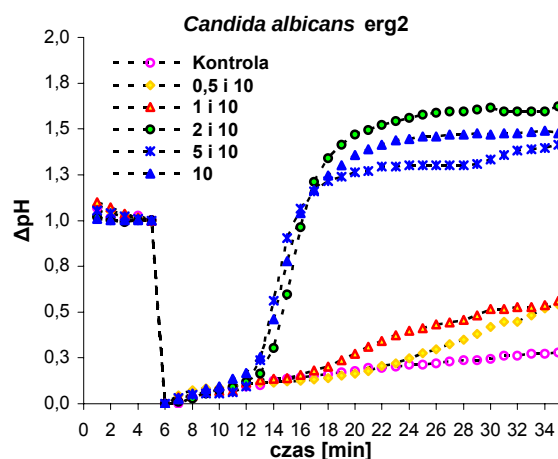
Modyfikacje gradientu pH pod wpływem działania AmB oraz pochodnych: AMA i MFAME śledzono w niebuforowanym środowisku. Z uwagi na labilność pH wyjściowej zawiesiny komórek konieczne było zastosowanie małego gradientu pH przez dodatek odpowiedniej ilości 0,01 M HCl celem doprowadzenia startowego pH do poziomu około 6. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie zależności $\Delta pH = f(t)$. Taki sposób prezentacji pozwolił na zniwelowanie niewielkich różnic pH wyjściowego w zawieszynie komórek testowanych szczepów.

W niebuforowanej zawieszynie komórek grzybowych w wodzie obserwuje się powolne zakwaszanie środowiska na skutek metabolizmu zasobów endogennych. Dodanie antybiotyku polienowego prowadzi do alkalizacji środowiska. Jest to wynik wymiany wewnątrzkomórkowego jonu potasu na proton ze środowiska. Wymiana ta zachodzi na skutek permeabilizacji błony komórkowej wywołanej przez antybiotyk.

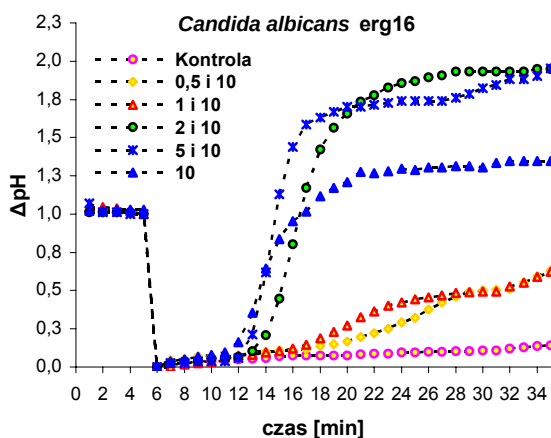
a)



b)



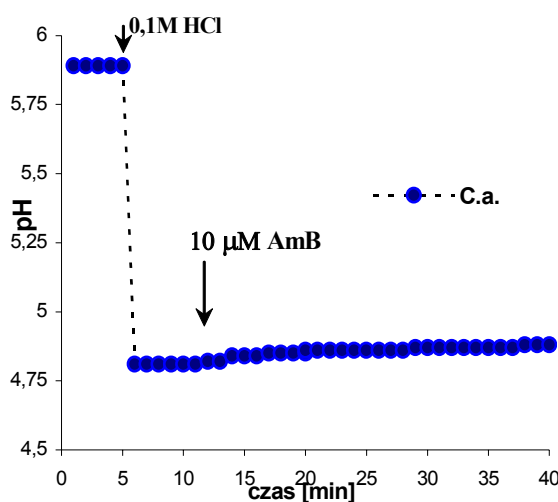
c)



Rys. 16. Zależność $\Delta pH = f(t)$ dla szczepów:
a) *C. albicans* standardowego (C.a.) **b)** erg2
c) erg16 indukowana działaniem AmB w warunkach generowania dużego gradientu pH dodatkiem odpowiedniej ilości 0,1 M HCl do wyjściowej zawiesiny komórek grzybów. AmB dodawano po 10 min w stężeniach odpowiednio 0,5; 1; 2; 5 μM a następnie po upływie 25 min do tych samych próbek dodawano 10 μM AmB.

Przy pierwszych pomiarach zastosowano duży gradient pH, który generowano przez dodatek do wyjściowej zawiesiny komórek grzybowych odpowiedniej ilości 0,1 M HCl, osiągając w ten sposób zmianę pH o jedną jednostkę ($\Delta\text{pH}\sim 1$). W takich warunkach nie obserwowano różnic we wrażliwości mutantów ergosterolowych na AmB. W zakresie stężeń antybiotyku od 0,5 do 10 μM stwierdzono podobną, zależną od stężenia, alkalizację środowiska zarówno dla szczepu wyjściowego jak i mutantów erg-2 i erg-16 (Rys. 16).

W celu wykazania, że obserwowane zmiany pH są efektem rozładowania gradientu pH pod wpływem działania antybiotyku na komórki a nie wynikiem wpływu innych czynników przeprowadzono analogiczne doświadczenie dla zawiesiny komórek martwych. W tych warunkach nie obserwowano po dodaniu antybiotyku żadnych zmian pH (Rys. 17).



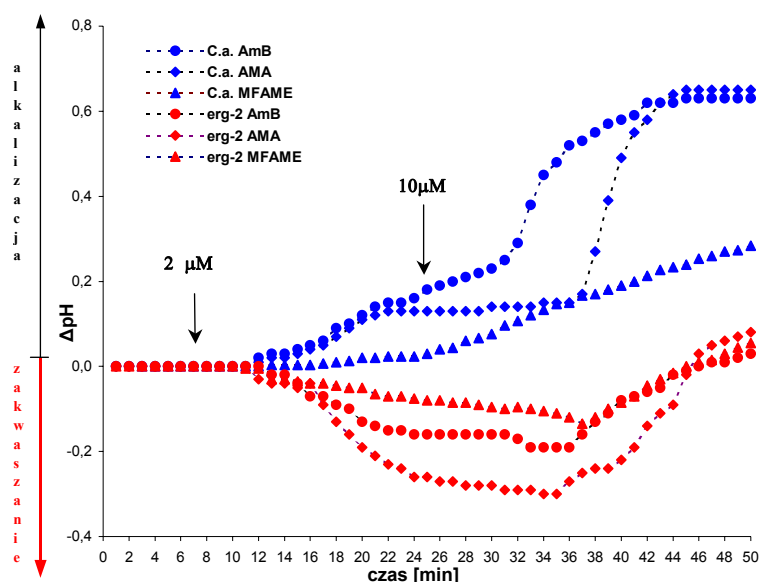
Rys. 17. Zależność $\text{pH}=f(t)$ dla standardowego szczepu *C. albicans*.

Zawiesinę komórek gotowano 10min w 100 °C, a potem traktowano 10 μM AmB. Wyjściowe pH ~ 5.

Różnice we wrażliwości mutantów ergosterolowych na działanie AmB i wybranych pochodnych wystąpiły dopiero w przypadku zastosowania mniejszego gradientu pH ($\Delta\text{pH}\sim 0,25$).

Na Rys. 18 zilustrowano przebieg zmian pH w czasie indukowanych przez AmB i pochodne w komórkach szczepu wyjściowego C.a. oraz jednego z jego mutantów ergosterolowych. Tylko w przypadku szczepu wyjściowego obserwuje się alkalizację środowiska, zarówno w wyniku działania antybiotyku macierzystego jak i pochodnych. Badane związki różnią się jednak kinetyką i wielkością indukowanych zmian pH. Dla AMA omawiane różnice są zasadniczo niewielkie i sprowadzają się właściwie do

nieznacznego opóźnienia działania w porównaniu do AmB. Natomiast MFAME zastosowana w stężeniach 2 i 10 μM działa zdecydowanie wolniej i mniej efektywnie aniżeli AmB i AMA użyte w tych samych stężeniach. Całkowita zmiana pH indukowana przez tą pochodną jest około dwukrotnie mniejsza w porównaniu do ΔpH_c obserwowanej dla antybiotyku wyjściowego.

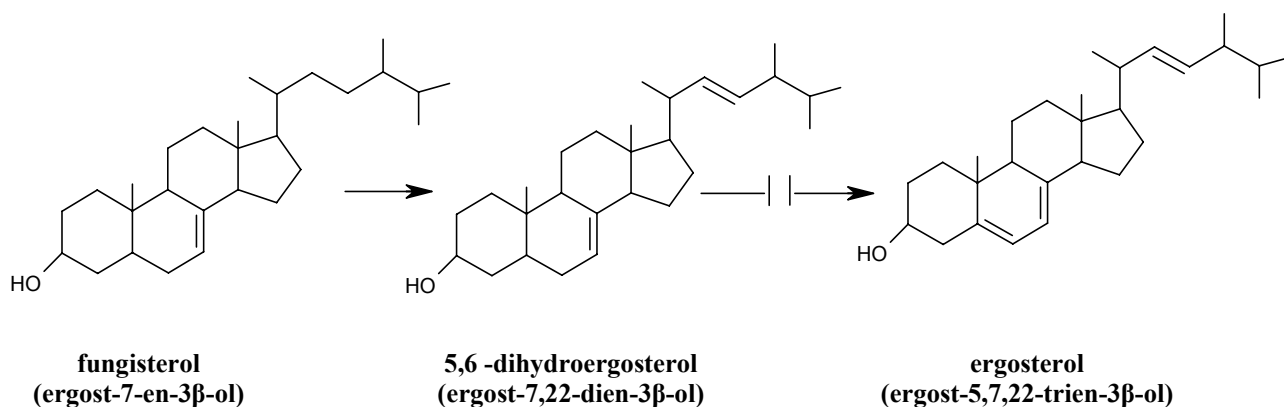


Rys. 18. Kinetyka ruchu protonów ($\Delta\text{pH}=f(t)$) dla szczepu standardowego *C. albicans* (C.a.) oraz erg-2 indukowana przez AmB i pochodne. Komórki drożdży zawieszano w środowisku wody dejonizowanej; stężenie końcowe komórek 2 mg suchej masy/ml.

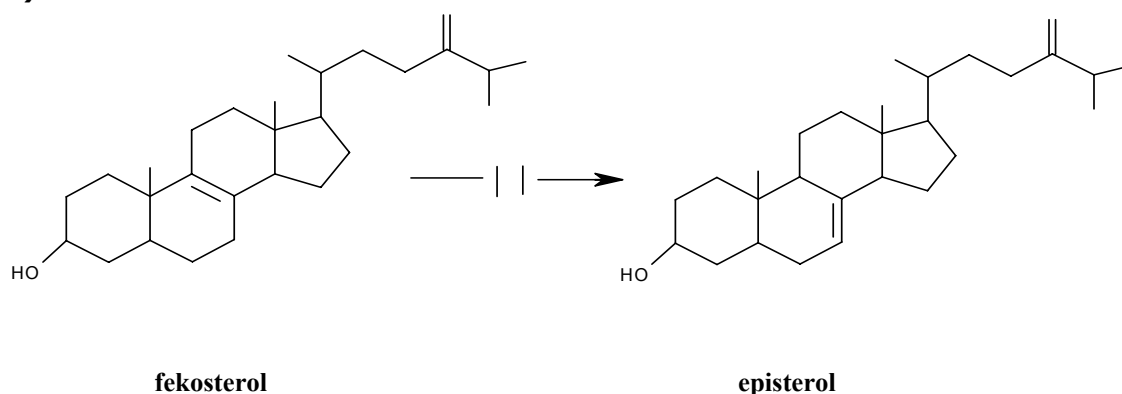
W odróżnieniu od szczepu wyjściowego dla mutantu erg-2 nie notuje się wzrostu pH w wyniku działania AmB i pochodnych dodanych do zawiesiny w stężeniu 2 μM . Wzrost stężenia antybiotyku do 10 μM prowadzi do zdecydowanie mniejszych zmian w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Podobny efekt obserwowano dla drugiego z mutantów ergosterolowych, a mianowicie mutantu erg-16 i AmB (dane niepokazane).

Zmniejszenie wrażliwości mutantów ergosterolowych związane jest z brakiem zdolności do wytwarzania ergosterolu w związku z defektami w szlaku jego biosyntezy. W przypadku **erg-16** na skutek mutacji genu kodującego **5,6-dehydrogenazę** sterolową akumulowany jest zymosterol, episterol, ergosta-7-en-3- β -ol, ergosta-7,22-dien-3- β -ol. Natomiast w komórkach **erg-2** nieposiadających funkcjonalnej $\Delta^8\Delta^7$ – **izomerazy** gromadzi się zymosterol i fekosterol (Rys. 19) [183].

a)



b)



Rys. 19. Intermediaty szlaku biosyntezy ergosterolu akumulowane przez mutanty erg: a) erg-16; b) erg-2 [149-151,183].

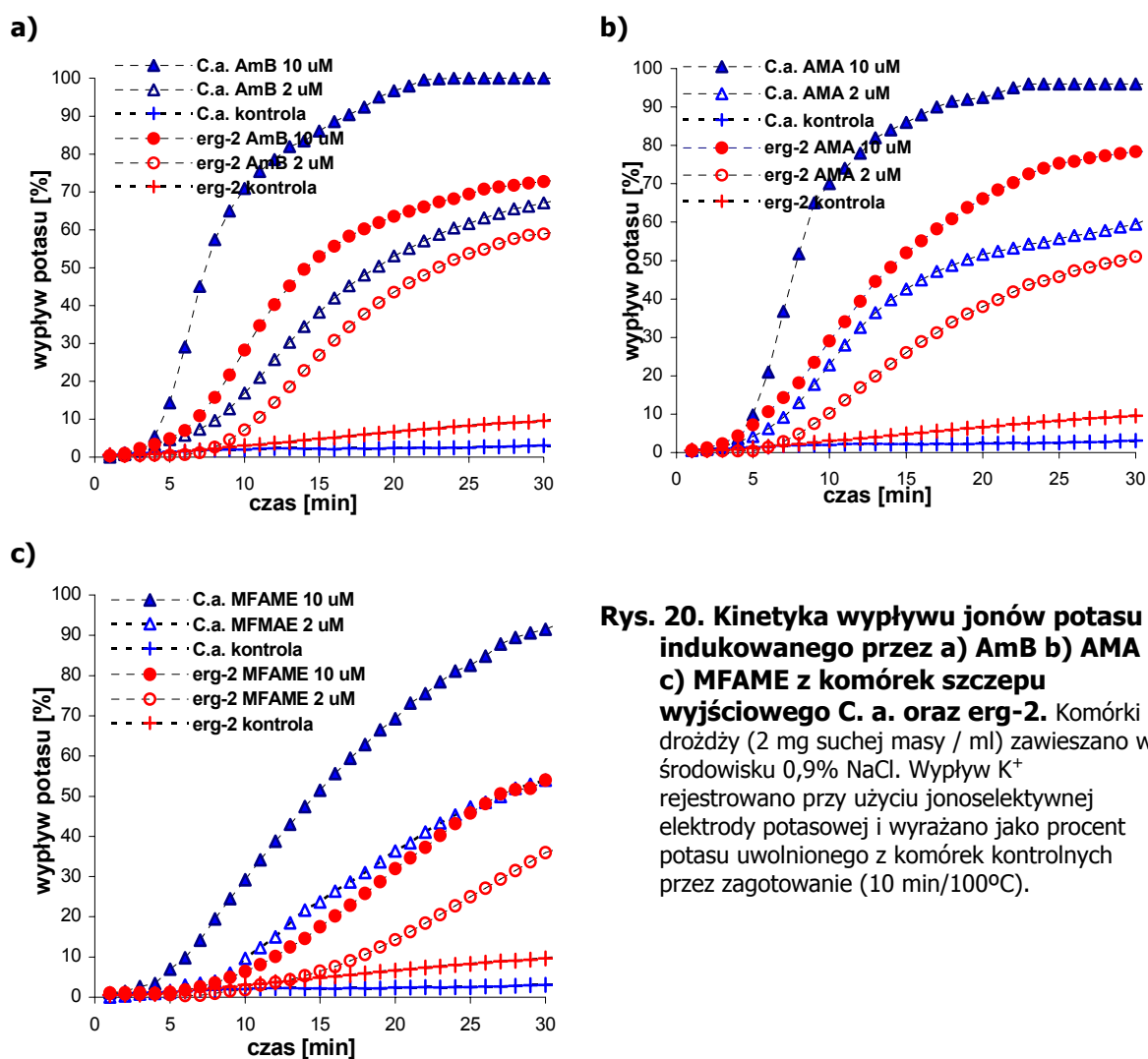
Akumulacja intermediatów ergosterolu, przy braku tego ostatniego, prowadzi do istotnych zmian we właściwościach fizykochemicznych błony mutantów, która wykazuje niższy stopień uporządkowania, a tym samym jest bardziej płynna w porównaniu z błoną szczepu produkującego ergosterol [152].

5.2.2.2. Wpływ jonów potasu

Ilość i szybkość uwalniania jonów potasu w wyniku działania AmB i pochodnych, zastosowanych w stężeniach 2 i 10 μM , wyznaczono dla szczepu wyjściowego *Candida albicans* (C.a) oraz mutantu - erg-2 (Rys. 20).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż poziom uwalnianego potasu w przypadku wszystkich badanych związków zależy od stężenia antybiotyku oraz badanego szczepu. Zarówno AmB jak i pochodne, zastosowane w stężeniu 10 μM indukują całkowitą utratę potasu tylko dla szczepu wyjściowego (C.a). Mutant, erg-2 jest zdecydowanie mniej wrażliwy. W przypadku tego szczepu notuje się tylko

częściową utratę potasu, a czas potrzebny do zapoczątkowania wypływu jest dłuższy aniżeli dla szczepu wyjściowego. W przypadku najbardziej aktywnego związku - AmB poziom potasu uwalnianego z komórek mutantu nie przekracza po upływie 30 min 75%.



Rys. 20. Kinetyka wypływu jonów potasu indukowanego przez a) AmB b) AMA c) MFAME z komórek szczepu wyjściowego C. a. oraz erg-2. Komórki drożdży (2 mg suchej masy / ml) zawieszano w środowisku 0,9% NaCl. Wpływ K^+ rejestrowano przy użyciu jonoselektywnej elektrody potasowej i wyrażano jako procent potasu uwolnionego z komórek kontrolnych przez zagotowanie (10 min/100°C).

Tabela 7. Zestawienie wartości t_{50} dla szczepu standardowego *C. albicans* (C.a.) oraz mutantu erg-2.

Związek	t_{50} [min]	
	C.a.	erg-2
AmB	8,4±1,2	14,2±0,7
AMA	7,8±0,3	14,5±0,7
MFAME	14,6±0,8	27,6±0,8

t_{50} - czas wypływu 50% potasu wewnątrzkomórkowego z komórek grzybowych traktowanych antybiotykiem o stężeniu 10 μ M

W celu porównania aktywności permeabilizacyjnej AmB i testowanych pochodnych wyznaczono t_{50} , czyli czas potrzebny do wypływu 50% potasu wewnątrzkomórkowego z komórek grzybowych traktowanych antybiotykiem o stężeniu 10 μ M (Tabela 6). Oba badane szczepy wykazują podobną wrażliwość na działanie AmB oraz AMA. Wartości t_{50} notowane dla tych antybiotyków są niemalże identyczne. Z kolei MFAME działa znacznie wolniej. Pochodna ta indukuje wypływ potasu z komórek zarówno szczepu dzikiego jak i mutantu w czasie około dwukrotnie dłuższym aniżeli AmB czy też AMA.

Porównanie wartości t_{50} dla szczepu dzikiego oraz mutantu potwierdza wnioski wyciągnięte z badań rozładowania gradientu pH: zmniejszenie wrażliwości szczepu erg-2 na działanie wszystkich badanych związków. Wartości t_{50} uzyskane dla mutantu są ok. dwukrotnie większe zarówno w przypadku AmB jak i pochodnych. Niemniej jednak należy w tym miejscu podkreślić znaczenie faktu, iż mimo obniżenia wrażliwości mutantów erg-, które nie są zdolne do produkcji ergosterolu w wyniku defektu w szlaku jego biosyntezy, badane związki nadal wykazują aktywność względem tego typu szczepów.

5.2.2.3. Kinetyka wymiany H^+/K^+

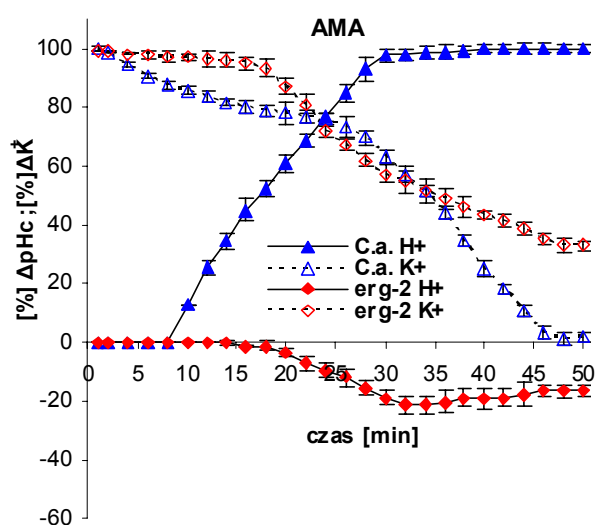
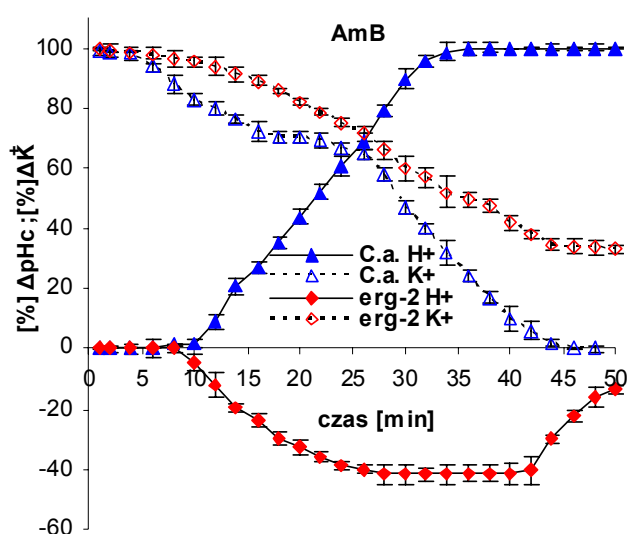
Wpływ jonów K^+ i zmiany pH indukowane przez AmB i badane pochodne mierzono jednocześnie w tej samej zawieszynie komórek. Oznaczenie wykonano dla szczepu wyjściowego C.a. oraz mutantu erg-2. AmB i pochodne zastosowano do pomiarów w stężeniu 10 μ M. Wyniki, zilustrowane w postaci zależności (% ΔpH_c ; % $\Delta K^+ = f(t)$) zestawiono poniżej (Rys. 21).

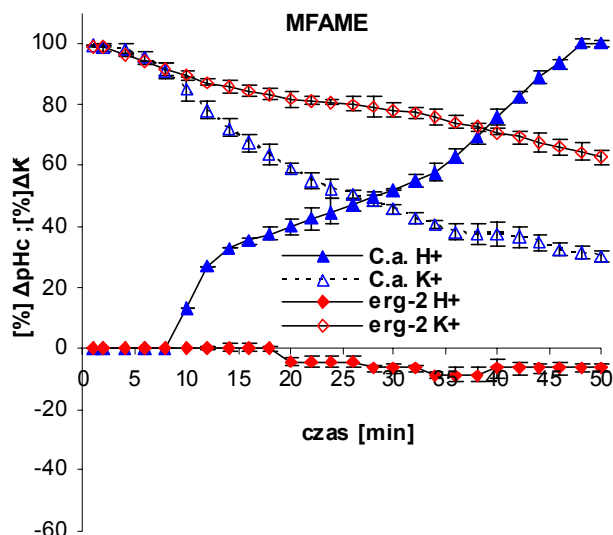
Tylko w przypadku szczepu dzikiego obserwuje się, zarówno w wyniku działania antybiotyku wyjściowego jak i pochodnych, sprzężoną wymianę potasu na proton pobierany ze środowiska. Badane związki różnią się w odniesieniu do tego

szczepu jedynie kinetyką indukowanych zmian pH i % uwalnianego potasu wewnątrzkomórkowego. Dla AmB i AMA maksymalną alkalizację notuje się po upływie ok. 30 min, podczas gdy całkowity wypływ potasu zostaje osiągnięty dopiero po ok. 50 min. W przypadku MFAME obserwowany proces jest mniej efektywny. Pobieranie protonów zachodzi znacznie wolniej, a utrata potasu jest tylko częściowa i podobnie jak dla AmB i AMA opóźniona w stosunku do migracji protonów.

Zupełnie odmiennie proces wymiany H^+/K^+ zachodzi dla mutantu. W przypadku szczepu erg-2 AmB i pochodne nie indukują alkalizacji środowiska, ale obserwuje się wypływ potasu. Uwalnianie wewnątrzkomórkowego potasu zachodzi ze zdecydowanie mniejszą wydajnością, aniżeli dla szczepu wyjściowego i nie osiąga maksymalnego poziomu.

Powyższe obserwacje mogą sugerować, że chociaż mutanty erg- pozostają wrażliwe na działanie badanych związków, to możliwym jest występowanie tutaj różnych mechanizmów permeabilizacji błony. Obecność ergosterolu umożliwia formowanie specyficznych kanałów, podczas gdy oddziaływanie z intermediatami szlaku biosyntezy ergosterolu prowadzi do efektów o charakterze działania detergentowego. Kompleksowanie z antybiotykiem jest możliwe z uwagi na zachowany szkielet sterolowy oraz obecność niezbędnej do wystąpienia oddziaływań grupy OH w pozycji 3 β .

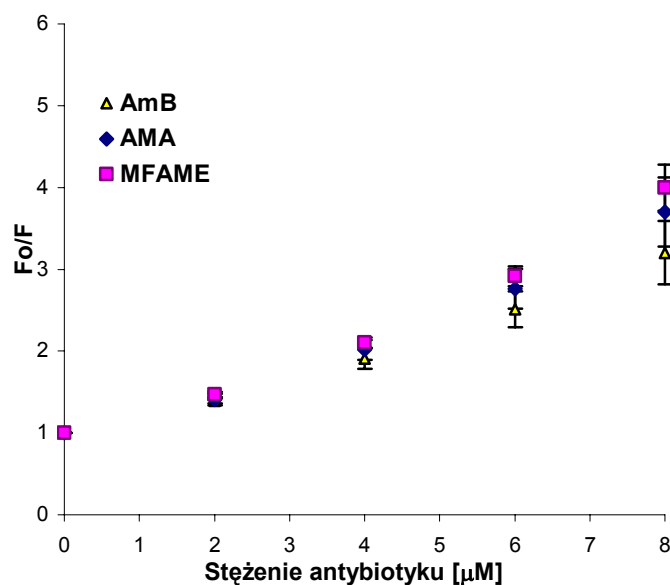




Rys. 21. Wymiana H^+/K^+ indukowana przez $10 \mu M$ stężenia: AmB, AMA i MFAME w komórkach szczepu wyjściowego C.a. i mutantu erg-2.

5.2.3. Oddziaływanie z błonami komórek grzybowych oznaczane fluorescencyjną metodą transferu energii

W celu wykazania, czy modyfikacje chemiczne cząsteczki AmB wpływają na oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami antybiotyku i sondy wyznaczono dla wszystkich badanych związków zależność $F_0/F = f(c)$ w środowisku DMSO (Rys. 22). Zarówno dla AMA jak i MFAME uzyskano, podobną ilościowo, zależność liniową wydajności wygaszania fluorescencji od stężenia antybiotyku tak jak w przypadku antybiotyku wyjściowego.



Rys. 22. Zależność $F_0/F = f(c)$ dla AmB i pochodnych. Rosnące stężenie antybiotyku dodawano porcjami do roztworu DMSO zawierającego sondę fluorescencyjną TMA-DPH ($2 \mu M$). Pomiar prowadzono w $37^\circ C$, przy długościach fal 365 nm (wzbudzenie) i 427 nm (emisja).

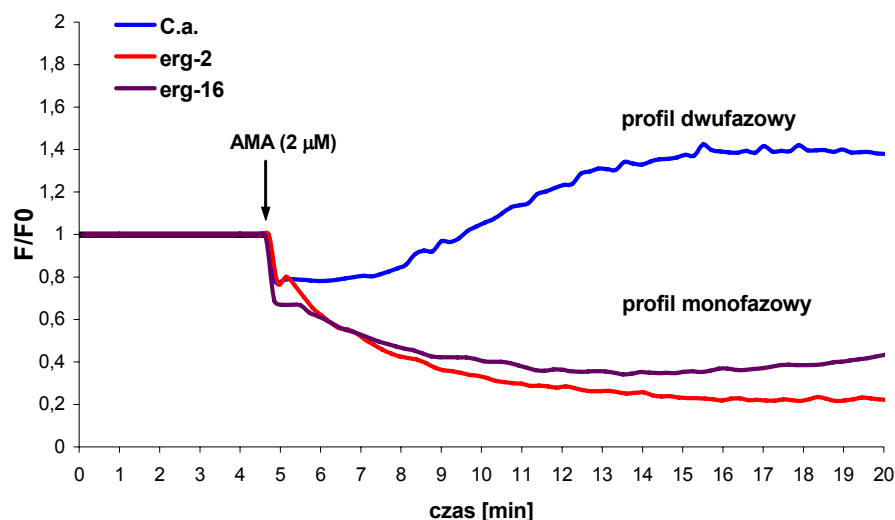
Oznaczenie oddziaływania antybiotyk-komórka metoda fluorescencyjną wykonano dla szczepu wyjściowego C.a oraz mutantów erg-2 i erg-16 dla dwóch stężeń badanych antybiotyków tj. 2 i 5 μM . Pomiar przeprowadzono w zawiesinie komórek w 0,9% NaCl. Stwierdzono, iż w tych warunkach, w obu stosowanych stężeniach, badane komórki zachowują żywotność. Żywotność weryfikowano w oparciu o zdolność komórek grzybowych traktowanych antybiotykiem (inkubacja 30 min, 37°C) do tworzenia kolonii (c.f.u.), p. 4.2.4.2. Poniżej (Tabela 8) zestawiono wartości c.f.u. wyznaczone dla szczepu standardowego C.a. oraz mutantu erg-2.

Tabela 8. Zestawienie wartości c.f.u. dla szczepu standardowego *C. albicans* (C.a.) oraz mutantu erg-2.

Szczep	Stężenie antybiotyku [μM]	komórki żywe w % kontroli
<i>Candida albicans</i> (C.a.)	2	100
	5	90
erg-2	2	100
	5	85,9

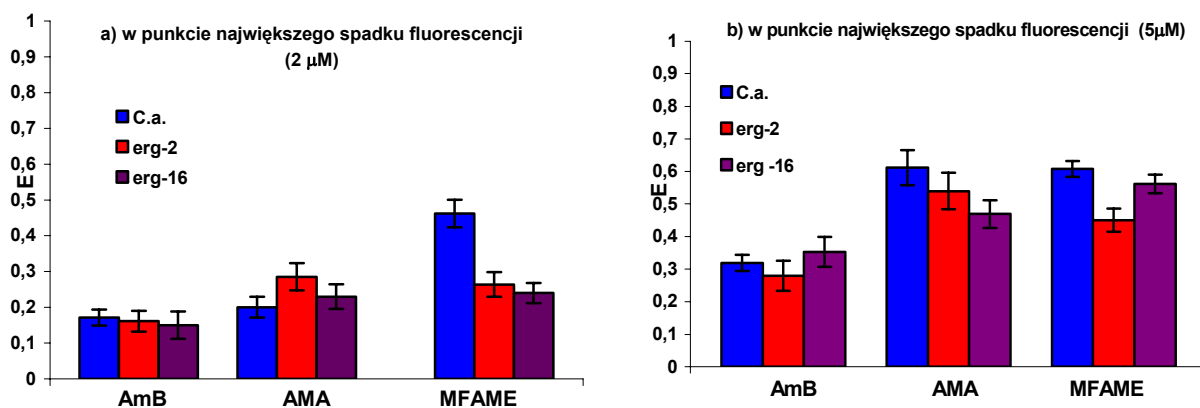
Zawiesiny komórek po 30 min inkubacji z antybiotykiem w 37°C wysiewano na podłoże agarowe wzbogacone w 0,9% NaCl.

Jako miarę wiązania antybiotyku z błoną zastosowano wydajność transferu energii (E) pomiędzy sondą fluorescencyjną inkorporowaną do błony a antybiotykiem. Wartość tego parametru wyznaczano w punkcie największego spadku fluorescencji. Taki sposób postępowania wynikał z charakteru przebiegu profili wygaszania fluorescencji (Rys. 23).



Rys. 23. Profil wygaszania fluorescencji TMA-DPH dla szczepu wyjściowego *C. a.* oraz mutantów ergosterolowych w obecności 2 μ M AMA. F_0 – intensywność fluorescencji przed dodaniem antybiotyku do zawiesiny komórek; F – intensywność fluorescencji po dodaniu antybiotyku do zawiesiny komórek (skorygowana ze względu na poprawkę na absorpcję).

Poniżej zestawiono wydajność transferu energii między TMA-DPH a AmB i badanymi pochodnymi dla szczepu wyjściowego *C.a.* oraz mutantów ergosterolowych, *erg-2* i *erg-16* (Rys. 24).



Rys. 24. Wydajność transferu energii między sondą błonową a AmB i pochodnymi zastosowanymi w stężeniach 2 μ M (a) i 5 μ M (b).

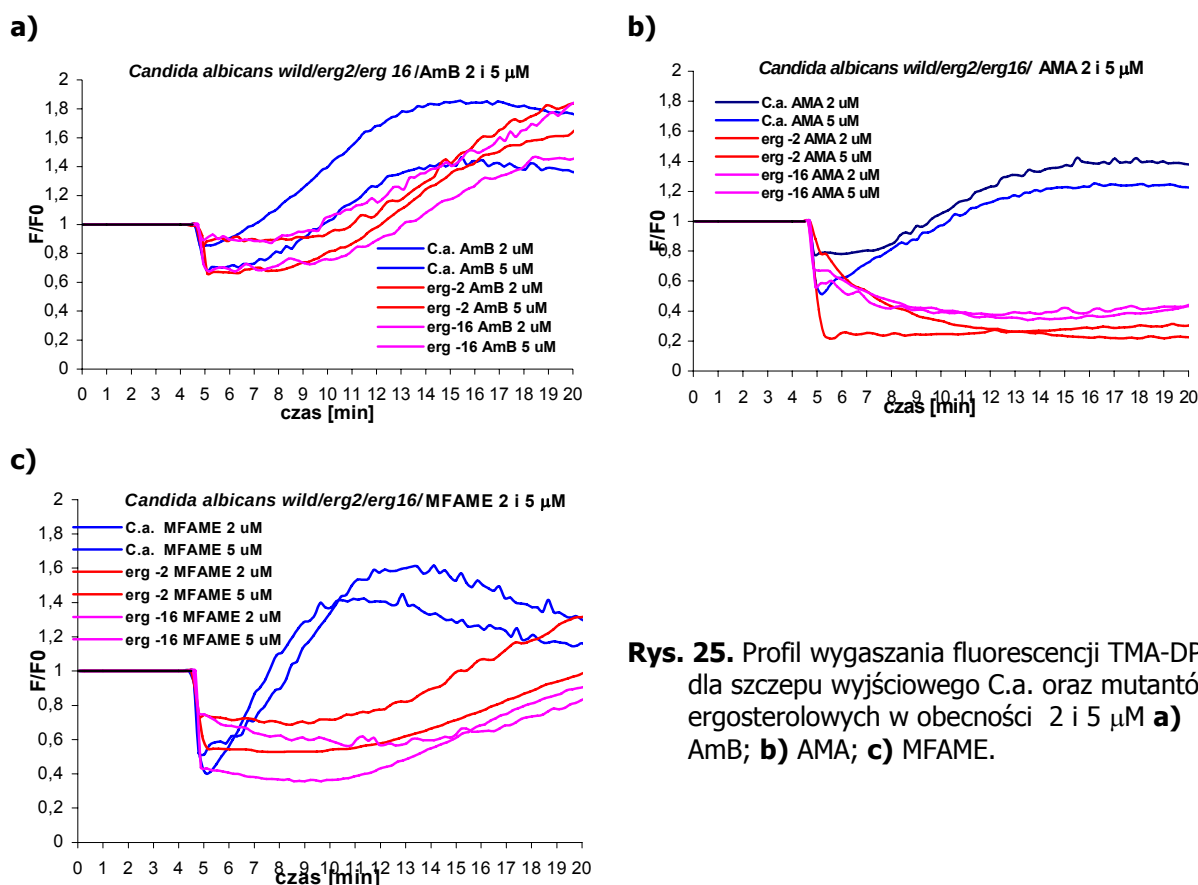
Jak wynika z powyższego zestawienia, wydajność transferu energii, wyznaczona dla AmB i pochodnych, przyjmuje zbliżone wartości w komórkach szczepu dzikiego (*C.a.*) jak i mutantów (*erg-2*, *erg-16*) posiadających defekt w szlaku biosyntezy ergosterolu. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują zatem na brak istnienia korelacji pomiędzy wrażliwością szczepu w stosunku do badanych związków a powinowactwem

antybiotyku do komórki. Zdolność oddziaływania antybiotyku z komórką nie jest więc determinowana wyłącznie obecnością i strukturą sterolu. Jak wykazano wcześniej [96,97] istotną rolę odgrywa tutaj duże powinowactwo AmB i jej pochodnych do fosfolipidów błonowych.

Należy zwrócić uwagę na różny sposób „zachowania się” AmB i pochodnych w błonie badanych szczepów, czego odzwierciedleniem jest występowanie dwóch typów wygaszania fluorescencji tj.:

- **przebieg monofazowy** - czyli szybki spadek intensywności fluorescencji do relatywnie stabilnego poziomu po dodaniu polieny
- **przebieg dwufazowy** - szybkie wygaszanie po dodaniu polieny, a następnie wzrost intensywności fluorescencji powyżej poziomu wyjściowego.

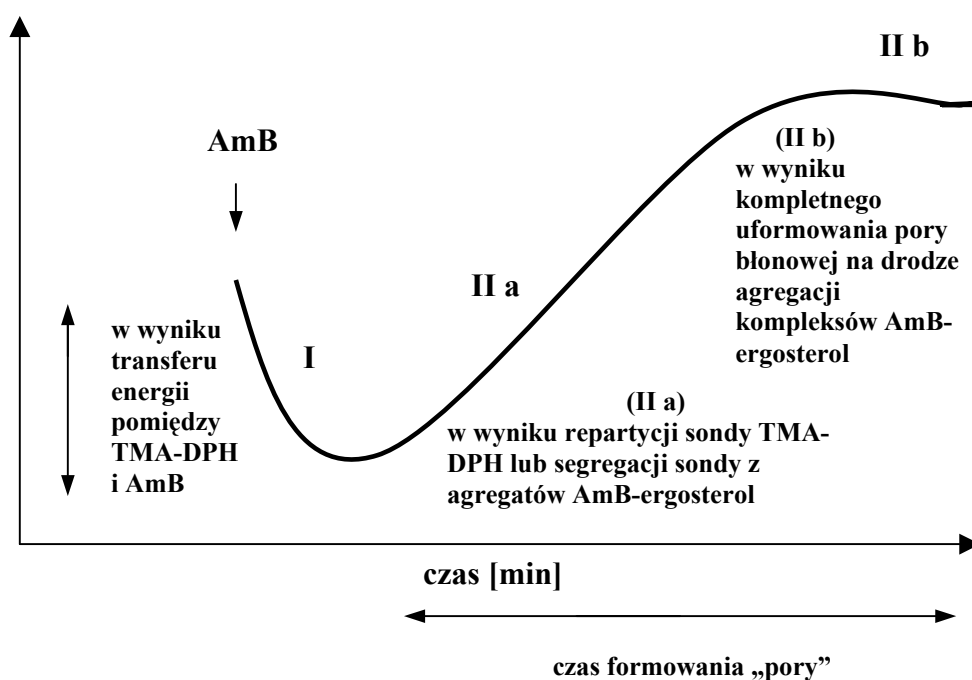
Przykładowy przebieg omawianych profili wygaszania fluorescencji przedstawiono na rysunku (Rys. 25).



Rys. 25. Profil wygaszania fluorescencji TMA-DPH dla szczepu wyjściowego C.a. oraz mutantów ergosterolowych w obecności 2 i 5 μM **a)** AmB; **b)** AMA; **c)** MFAME.

Zestawienie kinetyk wygaszania fluorescencji ze względu na typ badanego szczepu oraz rodzaj stosowanego antybiotyku (Rys. 25) wskazuje, iż dla szczepu wyjściowego C.a. profil dwufazowy występuje w przypadku wszystkich testowanych związków, podczas gdy dla mutantów ergosterolowych ten typ wygaszania fluorescencji można zaobserwować tylko w przypadku AmB. Pochodne, AMA i MFAME, w zakresie obu stosowanych stężeń, indukują jednofazową kinetykę wygaszania fluorescencji.

Dwa typy profili wygaszania fluorescencji były uprzednio obserwowane przez Haynes'a i współaut. [191], którzy w oparciu o metodę fluorescencyjną badali oddziaływanie amfoterycyny B z wrażliwymi i opornymi komórkami *Cryptococcus neoformans*. Oporność testowanego szczepu, izolowanego od pacjentów cierpiących na AIDS, wynikała z defektu w szlaku biosyntezy ergosterolu. Według proponowanej przez Haynes'a koncepcji, zilustrowanej na Rys. 26, spadek intensywności fluorescencji obserwowany w pierwszej fazie procesu jest konsekwencją transferu energii pomiędzy związanymi z błoną cząsteczkami sondy (donor) i antybiotyku (akceptor). Zmiany intensywności fluorescencji w drugiej fazie są skutkiem gromadzenia się antybiotyku w obszarach błony bogatych w sterol i formowaniem się transbłonowych kanałów przez kompleksy AmB-sterol.



Rys. 26. Interpretacja zmian profilu wygaszania fluorescencji TMA-DPH indukowanych przez AmB [191].

Według tych autorów [191] jednofazowy profil fluorescencji obserwowany w przypadku opornego szczepu *C. neoformans* świadczy o braku zdolności AmB do formowania kompleksów ze sterolami o zmienionej budowie, co w efekcie uniemożliwia powstawanie kanałów błonowych. Niemniej jednak biorąc pod uwagę przedstawione powyżej wyniki uzyskane dla mutantów erosterolowych *C. albicans* można stwierdzić, iż dwufazowy profil wygaszania fluorescencji nie zawsze musi wiązać się jedynie z tworzeniem kanałowych struktur permeabilizujących błonę. Istotne znaczenie może mieć tutaj typ akumulowanych w błonie szczepów erg-2 i erg-16 steroli o zmodyfikowanej w stosunku do ergosterolu strukturze, które nie prowadząc do kondensacji antybiotyku w obszarze ich występowania umożliwiają cząsteczkom antybiotyku na pozostawanie w formie kompleksów z fosfolipidami.

5.3. Aktywność w stosunku do standardowego szczepu *Saccharomyces cerevisiae* i mutantów wielolekoopornych

5.3.1. Aktywność przeciwgrzybowa (MIC, MFC)

Aktywność grzybobójczą (MIC) i grzybobójczą (MFC) wyznaczono dla siedmiu wielolekoopornych szczepów *S. cerevisiae* reprezentujących różne mechanizmy oporności (nadekspresja białkowych transporterów błonowych typu ABC i MFS lub białka homologicznego do cytochromu P450alk). Oznaczenia wykonano dla AmB jako związku referencyjnego oraz pochodnych: AMA (dla wszystkich szczepów) i MFAME (dla 3 wybranych szczepów). W oparciu o uzyskane wyniki, zestawione w Tabeli 9, można stwierdzić, iż szczepy, których oporność opiera się na funkcjonowaniu błonowych pomp eksportujących typu MFS (CaMDR1) są podobnie wrażliwe na działanie AmB i badanych pochodnych, jak szczepy, z których się wywodzą. Dla wszystkich tych szczepów aktywność cytotoksyczna testowanych związków jest 2-krotnie niższa niż aktywność cytostatyczna. Podobną zależność obserwuje się również dla szczepu ADNC-36, którego oporność związana jest z nadekspresją białka homologicznego do cytochromu P450 indukowanego przez alkany. Z kolei mutanty ADCDR1 oraz ADCDR2, zawierające pompy ABC są 2-krotnie mniej wrażliwe na działanie AmB i pochodnych aniżeli szczep wyjściowy, AD1234568. AmB działa

bójczo w stosunku do tych szczepów w stężeniu 2-krotnie wyższym niż to, które wymagane jest do zahamowania wzrostu. Natomiast dla AMA i MFAME aktywność cytostatyczna i cytotoksyczna są jednakowe.

Do dalszych badań, dotyczących szczegółowych mechanizmów działania AmB i wybranych pochodnych na wielolekooporne komórki grzybowe wyselekcjonowane zostały 3 szczepy tj. **AD1234568** i jego mutanty: **ADCDR2** oraz **ADCaMDR1**.

Tabela 9. Aktywność grzybostatyczna i grzybobójcza AmB i badanych pochodnych.

Szczep	Związek	MIC[μ M]	MFC[μ M]
AD1234568	AmB	0,1	0,27
	AMA	0,2	0,4
	MFAME	0,4	0,8
ADCDR2	AmB	0,27	0,54
	AMA	0,4	0,4
	MFAME	0,8	0,8
ADCaMDR1	AmB	0,1	0,27
	AMA	0,2	0,4
	MFAME	0,4	0,8
ADCDR1	AmB	0,27	0,54
	AMA	0,4	0,4
JG436	AmB	0,27	0,54
	AMA	0,2	0,4
JGCaMDR1	AmB	0,27	0,54
	AMA	0,2	0,4
ADNC-36	AmB	0,27	0,54
	AMA	0,2	0,4

Komórki inkubowano z antybiotykiem 48 godz. w temp. 30°C. Gęstość optyczną zawiesiny oznaczano przy długości fali $\lambda = 660$ nm.

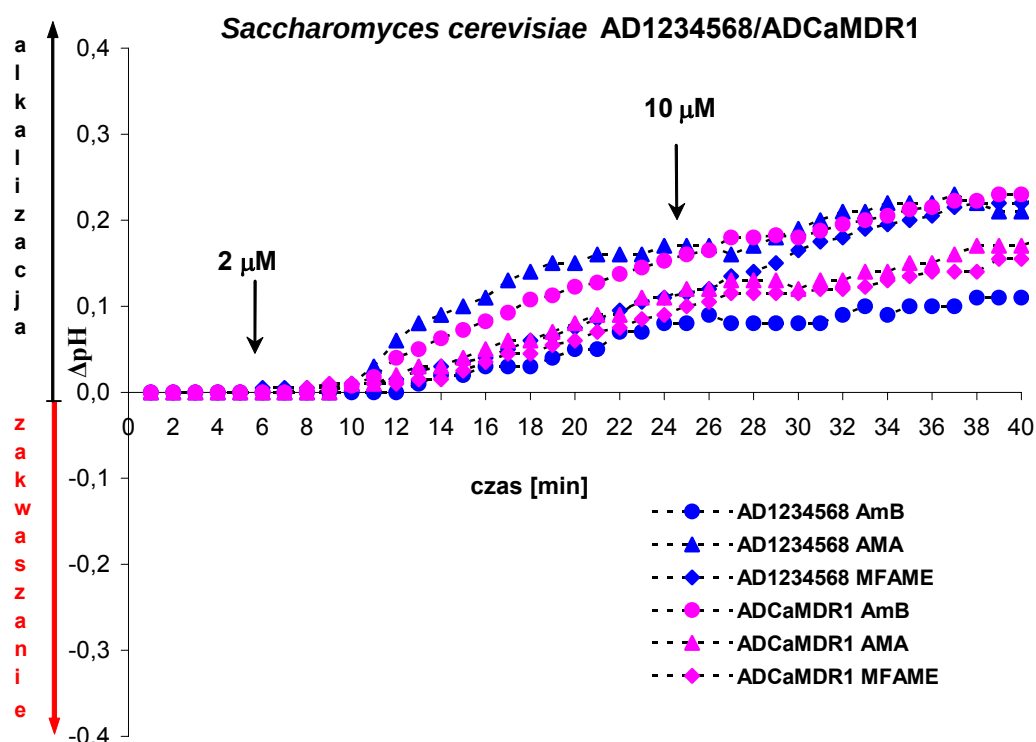
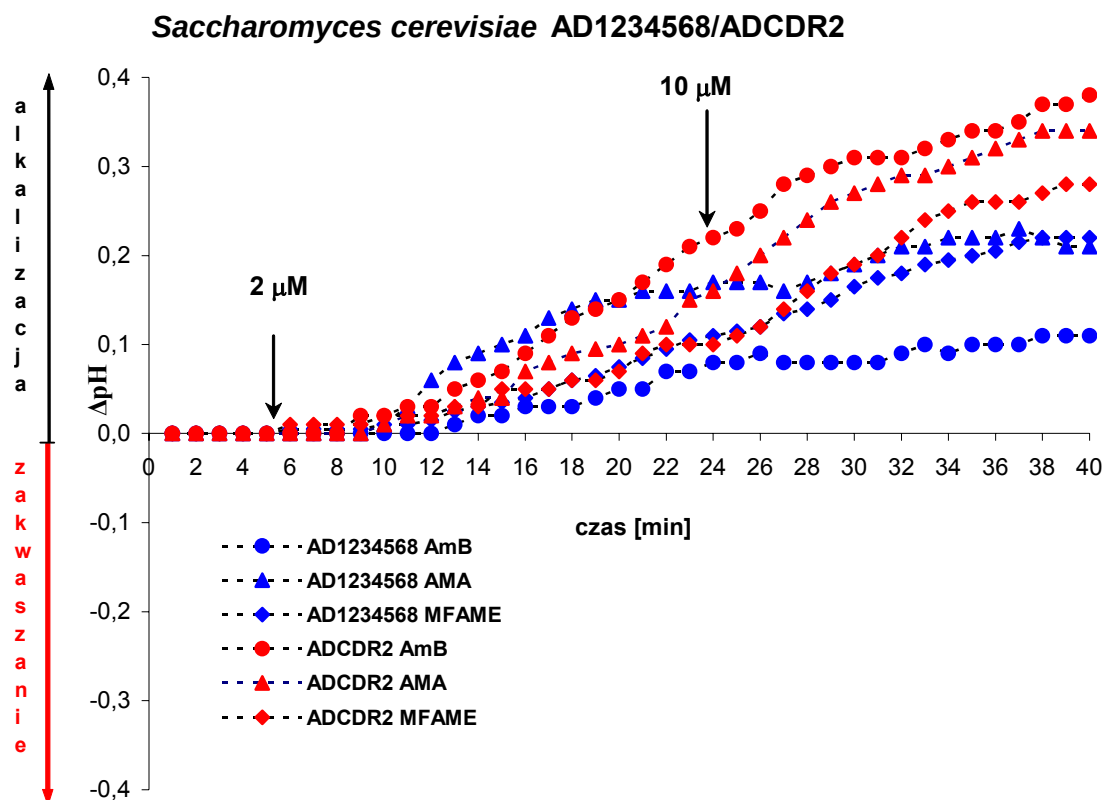
5.3.2. Aktywność permeabilizacyjna

Aktywność permeabilizacyjną AmB i pochodnych w stosunku do szczepu wyjściowego **AD1234568** oraz mutantów MDR; **ADCaMDR1** i **ADCDR2**

scharakteryzowano w oparciu o ruch protonów (badanie zmian pH), jak i wpływ potasu wewnątrzkomórkowego z komórek poddanych działaniu antybiotyku. Określono również zależność pomiędzy tymi dwoma procesami w oparciu o monitorowanie wymiany H^+/K^+ jednocześnie w tej samej zawieszynie komórek.

5.3.2.1. Ruch protonów (ΔpH) w komórkach grzybów

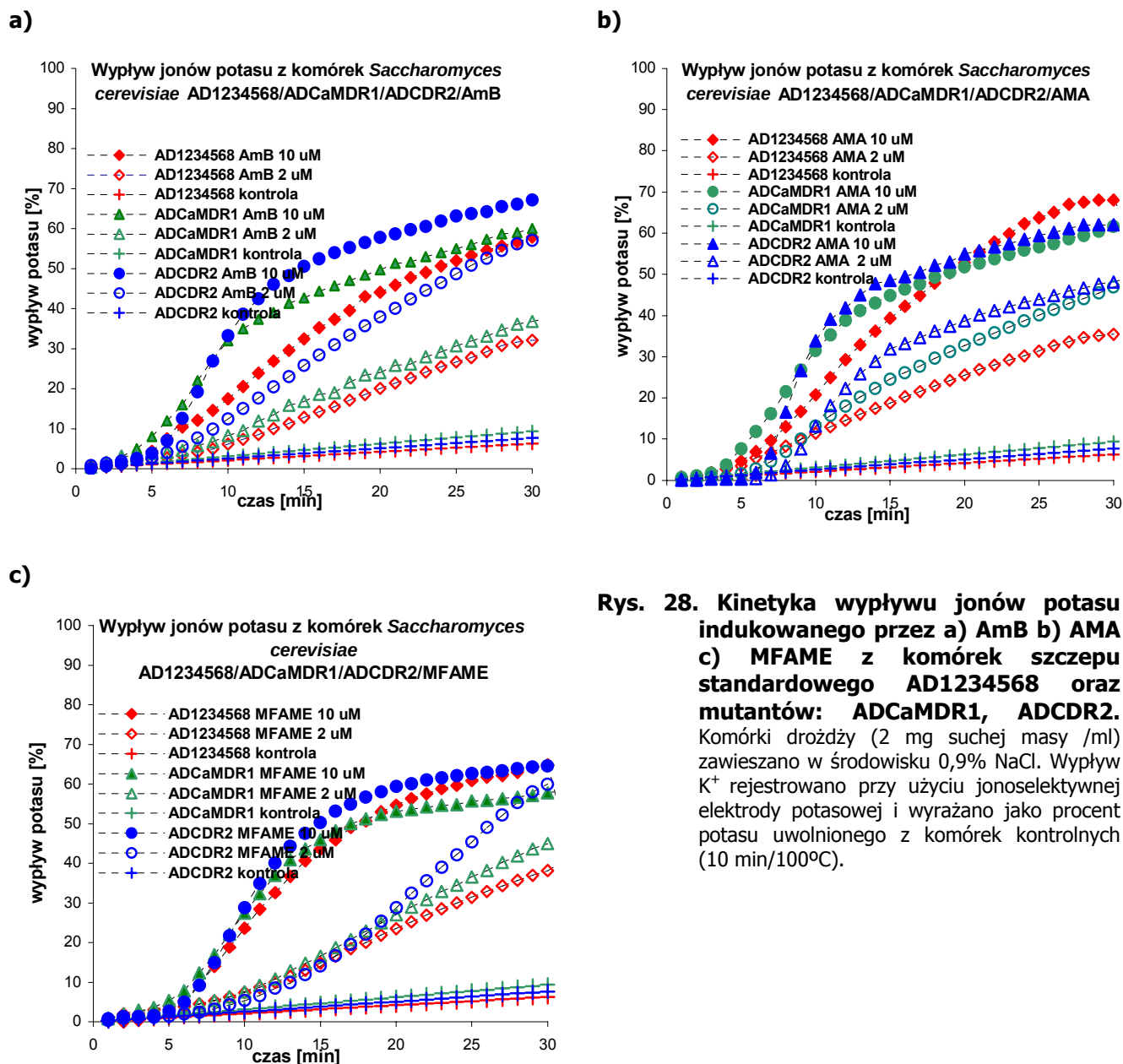
Przebieg zmian pH w czasie, indukowanych przez AmB i pochodne, w komórkach szczepów wielolekoopornych *S. cerevisiae* śledzono w niebuforowanym środowisku. W przypadku wszystkich testowanych szczepów, niezależnie od rodzaju posiadanych przez nie błonowych pomp eksportujących, w wyniku działania antybiotyku wyjściowego jak i pochodnych dochodzi do alkalizacji środowiska. Różnice pomiędzy poszczególnymi szczepami występują tylko w odniesieniu do kinetyki i wielkości indukowanych zmian pH. Na Rys. 27 porównano kinetykę ruchu protonów ($\Delta pH=f(t)$) dla szczepu wyjściowego i odpowiednio, mutantu ADCDR2 oraz ADCaMDR1. Największe zmiany pH indukowane zarówno przez AmB jak i pochodne wykazuje szczep ADCDR2, zawierający transporter białkowy typu ABC. Szczep ten jest zdecydowanie bardziej wrażliwy na wszystkie badane związki aniżeli szczep wyjściowy. Podobną prawidłowość stwierdzono również dla szczepu ADCDR1 (dane niezilustrowane). Z kolei w przypadku szczepu ADCaMDR1, którego oporność jest związana z funkcjonowaniem pompy typu MFS, obserwowane dla AMA i MFAME zmiany pH są mniejsze w porównaniu do zmian indukowanych w komórkach szczepu AD1234568. Niemniej jednak wrażliwość tego szczepu w stosunku do AmB jest zdecydowanie większa niż szczepu wyjściowego.



Rys. 27. Kinetyka ruchu protonów ($\Delta\text{pH} = f(t)$) dla szczepu standardowego AD1234568 oraz mutantów MDR: ADCaMDR1, ADCDR2 indukowana przez AmB i pochodne. Komórki drożdży zawieszano w środowisku wody dejonizowanej; stężenie końcowe komórek 2 mg suchej masy/ml.

5.3.2.2. Wpływ jonów potasu

Poziom uwalniania jonów potasu z komórek szczepów wielolekoopornych *S. cerevisiae* w wyniku działania AmB i pochodnych, zastosowanych w stężeniach 2 i 10 μM , przedstawiono w % kontroli (Rys. 28).



Rys. 28. Kinetyka wypływu jonów potasu indukowanego przez a) AmB b) AMA c) MFAME z komórek szczepu standardowego AD1234568 oraz mutantów: ADCaMDR1, ADCDR2. Komórki drożdży (2 mg suchej masy /ml) zawieszano w środowisku 0,9% NaCl. Wpływ K^+ rejestrowano przy użyciu jonoselektywnej elektrody potasowej i wyrażano jako procent potasu uwolnionego z komórek kontrolnych (10 min/100°C).

W przypadku wszystkich badanych szczepów obserwuje się tylko częściową utratę potasu. Maksymalny poziom uwalnianego potasu notowany dla stężenia 10 μM po upływie 30 min nie przekracza 70%. Celem porównania aktywności permeabilizacyjnej AmB i testowanych pochodnych, z uwagi na powolne tempo wypływu potasu, wyznaczono t_{30} , czyli czas wypływu 30% potasu

wewnątrzkomórkowego z komórek grzybowych traktowanych antybiotykiem o stężeniu 10 μM (Tabela 10).

Tabela 10. Zestawienie wartości t_{30} dla szczepu standardowego *S. cerevisiae* oraz mutantów MDR.

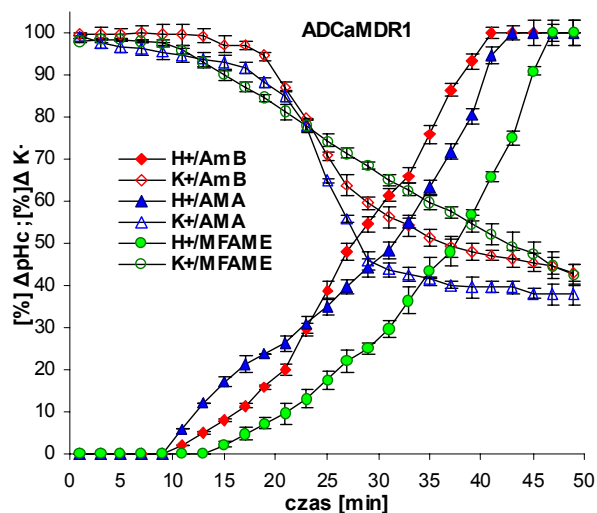
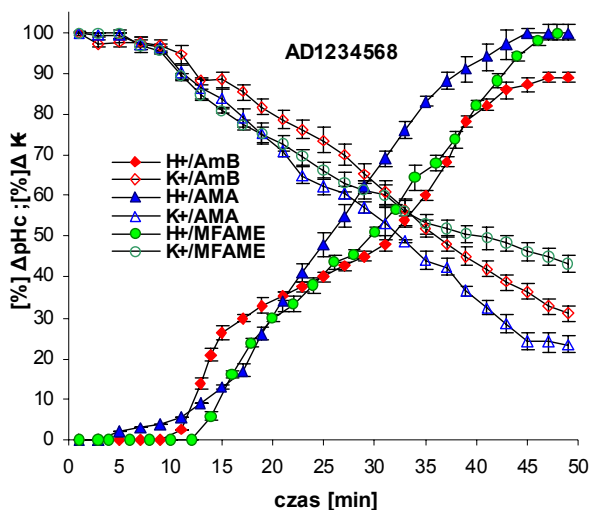
Związek	t_{30} [min]		
	AD1234568	ADCaMDR1	ADCDR2
AmB	12,5 $\pm$ 1,7	15,0 $\pm$ 1,4	10,8 $\pm$ 1,8
AMA	12,0 $\pm$ 0,9	10,2 $\pm$ 1,3	9,3 $\pm$ 1,3
MFAME	11,8 $\pm$ 0,4	10,5 $\pm$ 1,4	10,0 $\pm$ 0,8

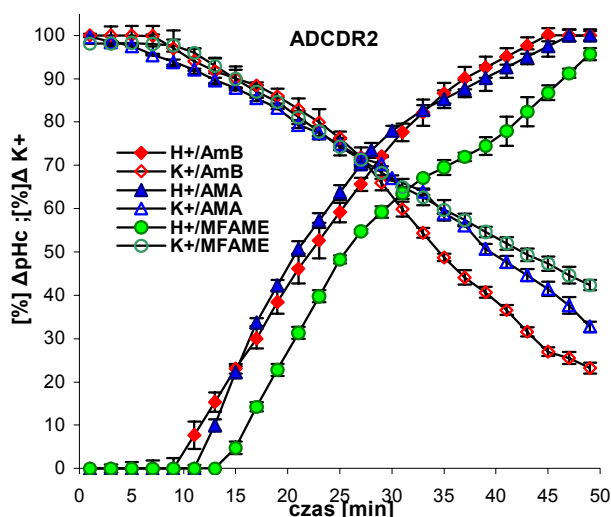
t_{30} - czas wypływu 30% potasu wewnątrzkomórkowego z komórek grzybowych traktowanych antybiotykiem o stężeniu 10 μM

Uzyskane wyniki wskazują, iż wrażliwość wszystkich badanych szczepów, niezależnie od typu posiadanych przez nie błonowych pomp eksportujących, w stosunku do AmB i pochodnych jest podobna. Wartości t_{30} wyznaczone dla testowanych antybiotyków są zbliżone i nie obserwuje się znaczących różnic.

5.3.2.3. Kinetyka wymiany H^+/K^+

Zależność między indukowaną przez antybiotyk dyfuzją jonów potasu i protonów badano w oparciu o kinetykę wymiany H^+/K^+ jednocześnie w tej samej zawieszynie komórek. AmB i pochodne zastosowano do pomiarów w stężeniu 10 μM . Wyniki, przedstawione w postaci zależności ($\% \Delta\text{pH}_c$; $\% \Delta\text{K}^+ = f(t)$) zestawiono poniżej (Rys. 29).





Rys. 29. Wymiana H^+/K^+ indukowana przez $10 \mu M$ stężenia AmB, AMA i MFAME w komórkach szczepu wyjściowego AD1234568 i mutantów ADCDR2 oraz ADCaMDR1.

Jak wynika z powyższego rysunku sprzężoną wymianę potasu na proton pobierany ze środowiska obserwuje się zarówno dla szczepu wyjściowego jak i mutantów wyposażonych w błonowe pompy eksportujące. AmB i pochodne indukują alkalizację środowiska, a jednocześnie uwalnianie potasu wewnątrzkomórkowego.

Podsumowując, można stwierdzić, iż:

- mutanty MDR, wykazują podobną wrażliwość w stosunku do AmB oraz badanych pochodnych jak szczep, z którego się wywodzą
- permeabilizacja, mierzona ruchem protonów H^+ oraz wpływem potasu K^+ , indukowana przez badane związki zachodzi ze zbliżoną wydajnością w komórkach szczepu wyjściowego oraz mutantów MDR.

5.3.3. Oddziaływanie komórek drożdżowych oznaczane fluorescencyjną metodą transferu energii

Powinowactwo AmB i pochodnych do wielolekoopornych komórek *S. cerevisiae* badano w oparciu o fluorescencyjną metodę transferu energii, przy użyciu sondy TMA-DPH. Oznaczenie wykonano dla dwóch stężeń badanych antybiotyków: 2 i $5 \mu M$. Pomiar przeprowadzono w zawiesinie komórek w $0,1 M$ KCl. Stwierdzono, iż w tym środowisku, badane komórki zachowują żywotność po zakończeniu doświadczenia. Pierwotnie zakładano wykonanie pomiarów w środowisku $0,9\%$ NaCl. Okazało się to jednak niemożliwe, ze względu na znacznie zredukowaną żywotność. Poniżej (Tabela

11) porównano wartości c.f.u. wyznaczone dla szczepu wyjściowego AD1234568 w środowisku 0,9% NaCl oraz 0,1 M KCl w obecności AmB.

Tabela 11. Zestawienie wartości c.f.u. dla szczepu wyjściowego AD1234568.

Szczep: AD1234568	AmB [μM]	komórki żywe w % kontroli
0,9 % NaCl	2	54,5
	5	18,6
0,1 M KCl	2	100
	5	70,4

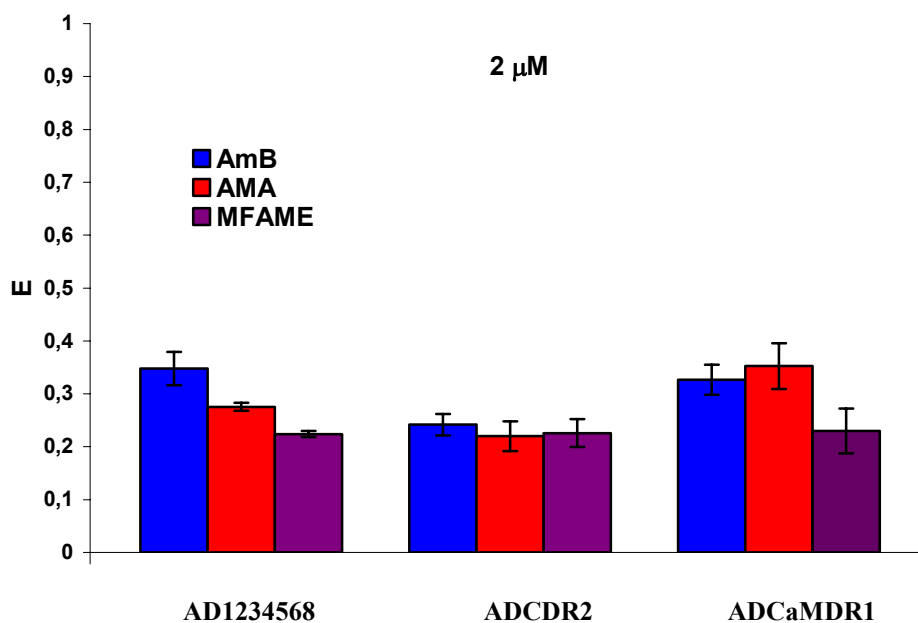
Zawiesiny komórek po 30 min inkubacji z AmB w 37°C wysiewano na podłoże agarowe wzbogacone odpowiednio w 0,9% NaCl lub 0,1 MKCl.

Radykalne różnice w przeżywalności komórek w obecności antybiotyku obserwowane w obu środowiskach można tłumaczyć „ochronnym” działaniem jonów potasu obecnych w 0,1 M KCl. W środowisku tym stężenie potasu jest w przybliżeniu równe stężeniu potasu w cytoplazmie komórek grzybowych, co w efekcie zapobiega ucieczce K^+ z komórki. Należy podkreślić, iż aktywność kanałotwórcza antybiotyku jest jednakowa w warunkach obecności i braku jonów potasu. Jednakże dyfuzja jonów potasu do komórki zapobiega zachwianiu równowagi metabolicznej. Dzięki temu uszkodzone komórki zachowują żywotność. W środowisku NaCl w komórkach uszkodzonych działaniem antybiotyku dochodzi do wymiany wewnątrzkomórkowych jonów potasu na jony sodu ze środowiska, przy czym proces wymiany K^+/Na^+ zachodzi ze zdecydowanie większą szybkością aniżeli K^+/H^+ , w konsekwencji prowadząc do śmierci komórki.

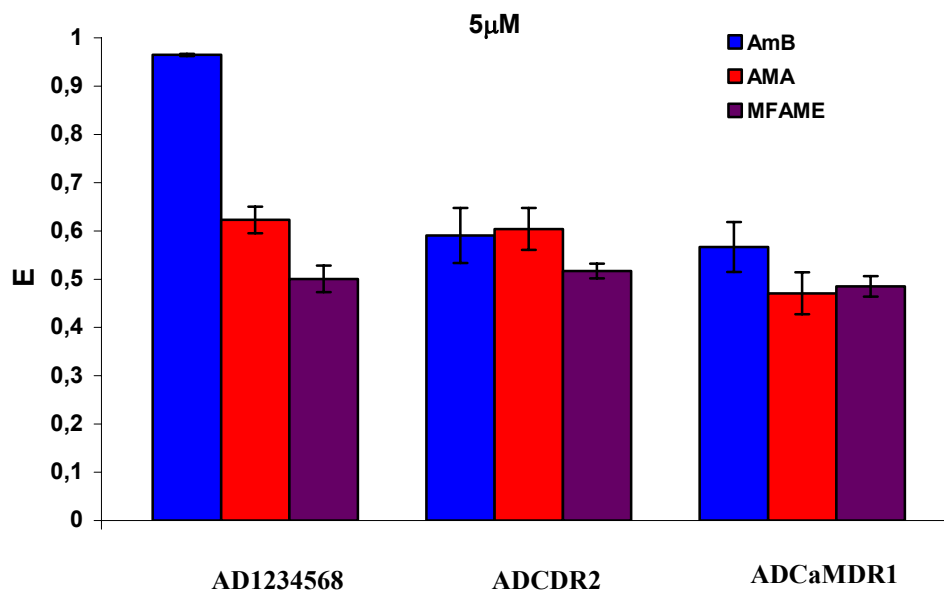
W związku z powyższym pomiary fluorymetryczne prowadzono w środowisku 0,1 M KCl.

Na Rys. 30 zestawiono wydajność transferu energii między TMA-DPH a AmB i badanymi pochodnymi dla szczepu standardowego **AD1234568** oraz mutantów **ADCaMDR1** i **ADCDR2**. Wartość E wyznaczano w punkcie największego spadku fluorescencji (Rys. 30 a, b).

a)



b)



Rys. 30. Wydajność transferu energii między sondą błonową TMA-DPH a AmB i badanymi pochodnymi w komórkach szczepu wyjściowego *S. cerevisiae* oraz mutantów MDR. Stężenie antybiotyku w środowisku: a) 2 μM ; b) 5 μM .

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż zarówno dla AmB jak i pochodnych wydajność transferu energii jest proporcjonalna do stężenia antybiotyku i

przyjmuje zbliżone wartości w przypadku wszystkich testowanych szczepów, niezależnie od typu posiadanych przez nie transporterów błonowych.

Profil wygaszania fluorescencji obserwowany dla AmB i pochodnych przyjmuje charakter dwufazowy lub monofazowy w zależności od stosowanego stężenia antybiotyku i rodzaju szczepu (Tabela 12). Zależność ta nie jest jednak ogólna. W przypadku szczepu wyjściowego AD1234568 oraz mutantu ADCDR2, w obu stosowanych stężeniach badanych antybiotyków przebieg wygaszania fluorescencji jest zasadniczo dwufazowy. Dla szczepu ADCaMDR1 z kolei przebieg ten przyjmuje charakter monofazowy dla AmB, a dla pochodnych mono- lub dwufazowy, zależnie od stężenia antybiotyku.

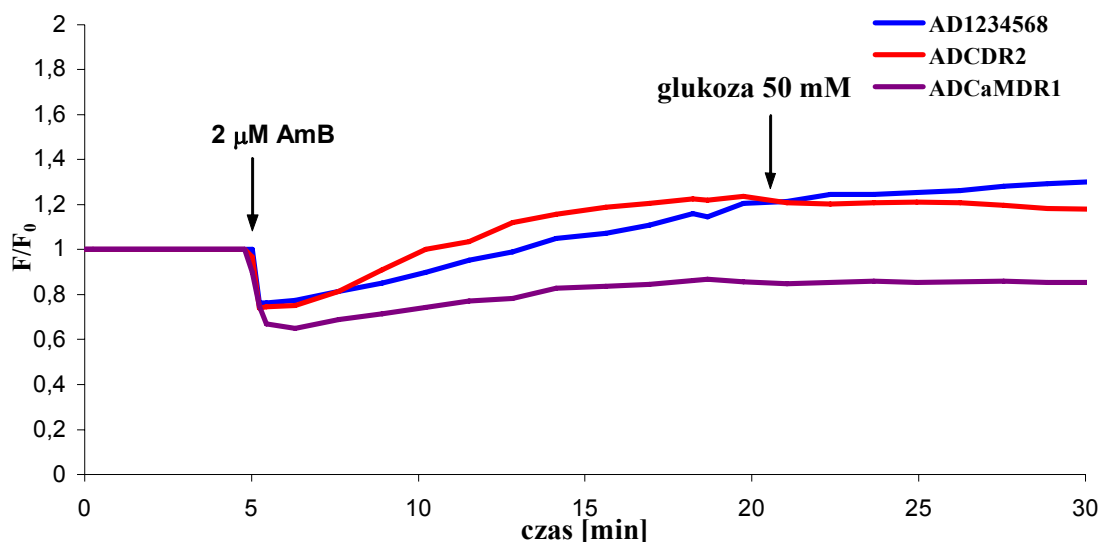
Tabela 12. Charakterystyka profilu wygaszania fluorescencji ze względu na typ badanego szczepu i stężenie związku.

		Profil wygaszania fluorescencji		
Związek	Stężenie [μ M]	AD1234568	ADCDR2	ADCaMDR1
AmB	2	dwufazowy	dwufazowy	monofazowy
	5	dwufazowy	dwufazowy	monofazowy
AMA	2	dwufazowy	dwufazowy	dwufazowy
	5	dwufazowy	monofazowy	monofazowy
MFAME	2	dwufazowy	dwufazowy	dwufazowy
	5	dwufazowy	dwufazowy	dwufazowy

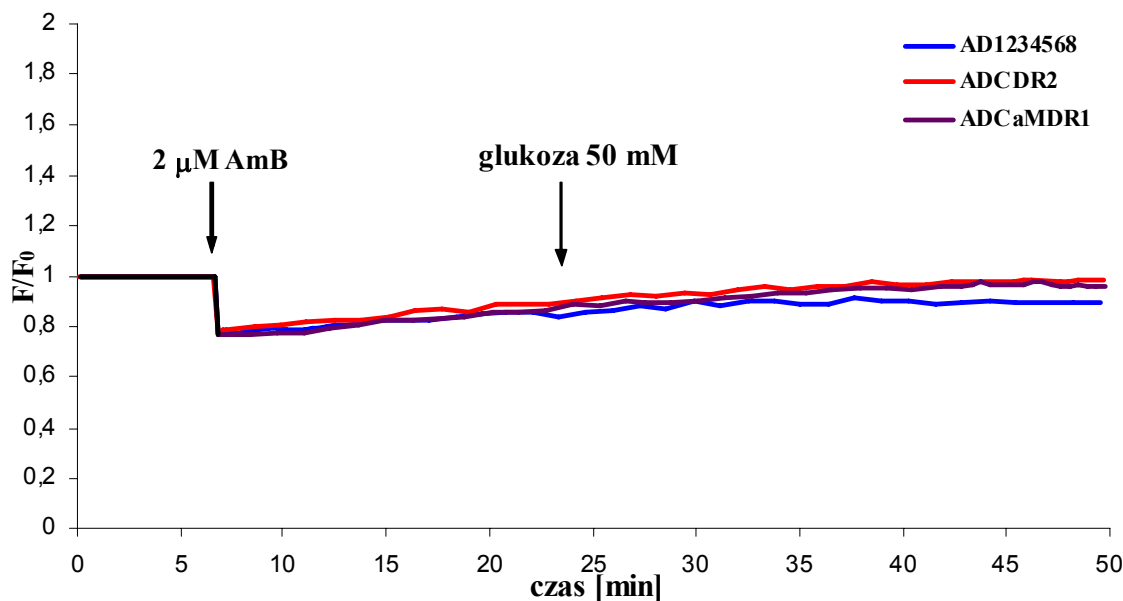
Na podstawie przeprowadzonych dotychczas badań wykazano, iż mutanty wielolekooporne *S. cerevisiae* wyposażone w pompy białkowe dwóch rodzajów ABC (ADCDR2) oraz MFS (ADCaMDR1) zachowują podobną wrażliwość jak szczep wyjściowy (AD1234568) zarówno w stosunku do AmB jak i pochodnych. Potwierdzono to zarówno w testach długiego (MIC, MFC) jak i krótkiego działania (ruch H^+ , wpływ K^+). Na tej podstawie zasugerowano, iż AmB i pochodne prawdopodobnie nie są substratami błonowych pomp eksportujących. Dla pochodnych zagadnienie to nie było dotychczas badane. W związku z tym, w kolejnym etapie badano stabilność wiązania AmB i pochodnych z błoną komórek testowanych mutantów wielolekoopornych. Oznaczenie przeprowadzono dla standardowego szczepu **AD1234568** oraz mutantów **ADCaMDR1** i **ADCDR2** w obecności 50 mM glukozy jako źródła energii. Porównano wpływ glukozy na przebieg profilu wygaszania

fluorescencji w zawieszynie komórek w 0,1 M KCl (niewirowanych) oraz komórek odwirowanych po 20 min preinkubacji z sondą i zawieszonych w świeżym podłożu. Na Rys. 31 zilustrowano profil wygaszania fluorescencji obserwowany w obu omówionych warunkach dla szczepu wyjściowego i mutantów w obecności AmB.

a)

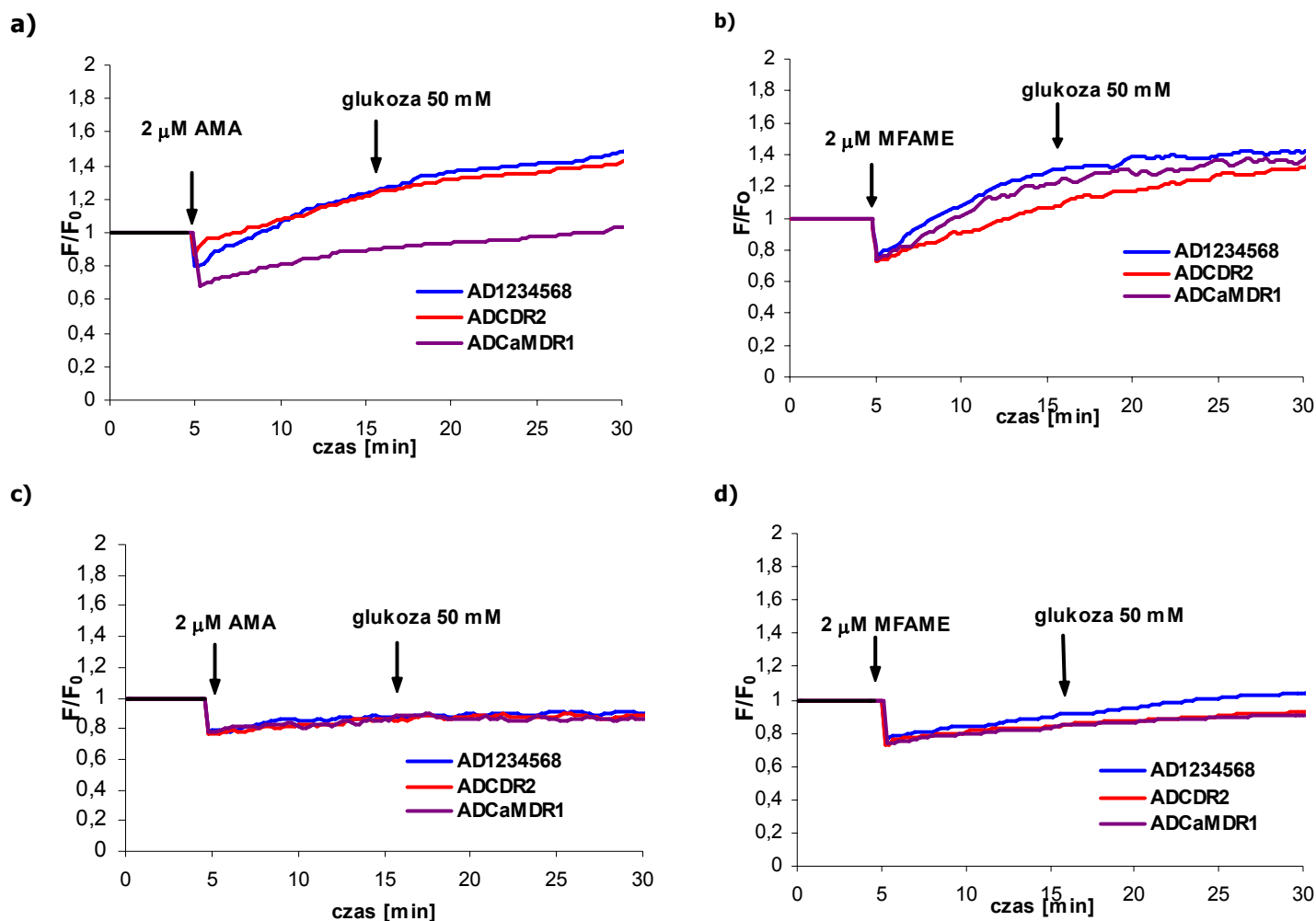


b)



Rys. 31. Profil wygaszania fluorescencji TMA-DPH dla szczepu wyjściowego *S. cerevisiae* oraz mutantów MDR w obecności AmB dodawanej do: a) komórek zawieszonych w 0,1 M KCl 5 min po TMA-DPH; b) komórek odwirowanych, zawieszonych w świeżym 0,1 M KCl po 20 min preinkubacji z TMA-DPH. F_0 – intensywność fluorescencji przed dodaniem antybiotyku do zawiesiny komórek; F – intensywność fluorescencji po dodaniu antybiotyku do zawiesiny komórek; dodatek glukozy (stężenie końcowe w zawieszynie: 50mM) 15 minut po aplikacji antybiotyku.

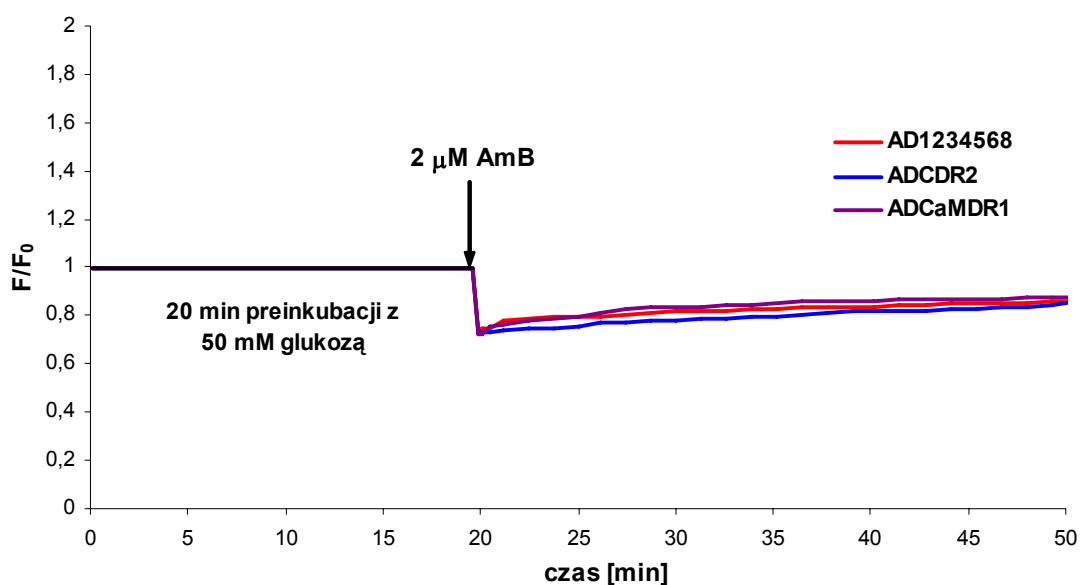
Stwierdzono, że dodatek glukozy nie wywiera wpływu na przebieg wygaszania fluorescencji w przypadku żadnego z testowanych szczepów. Zarówno w komórkach mutantu ADCDR2 jak i ADCaMDR1 nie notuje się drastycznego wzrostu fluorescencji po dodaniu glukozy jako źródła energii. Oznacza to, że uaktywnienie błonowych pomp eksportujących nie powoduje aktywnego usuwania antybiotyku z komórki. Analogiczny jak opisany wyżej pomiar przeprowadzono dla pochodnych AMA i MFAME. Wyniki zilustrowano na Rys. 32.



Rys. 32. Profil wygaszania fluorescencji TMA-DPH dla szczepu wyjściowego *S. cerevisiae* oraz mutantów MDR w obecności AMA i MFAME dodawanej do:
a) b) komórek zawieszonych w 0,1 M KCl 5 min po TMA-DPH c) d) komórek odwirowanych, zawieszonych w świeżym 0,1 M KCl po 20 min preinkubacji z TMA-DPH.

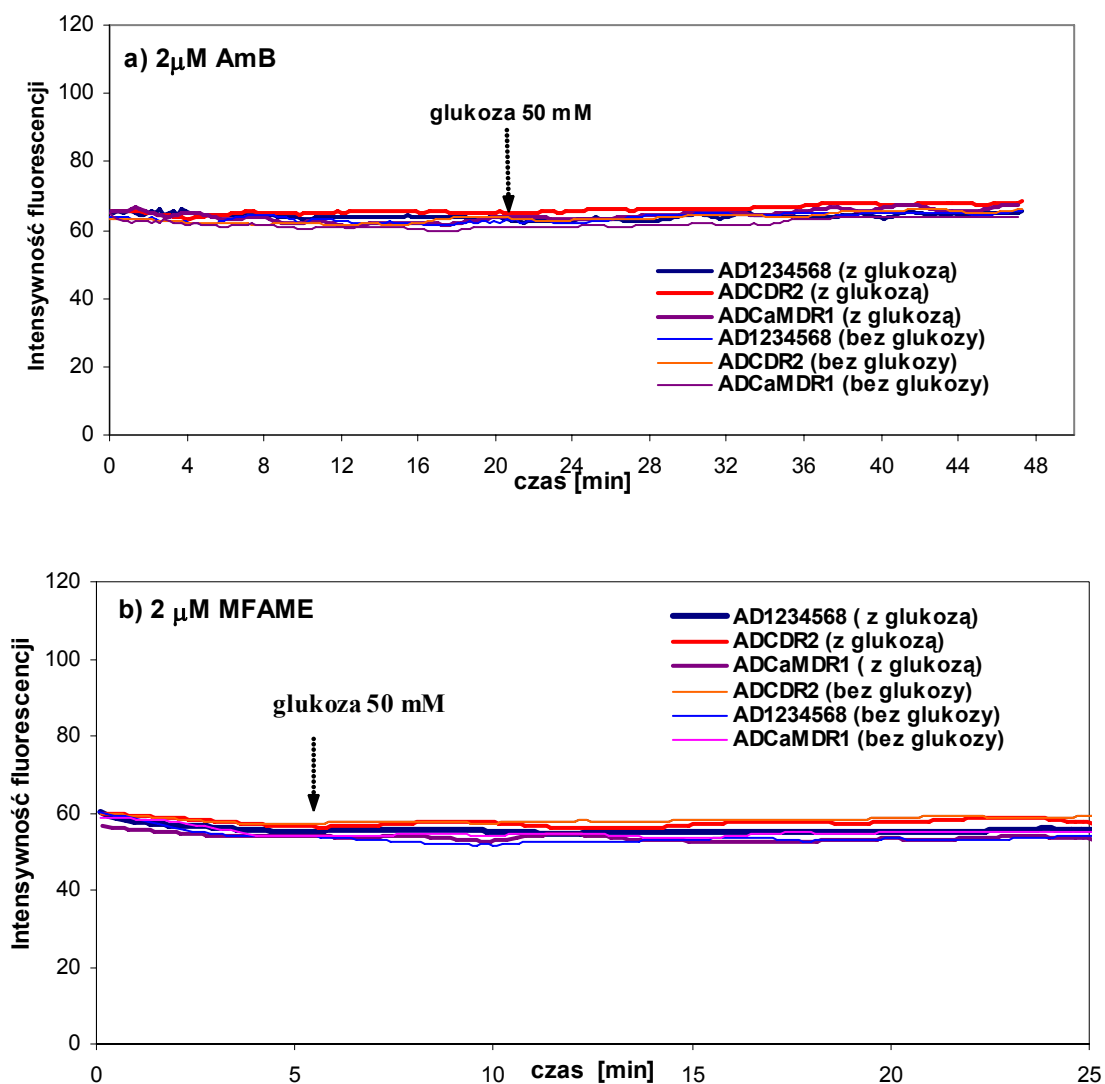
Otrzymany dla pochodnych obraz pod względem jakościowym jest zbliżony do przebiegu zarejestrowanego dla AmB. Dla komórek wirowanych celem usunięcia sondy niezwiązanej z błoną jak i niewirowanych zarówno w przypadku szczepu wyjściowego jak i mutantów nie obserwuje się wpływu glukozy na profil wygaszania fluorescencji.

Identyczne wyniki uzyskano dla AmB i pochodnych dodawanych po 20 min inkubacji ze źródłem energii do zawiesiny komórek odwirowanych preinkubowanych z TMA-DPH. Jako przykład zilustrowano poniżej kinetykę wygaszania fluorescencji w opisanych warunkach dla AmB (Rys. 33). Zasadniczo można stwierdzić, iż profil wygaszania fluorescencji dla komórek wszystkich testowanych szczepów, poddanych wirowaniu ma charakter monofazowy. Po dodaniu antybiotyku obserwuje się spadek intensywności fluorescencji, a następnie niewielki wzrost utrzymujący się na relatywnie stabilnym poziomie.



Rys. 33. Profil wygaszania fluorescencji TMA-DPH dla szczepu wyjściowego *S. cerevisiae* oraz mutantów MDR w obecności 2 µM AmB dodawanej po 20 min inkubacji z glukozą do komórek preinkubowanych z TMA-DPH, odwirowanych i zawieszonych w świeżym 0,1 M KCl.

W celu uzyskania dodatkowych dowodów eksperymentalnych, które potwierdziłyby opisane wyżej obserwacje wykonano doświadczenie, w którym komórki szczepu wyjściowego i mutantów MDR preinkubowano zarówno z sondą jak i antybiotykiem, odwirowywano celem rozdzielenia polieny związanej z błoną od polieny niezwiązanej, obecnego w środowisku i zawieszano w świeżym medium. Następnie rejestrowano dla każdego szczepu zmiany intensywności fluorescencji zarówno w obecności źródła energii (glukoza) jak i bez. Wyniki uzyskane dla toksycznej AmB i jej nietoksycznej pochodnej, MFAME pokazano na Rys. 34.



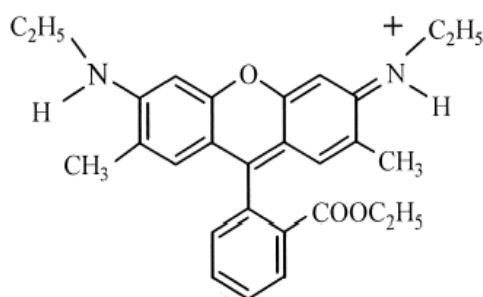
Rys. 34. Profil zmian intensywności fluorescencji TMA-DPH w komórkach szczepu wyjściowego *S. cerevisiae* oraz mutantów MDR w obecności a) 2 μ M AmbB b) 2 μ M MFAME. Komórki preinkubowane z TMA-DPH i antybiotykiem odwirowywano, przemywano i zawieszano w świeżym 0,1 M KCl. Stężenie glukozy w zawiesinie – 50mM.

Przebieg zmian intensywności fluorescencji w funkcji czasu ma taki sam liniowy charakter dla mutantów ADCaMDR1 i ADCDR2 jak dla szczepu dzikiego AD1234568 i nie zależy od obecności glukozy.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń na komórkach wielolekoopornych szczepów *S. cerevisiae* zarówno w fazie stacjonarnej, jak i metabolizujących wydają się potwierdzać przypuszczenie, iż AmB i pochodne nie są substratami błonowych pomp eksportujących obu typów tj. ABC i MFS.

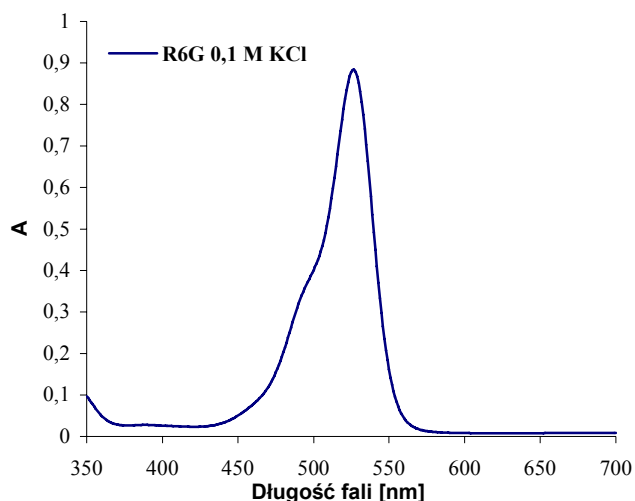
5.3.4. Działanie na komórki grzybów wielolekoopornych *S. cerevisiae* znakowanych rodaminą R6G

W celu uzyskania dalszych dowodów eksperymentalnych potwierdzających zaproponowaną w poprzednim rozdziale niniejszej rozprawy hipotezę, iż AmB i jej pochodne nie są substratami błonowych pomp eksportujących, przeprowadzono eksperymenty z komórkami szczepów wielolekoopornych znakowanych rodaminą R6G. Ten kationowy barwnik fluorescencyjny (Rys. 35) jest transportowany „z” i „do” komórek wielu organizmów, które wykazują oporność wielolekową, od drożdży po komórki ssaków [200]. Jako dobrze poznany substrat kilku transporterów typu ABC, łącznie z Cdr1p i Cdr2p, R6G szeroko stosuje się w badaniach aktywności eksportu tych pomp [163,176,186,192].



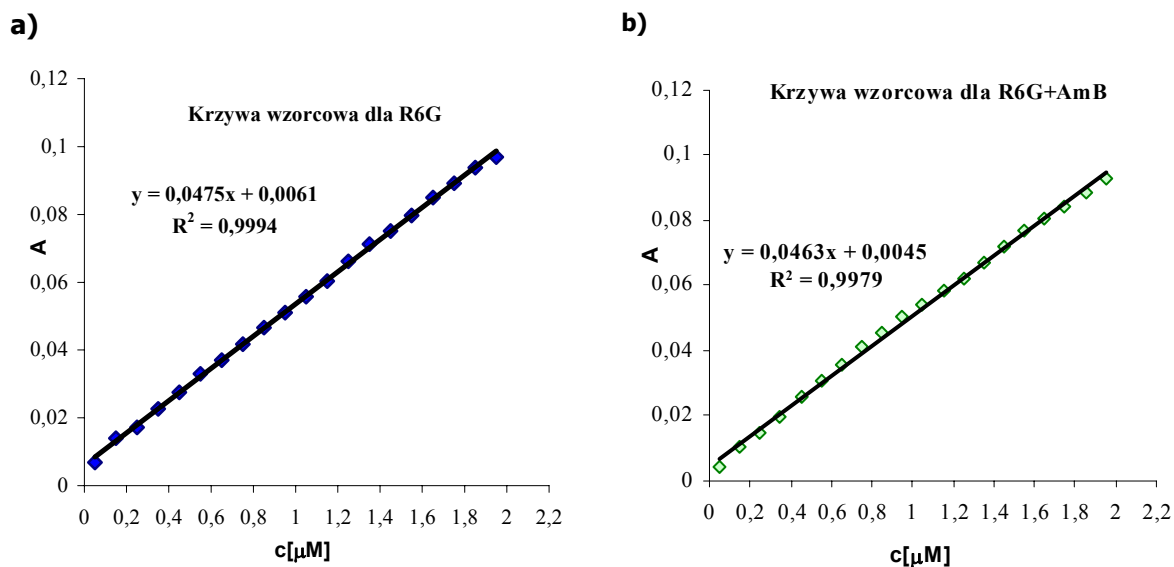
Rys. 35. Struktura chemiczna rodaminy 6 G.

Przeprowadzono porównawcze badania zdolności do eksportu R6G przez komórki szczepu wyjściowego AD1234568 oraz jego transformanta - ADCDR2 w warunkach obecności i braku źródła energii (glukoza) oraz określono wpływ AmB i wybranych pochodnych na przebieg tego procesu. Zastosowano w tym celu metodę opisaną przez Maesaki i współaut. [192] wprowadzając kilka modyfikacji. Pomiary prowadzono w środowisku 0,1 M KCl. Na Rys. 36 zilustrowano widmo 10 μ M roztworu R6G wykonane w tym medium.



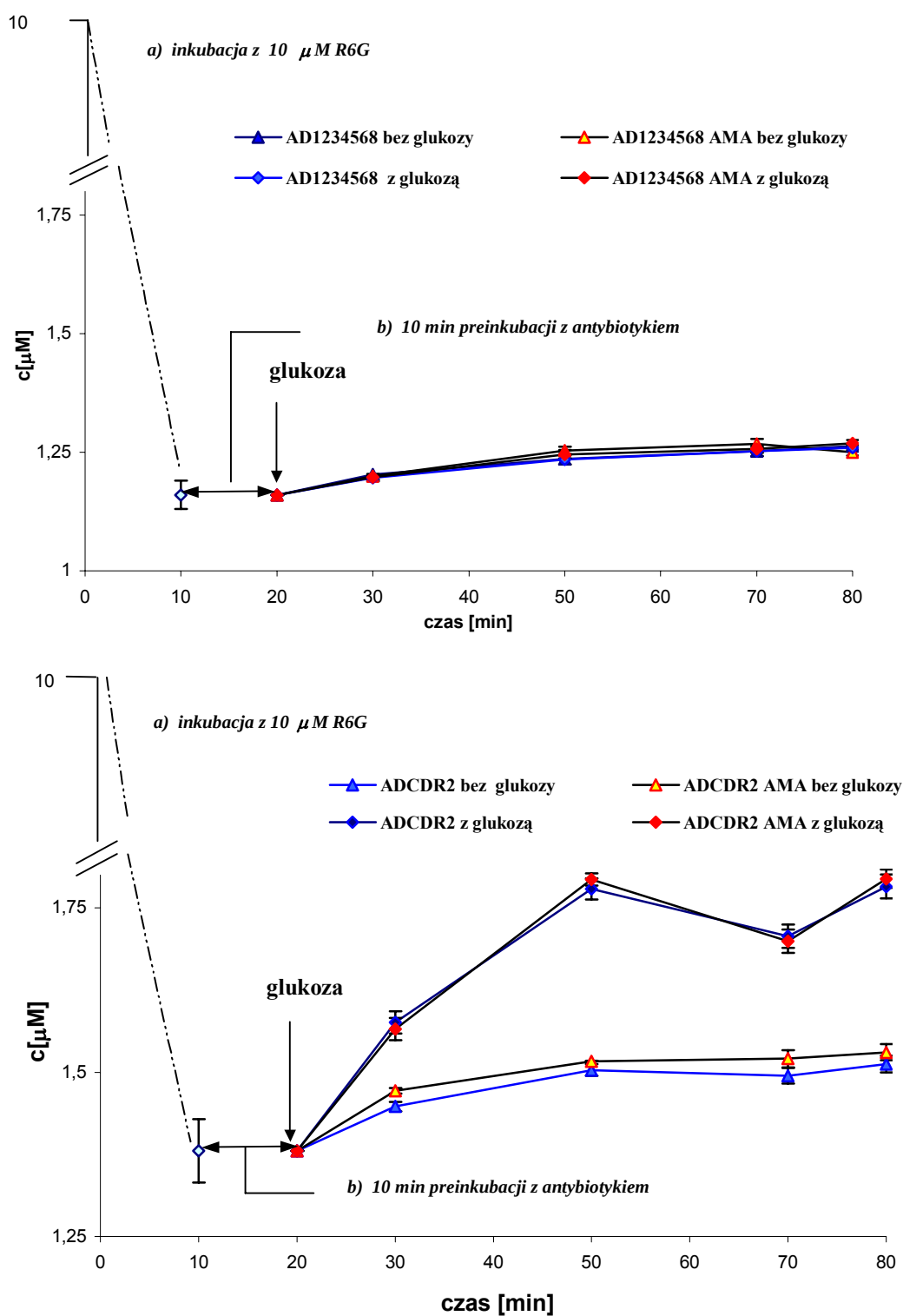
Rys. 36. Widmo absorpcyjne rodaminy 6 G w 0,1 M KCl.

Maksimum absorpcji R6G odpowiada $\lambda = 527$ nm, dlatego też tą długość fali stosuje się w metodach spektrofotometrycznej detekcji R6G transportowanej na zewnątrz komórek. Stężenie eksportowanego barwnika wyznaczano w oparciu o krzywą wzorcową sporządzoną przez miareczkowanie roztworu 0,1 M KCl (Rys. 37a). Wykonano również odpowiednie krzywe wzorcowe dla barwnika w obecności AmB (Rys. 37b) i jej pochodnych. Stwierdzono, że zarówno AmB jak i pochodne nie wywierają istotnego wpływu na postać zależności $A=f(c)$.



Rys. 37. Zależność $A = f(c)$ dla **a)** R6G oraz R6G w obecności **b)** AmB.

Przebieg typowego eksperymentu z udziałem komórek znakowanych R6G przedstawiono na przykładzie AMA (Rys. 38) dla szczepu wyjściowego AD1234568 i mutantu ADCDR2 wyposażonego w transporter białkowy typu ABC.



Rys. 38. Import oraz indukowany źródłem energii (glukoza) eksport R6G w obecności 2 μ M AMA dla szczepu AD1234568 oraz ADCDR2. Komórki grzybowe inkubowano przez 10 min z 10 μ M R6G w 30°C. Wyrzut R6G z komórek indukowano przez dodatek glukozy (2%). Zewnątrzkomórkowe stężenie barwnika wyznaczano spektrofotometrycznie przez pomiar absorbancji zebranych w określonych odstępach czasu supernatantów przy długości fali 527 nm.

W przypadku obu szczepów obserwuje się początkowo silny spadek stężenia zewnątrzkomórkowego barwnika w wyniku jego transportu do wnętrza komórek na drodze pasywnej dyfuzji. Po 10 min inkubacji poziom akumulacji R6G w komórkach osiąga stabilny stan, porównywalny pod względem ilościowym zarówno dla szczepu wyjściowego jak i jego transformanta (Tabela 13).

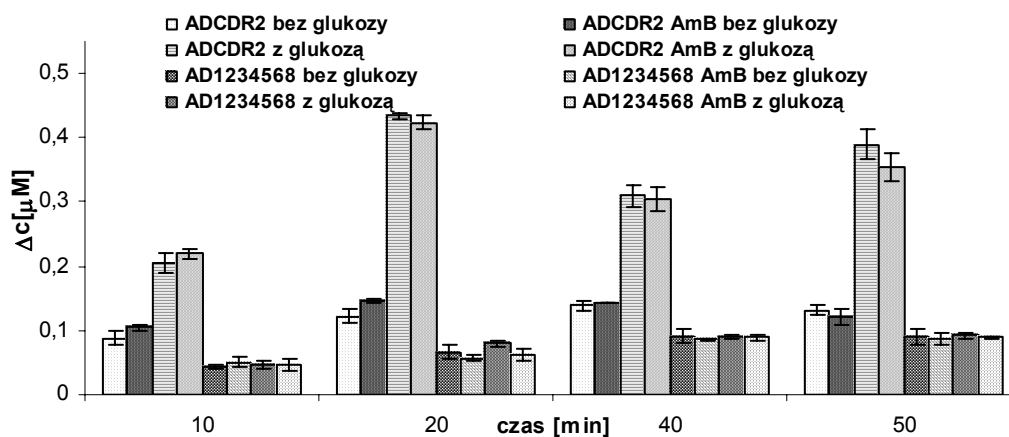
Tabela 13. Akumulacja R6G w komórkach wielolekoopornych szczepów *S. cerevisiae* po 10 min inkubacji z 10 μ M barwnika.

Szczep	akumulacja R6G [nmol/ml]	
	0,1 M KCl	Supernatant kontrolny
AD1234568	8,92 $\pm$ 0,028	8,92 $\pm$ 0,030
ADCDR2	8,60 $\pm$ 0,060	8,62 $\pm$ 0,048

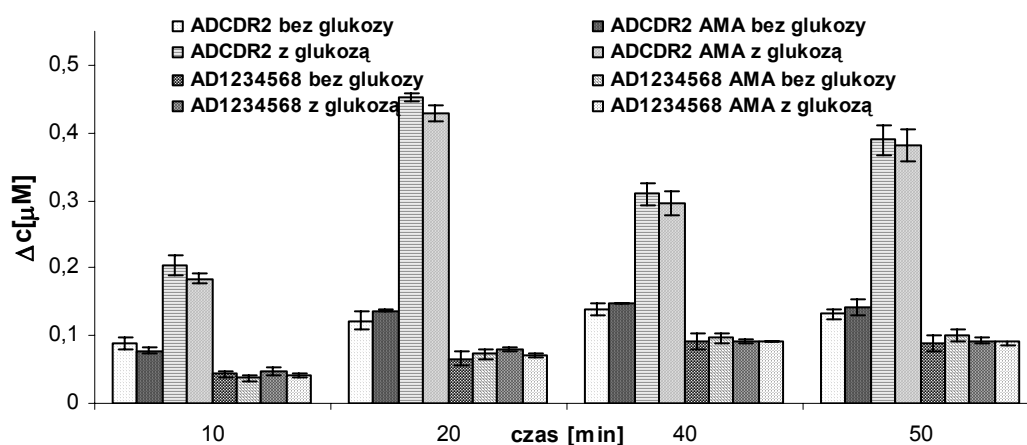
W obecności źródła energii (glukoza) dochodzi do aktywacji pomp eksportu i inicjalizacji wyrzutu R6G z komórek. Po upływie 20 min od momentu dodania glukozy do zawiesiny znakowanych komórek mutantu zewnątrzkomórkowe stężenie barwnika wzrasta ponad 4-krotnie. Dla szczepu wyjściowego notuje się w tych samych warunkach jedynie nieznaczny poziom uwalnianej R6G, który nie zależy od dostępności glukozy. Przebieg omówionych zależności dla obu badanych szczepów nie ulega zmianie w obecności antybiotyku.

Można przypuszczać, że w przypadku gdyby AmB i pochodne były substratami błonowych pomp eksportujących dochodziłoby do współzawodnictwa w transporcie pomiędzy antybiotykiem a barwnikiem, co skutkowałoby w zmianach absorbancji R6G w porównaniu do próbek kontrolnych inkubowanych bez antybiotyku. Na Rys. 39 zilustrowano zależność zmian zewnątrzkomórkowego stężenia R6G - Δc , wyznaczoną w stosunku do poziomu wyjściowego notowanego dla czasu $t = 0$ tj. bezpośrednio po dodaniu glukozy, dla szczepu AD1234568 oraz mutantu ADCDR2. Pomiarzy spektrofotometryczne prowadzono wobec dwóch odnośników tj. 0,1 M KCl oraz supernatantu z komórek kontrolnych. Z uwagi na fakt, iż nie stwierdzono istotnych różnic zarówno jakościowych jak i ilościowych w przebiegu analizowanych zależności wyniki zaprezentowano w formie wariantu z 0,1 M KCl jako odnośnikiem.

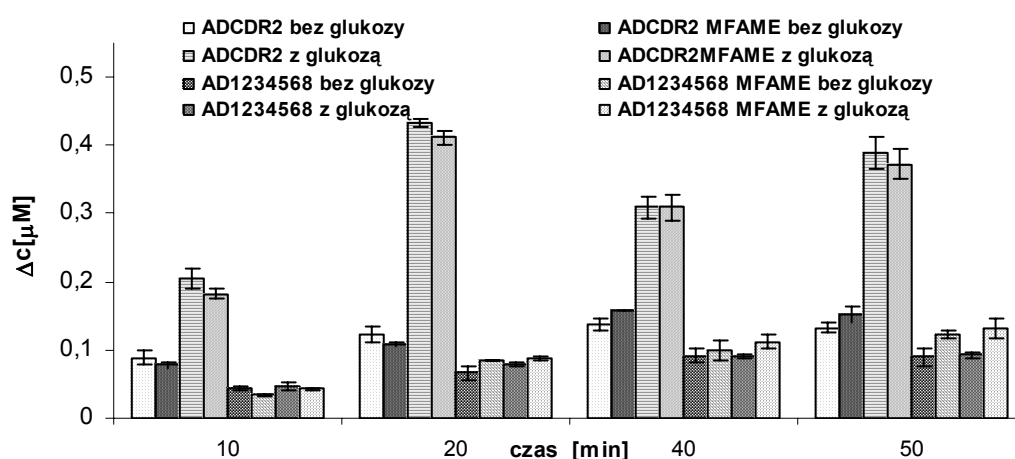
a)



b)



c)



Rys. 39. Eksport R6G, indukowany źródłem energii (glukoza), z komórek szczepu wyjściowego AD1234568 oraz mutanta ADCDR2 w warunkach braku lub obecności 2 μ M a) AmB b) AMA c) MFAME. Wyrzut R6G z komórek grzybowych wyrażono w postaci zależności $\Delta c = f(t)$, gdzie Δc to zmiana zewnątrzkomórkowego stężenia barwnika wyznaczona w stosunku do $t=0$ tj. bezpośrednio po dodaniu glukozy.

Jak wynika z powyższego zestawienia stężenie eksportowanego barwnika jest zasadniczo jednakowe w komórkach traktowanych AmB i pochodnymi – AMA oraz MFAME jak i w próbkach kontrolnych. Zależny od energii eksport R6G obserwuje się tylko w przypadku mutantu ADCDR2 wyposażonego w transporter białkowy typu ABC. Brak kompetycji w procesie transportu R6G zachodzącego za pośrednictwem Cdr2p wskazuje, iż badane antybiotyki nie są substratami tego rodzaju pomp błonowych.

Wyniki omówionych powyżej badań oraz przeprowadzonych wcześniej eksperymentów na wielolekoopornych szczepach *S. cerevisiae* wydają się jednoznacznie potwierdzać zaproponowaną na początku hipotezę, iż AmB i pochodne nie są substratami pomp eksportujących typu: ABC i MFS i nie zmieniają ich aktywności. Fakt ten ma istotne znaczenie w dobie narastającego problemu rozwoju oporności wielolekowej zważywszy na ciągle ograniczony arsenał dostępnych i skutecznych leków przeciwgrzybowych.

5.4. Aktywność N-aminoacylowych pochodnych AmB z zawadą przestrzenną w stosunku do mutantów wielolekoopornych *C. albicans*

Z uwagi na brak jakichkolwiek doniesień dotyczących aktywności zawadzonych przestrzennie amfoterycynowych N-aminoacylowych pochodnych nowej generacji (seria „K”) w stosunku do szczepów wielolekoopornych dla wybranych związków wyznaczono wartości dwóch parametrów charakteryzujących działanie grzybobójcze antybiotyku tj. MIC oraz IC₅₀ (Tabela 14). AmB zastosowano jako związek referencyjny. Oznaczenia przeprowadzono dla dwóch szczepów MDR - Gu4 i Gu5 oraz porównawczo dla szczepu standardowego *Candida albicans* ATCC 10261. Gu4 jest szczepem wrażliwym na flukonazol, wyjściowym dla opornego szczepu Gu5 z nadekspresją genów *CDR1/CDR2* kodujących pompy eksportujące typu ABC działające jako permeazy transportowe zależne od ATP. Wszystkie oznaczenia przeprowadzono z zastosowaniem podłoża AM3 zalecanego przez NCCLS w badaniach aktywności przeciwgrzybowej polienów w stosunku do szczepów wielolekoopornych [188].

W oparciu o uzyskane wyniki można stwierdzić, iż szczep Gu5 wyposażony w błonowe pompy eksportujące (Cdr1p, Cdr2p) zachowuje podobną wrażliwość jak szczep Gu4, z którego się wywodzi. Zarówno MIC jak i IC₅₀ wyznaczone dla obu szczepów przyjmują zbliżone wartości w przypadku wszystkich testowanych pochodnych AmB. Wyjątek stanowią jedynie dwa związki, z resztą O-t-butylo-

tyrozyny w formie odpowiednio izomerów L i D na grupie aminowej amfoterycyny B (pochodne K₆ i K₃₅). W przypadku tych pochodnych obserwuje się obniżenie aktywności grzybostatycznej dla szczepu opornego w zestawieniu ze szczepem wyjściowym (wyraźniej zaznaczone dla K₆; 2-krotny spadek wartości MIC).

Obok aktywności przeciwgrzybowej w tabeli zamieszczono również wartości EK₅₀ i EH₅₀ wyznaczone dla badanych związków w stosunku do krwinek czerwonych. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że wszystkie badane pochodne w porównaniu do antybiotyku macierzystego charakteryzuje znacząco zredukowana toksyczność. Związki te praktycznie nie indukują hemolizy. Wyjątek stanowi pochodna K₃₄ z resztą O-t-butylo-D-treoniny na grupie aminowej AmB. Niemniej jednak nawet ten związek wywołuje 50% wypływu hemoglobiny w stężeniu ponad 30- krotnie wyższym aniżeli antybiotyk wyjściowy.

Tabela 14. Selektywna toksyczność wybranych N- aminoacylowych pochodnych AmB nowej generacji.

Związek	<i>C. albicans</i> ATCC 10261		<i>C. albicans</i> Gu 4		<i>C. albicans</i> Gu 5		Erytrocyty	
	MIC [μM]	IC ₅₀ [μM]	MIC [μM]	IC ₅₀ [μM]	MIC [μM]	IC ₅₀ [μM]	EK ₅₀ [μM]	EH ₅₀ [μM]
AmB	0,065	0,022±0,0001	0,065	0,022±0,0008	0,065	0,032±0,0005	1,2±0,072	1,95±0,085
PAMB	0,24	0,12±0,006	0,38	0,15±0,006	0,38	0,17±0,0033	102±5,62	> 200
K₆	0,40	0,21±0,012	0,40	0,24±0,011	0,8	0,27±0,006	98,7±5,0	> 250
K₃₅	0,80	0,25±0,013	0,80	0,32±0,018	0,8	0,35±0,0165	62,4±3,53	> 200
K₁₆	0,34	0,18±0,01	0,34	0,18±0,074	0,34	0,15±0,008	19,3±0,94	> 250
K₁₇	0,42	0,22±0,008	0,42	0,18±0,009	0,42	0,19±0,012	27,0±2,25	> 250
K₃₄	0,42	0,23±0,002	0,42	0,23±0,008	0,42	0,26±0,014	28,2±2,58	66,44±3,0
K₉	0,33	0,20±0,011	0,33	0,16±0,008	0,41	0,19±0,011	60,8±4,58	> 250
K₁₀	0,20	0,11±0,005	0,20	0,10±0,004	0,20	0,09±0,002	56,8±2,35	> 250

MIC - oznaczano metodą seryjnych rozcieńczeń w 96 – studzienkowych mikroplatkach, w podłożu AM3 wzbogaconym o dodatek 2% glukozy. Stosowano inoculum o gęstości 10⁴ kom/ml. Komórki inkubowano z antybiotykiem 24 h w temp. 30°C. Gęstość optyczną poszczególnych zawiesin mierzono dla długości fali λ= 620 nm za pomocą czytnika mikroplatek (Labsystem)

EK₅₀ – stężenie związku indukujące 50% wypływu potasu z krwinek czerwonych

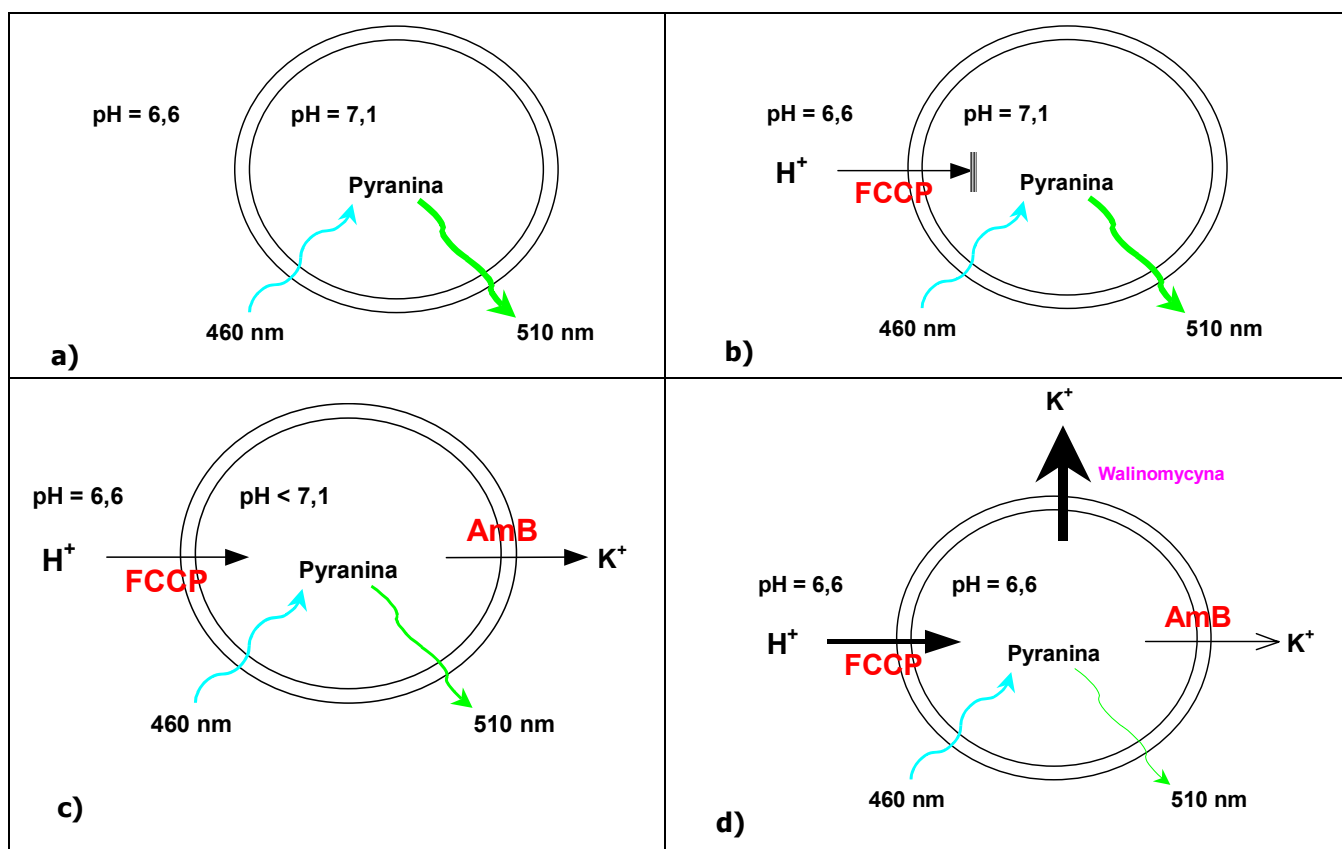
EH₅₀ – stężenie związku indukujące 50% wypływu hemoglobiny z krwinek czerwonych

5.5. Aktywność permeabilizacyjna względem dużych pęcherzyków lipidowych

Dotychczasowe badania prowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii wskazują, iż obecność zawady przestrzennej w "polarnej głowie" cząsteczki antybiotyku nie wpływa na jej powinowactwo do błony, ale może utrudniać tworzenie kanału lub zmieniać jego selektywność [43,44,57]. W związku z tym kolejny etap prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy badań dotyczył zagadnienia powstawania i wydajności kanałów błonowych tworzonych przez AmB i wybrane pochodne. Dla uzyskania możliwie jednoznacznych wyników badania te przeprowadzono w układzie modelowym sztucznych błon lipidowych.

Do badań w układach modelowych wybrano duże jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe (REV), jako model błon biologicznych. Aktywność permeabilizacyjną AmB i wybranych pochodnych oznaczano względem pęcherzyków zbudowanych z lecytyny jaja kurzego i cholesterolu lub ergosterolu w proporcjach molowych odpowiednio 80:20 i 90:10. W celu oceny efektywności oraz sposobu działania badanych związków względem obu typu pęcherzyków zastosowano metodę fluorymetryczną, która opiera się na wykorzystaniu pomiaru intensywności fluorescencji pyraniny zamkniętej wewnątrz pęcherzyków lipidowych jako indykatora pH [76].

Zaletą metody wybranej do oceny aktywności permeabilizacyjnej względem pęcherzyków lipidowych w porównaniu do innych technik takich jak spektroskopia ^{31}P -NMR, jest jej niska cena, dostępność aparatury pomiarowej, a także stosunkowo krótki czas pomiaru i możliwość prowadzenia analiz w szerokim zakresie stężeń pęcherzyków. Poniżej zilustrowano schemat zastosowanej metody (Rys. 40). Szczegółowo procedurę opisano w punkcie 4.4.3.



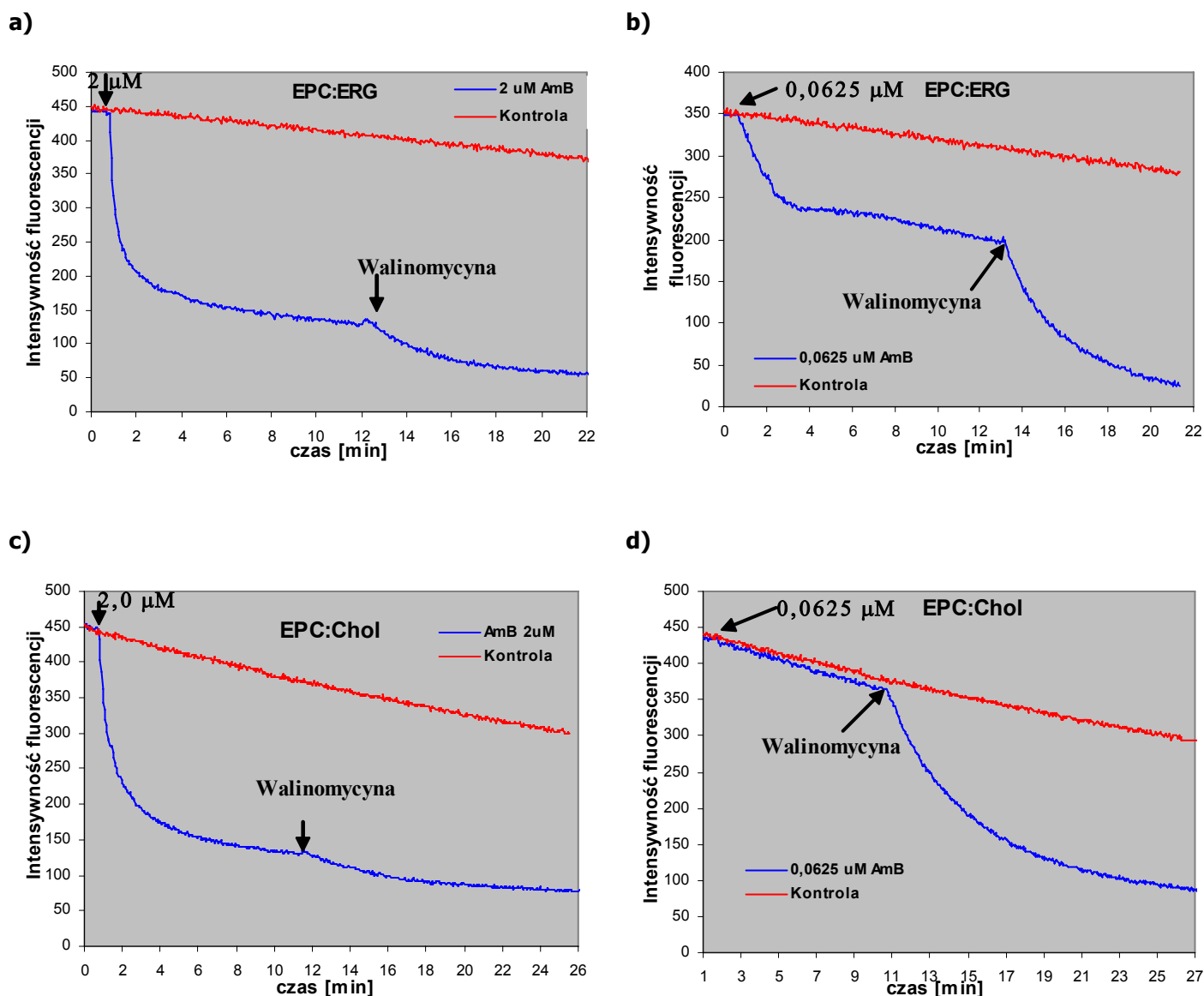
Rys. 40. Przebieg procedury pomiaru permeabilizacji REV przez AmB „metodą pyraninową”: **a)** silna fluorescencja pyraniny we wnętrzu pęcherzyka; **b)** dodatek protonoforu FCCP stwarza możliwość napływu protonów, jednak proces ten jest niemożliwy bez wypływu kationów potasu; **c)** dodatek AmB lub jej pochodnej może zapoczątkować wypływ jonów potasu, co umożliwi elektroobojętą wymianę H⁺/K⁺ i spadek pH we wnętrzu pęcherzyka, zmniejszy się intensywność fluorescencji; **d)** dodatek walinomycyny zapewnia zanik gradientu pH i gradientu stężenia jonów potasowych.

Pomiary zmian intensywności fluorescencji w czasie prowadzono w warunkach gradientu pH generowanego przez dodatek 1N kwasu siarkowego oraz obecności protonoforu FCCP zwiększającego wybiórczo przepuszczalność błony dla protonów. Po dodaniu FCCP obserwowano niewielki, aczkolwiek progresywny spadek intensywności fluorescencji w czasie, wyraźny zwłaszcza w przypadku pęcherzyków cholesterolowych. Efekt ten wskazuje na częściową przepuszczalność biwarstwy lipidowej w stosunku do anionów i został uwzględniony w formie korekty przy ustalaniu efektu działania antybiotyku. Po dodaniu antybiotyku w stężeniu wystarczającym dla zapoczątkowania ruchu jonów potasu dochodzi do elektroobojętniej wymiany H⁺/K⁺ co wywołuje spadek pH we wnętrzu pęcherzyka i w efekcie

zmniejszenie intensywności fluorescencji pyraniny. Spadek ten stanowi pośrednią miarę wzrostu przepuszczalności błony dla jonów potasu. Stwierdzono, że AmB nie indukuje wypływu pyraniny z pęcherzyków lipidowych: w nieobecności protonoforu nie obserwuje się zmian fluorescencji. Po 10 min od momentu wprowadzenia do układu antybiotyku dodawano walinomycynę - jonofor zwiększający wybiórczo przepuszczalność błony dla jonów potasu, w celu określenia całkowitej zmiany fluorescencji.

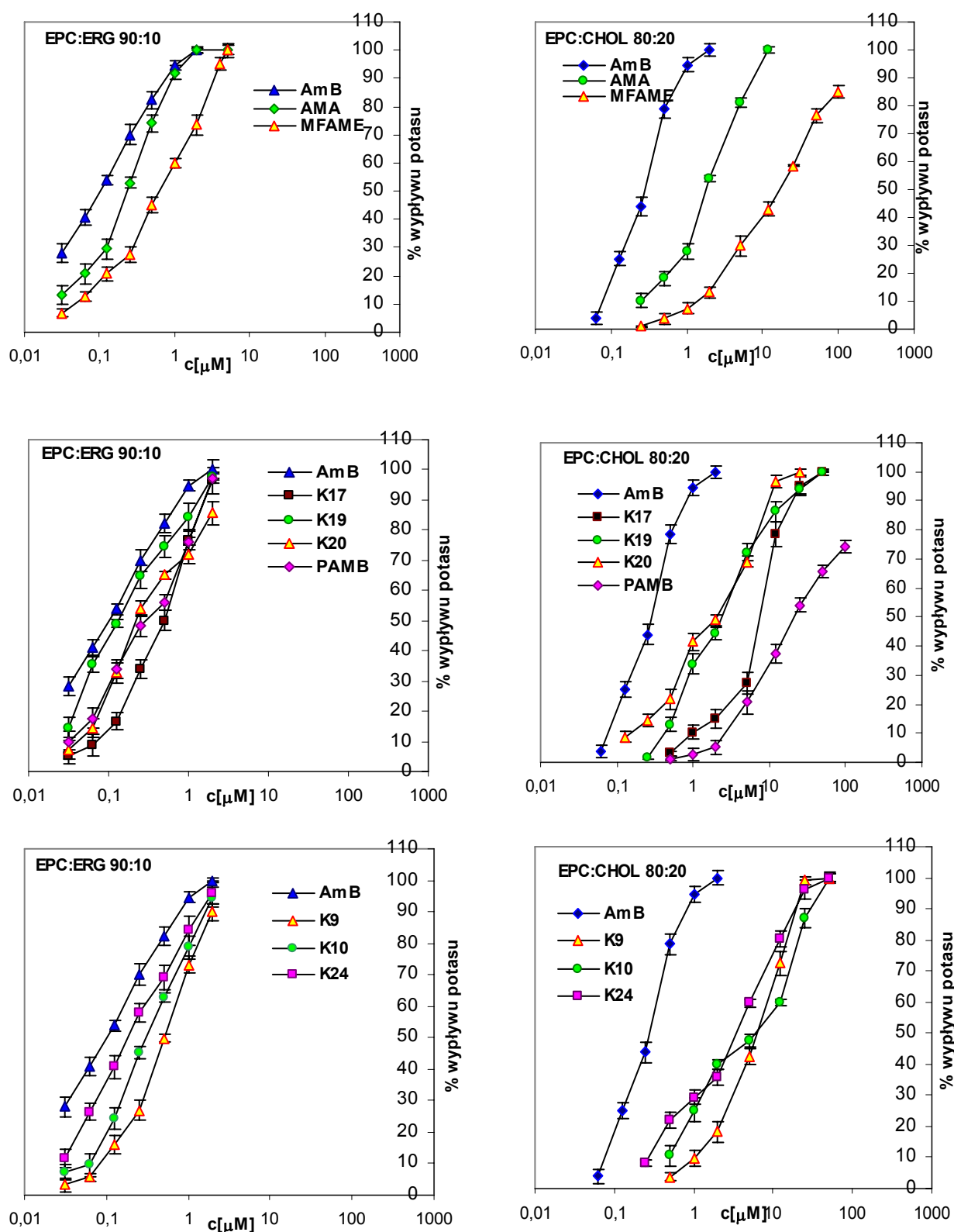
W oparciu o zależność podaną w punkcie 4.4.3. dla każdego z badanych związków wyznaczono % wypływu potasu indukowany w obu typach pęcherzyków w czasie 10 min. działania antybiotyku. Jak wynika z zestawienia prezentowanego na Rys. 41 przebieg zależności % wypływu potasu w funkcji stężenia antybiotyku ma różny charakter w zależności od składu sterolowego pęcherzyków. W przypadku pęcherzyków ergosterolowych wszystkie badane związki indukują wypływ jonów potasu w zakresie stężeń 0,03 – 2 μM , podczas gdy dla pęcherzyków zawierających cholesterol efekt ten obserwuje się dla szerokiego przedziału stężeń 0,06-50 μM .

Na Rys. 41 zilustrowano przykład zmian intensywności fluorescencji pyraniny w czasie, indukowanych przez AmB w pęcherzykach lipidowych zawierających odpowiednio ergosterol i cholesterol.



Rys. 41. Zmiany intensywności fluorescencji pyraniny zamkniętej wewnątrz zawierających sterol pęcherzyków lipidowych typu REV w funkcji czasu, indukowane działaniem AmB o stężeniu 2 i 0,0625 μM , w obecności gradientu pH i protonoforu FCCP. **a) b)** pęcherzyki ergosterolowe (stężenie fosfolipidów 1,7 mM); **c) d)** pęcherzyki cholesterolowe (stężenie fosfolipidów 1,3 mM).

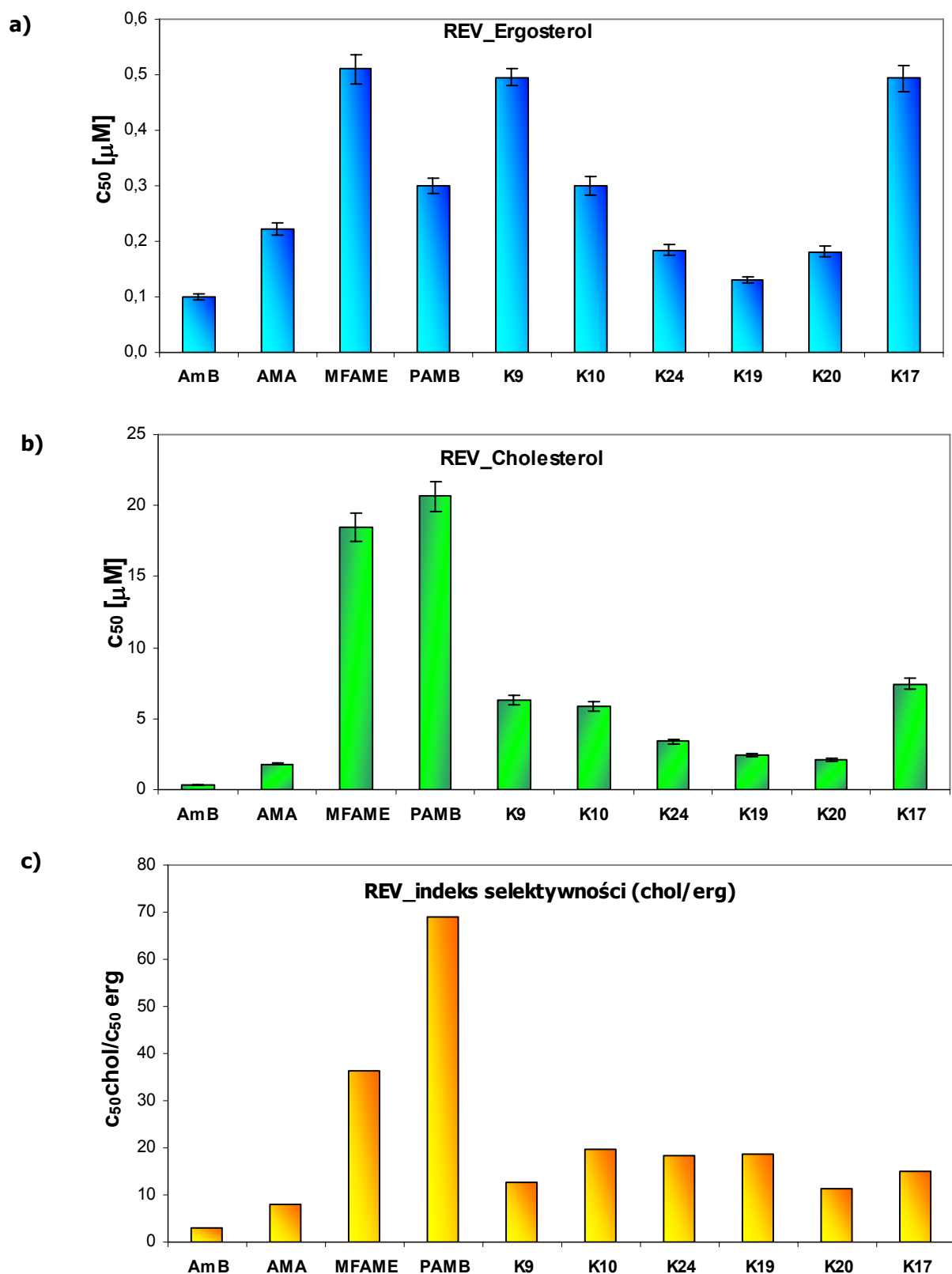
Można ponadto wyraźnie zauważyć, iż w przypadku pęcherzyków cholesterolowych, w przeciwieństwie do tych zawierających ergosterol, istnieje krytyczne stężenie antybiotyku, poniżej którego nie obserwuje się wypływu jonów potasu (Rys. 42). Dla AmB wartość ta wynosi ok. 0,06 μM , dla pochodnych AMA, K₁₉, K₂₀, K₂₄ jest 4-krotnie wyższa, natomiast dla MFAME, PAMB, K₁₀, K₉, K₁₇ 8-krotnie wyższa. Występowanie progowej wartości stężenia antybiotyku indukującego wypływ potasu może mieć bezpośredni związek ze strukturą roztworów wodnych badanych związków i zawartością poszczególnych form spektralnych.



Rys. 42. Wpływ K⁺ indukowany działaniem AmbB oraz jej pochodnych z pęcherzyków REV zawierających odpowiednio ergo- i cholesterol w funkcji stężenia całkowitego antybiotyku. Ruch jonów potasu monitorowano poprzez zmiany zewnętrznego pH jako efektu elektroobojętnnej wymiany K⁺/H⁺ w obecności FCCP i antybiotyku. Całkowity wypływ potasu wyznaczano po dodaniu walinomycyny. Wszystkie pomiary wykonano w temp. pokojowej.

Warto zwrócić również uwagę, iż w przypadku MFAME i PAMB, w odróżnieniu od pozostałych związków, nawet dla najwyższych stężeń nie obserwuje się całkowitego wypływu potasu z pęcherzyków zawierających cholesterol. Może to sugerować występowanie dla tych związków odmiennego aniżeli dla AmB i pozostałych badanych pochodnych mechanizmu zwiększania przepuszczalności błon cholesterolowych. Przypuszczalnie, MFAME i PAMB, związki o najwyższej selektywności, w przeciwieństwie do innych testowanych związków, nie są zdolne do utworzenia w rozsądnym zakresie stężeń funkcjonalnego kanału w pęcherzykach zawierających cholesterol, a ich działanie w zakresie najwyższych stężeń w stosunku do tego typu błon prawdopodobnie jest niespecyficzne i ma charakter detergentowy.

Celem porównania aktywności permeabilizacyjnej AmB i testowanych pochodnych względem pęcherzyków ergo- i cholesterolowych wyznaczono parametr c_{50} , czyli stężenie związku indukujące 50% wypływu potasu (Rys. 43 a, b). Dodatkowo obliczono indeks selektywności, IS, działania badanych związków, (Rys. 43 c). Jako indeks selektywności przyjęto stosunek c_{50} dla pęcherzyków cholesterolowych do c_{50} pęcherzyków ergosterolowych.



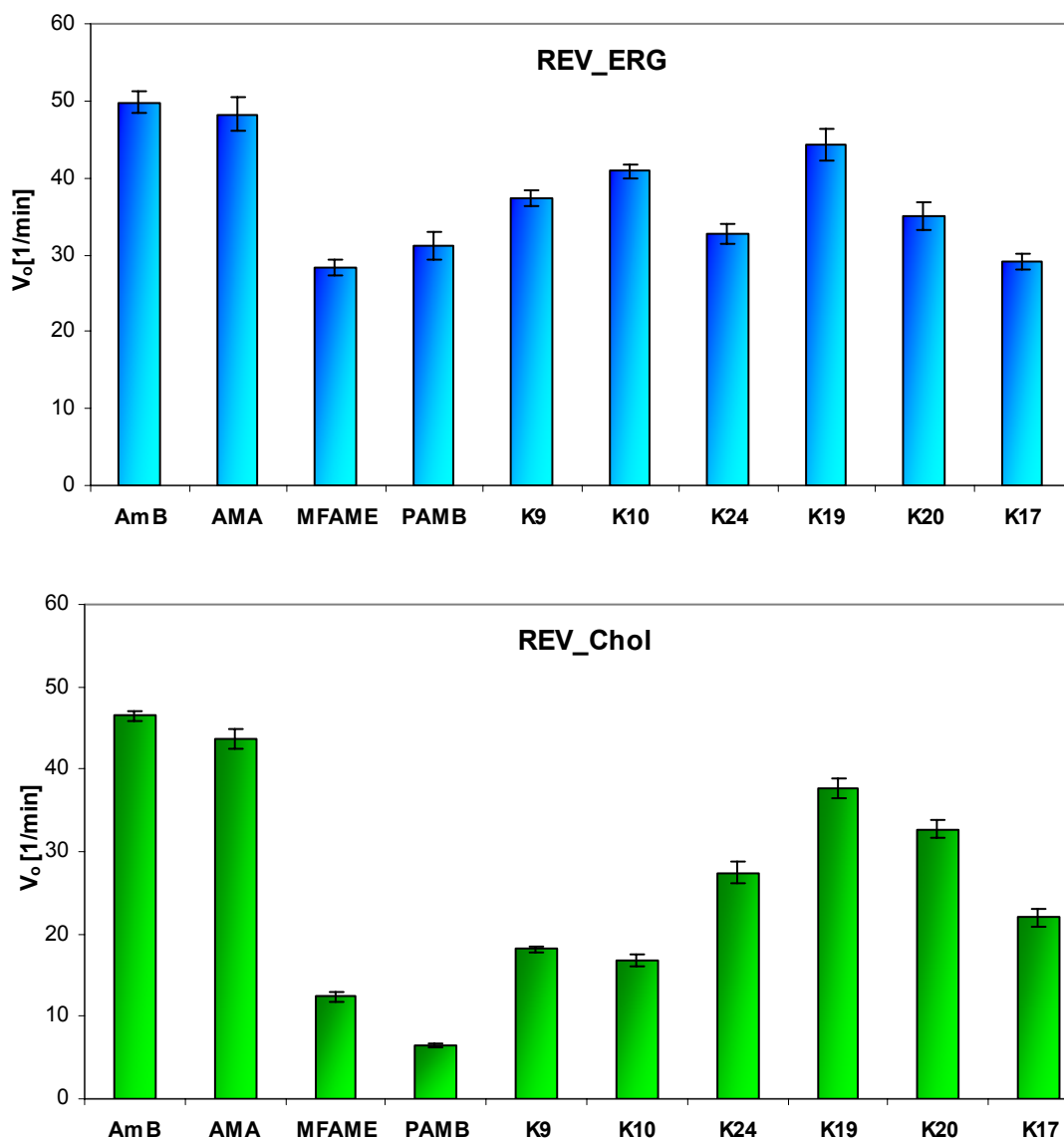
Rys. 43. Zestawianie wartości c_{50} - stężenia związku indukujące 50% wypływu potasu z pęcherzyków ergo- i cholesterolowych oraz indeksu selektywności chol/erg (IS).

Większość badanych związków indukuje 50% wypływu potasu z pęcherzyków ergosterolowych w podobnym zakresie stężeń: $0,1 \div 0,3 \mu\text{M}$. Jedynie MFAME, K₁₇ oraz K₉ wykazują nieco obniżoną aktywność. Wartość parametru c_{50} uzyskana dla tych związków wynosi ok. $0,5 \mu\text{M}$. Efektywność działania badanych związków w stosunku do pęcherzyków zawierających cholesterol jest zdecydowanie bardziej zróżnicowana. Wszystkie pochodne indukują 50% wypływ potasu w stężeniach wyższych aniżeli antybiotyk wyjściowy. Zdolność do permeabilizacji pęcherzyków cholesterolowych jest dla AMA, K₁₉ i K₂₀ około 10-krotnie niższa w porównaniu do AmB, podczas gdy dla K₉, K₁₀ i K₁₇ ponad 20-krotnie niższa. Najmniejszą efektywność działania w stosunku do pęcherzyków cholesterolowych stwierdza się dla MFAME oraz PAMB. Pochodne te indukują połowiczną utratę potasu w stężeniach około 80-krotnie wyższych aniżeli antybiotyk wyjściowy.

Biorąc pod uwagę indeks selektywności (Rys. 43 c) można stwierdzić, że MFAME i PAMB wykazują największą zdolność do różnicowego oddziaływania względem błon ergo- i cholesterolowych. Dla tych pochodnych IS jest rzędu kilkudziesięciu. Indeks selektywności pozostałych pochodnych waha się od 10 do 20. Najniższą wartość przyjmuje dla antybiotyku wyjściowego: ok. 3.

Innym parametrem charakteryzującym zmiany przepuszczalności jest wydajność procesu. Można ją oszacować na podstawie szybkości początkowej zmian intensywności fluorescencji pyraniny. Na Rys. 44 zestawiono wartości szybkości początkowej wyznaczone dla stężenia c_{50} w pęcherzykach ergo- i cholesterolowych

W przypadku pęcherzyków zawierających ergosterol nie obserwuje się zasadniczych różnic w tempie permeabilizacji indukowanej przez poszczególne związki. W pęcherzykach cholesterolowych różnice te są zdecydowane. Największe różnice stwierdza się dla MFAME i PAMB. Szybkość początkowa dla tych związków jest około 5-krotnie niższa aniżeli wartość notowana dla antybiotyku wyjściowego. Dla K₉, K₁₀ omawiana różnica jest 2,5-krotna, podczas gdy dla pozostałych pochodnych około 1,5-krotna. Wyjątek stanowi AMA, która indukuje wypływ potasu z pęcherzyków cholesterolowym praktycznie z taką samą szybkością jak AmB



Rys. 44. Zestawienie szybkości początkowej wypływu potasu V_0 z pęcherzyków odpowiednio ergo- i cholesterolowych wyznaczonej dla stężenia c_{50} .

5.6. Stan antybiotyku w roztworze

5.6.1. Agregacja AmB w roztworach wodnych

W oparciu o liczne prace eksperymentalne postulowano, iż istotnym czynnikiem leżącym u podstaw selektywnej toksyczności AmB jak również jej pochodnych jest stan, w jakim antybiotyk występuje w roztworze wodnym [26,41,76,101,131]. Zwraca się uwagę na monomeryczną formę antybiotyku jako działającą selektywnie. Niemniej jednak wyniki uzyskane w zespole KTLiB nie potwierdzają tej tezy w przypadku pochodnych AmB [42,131]. Wiadomym jest, iż związki te w roztworach wodnych ulegają wieloetapowej agregacji, ale dokładny mechanizm tego procesu nie został dotąd wyjaśniony. W związku z tym w kolejnym z etapów realizowanych w ramach pracy

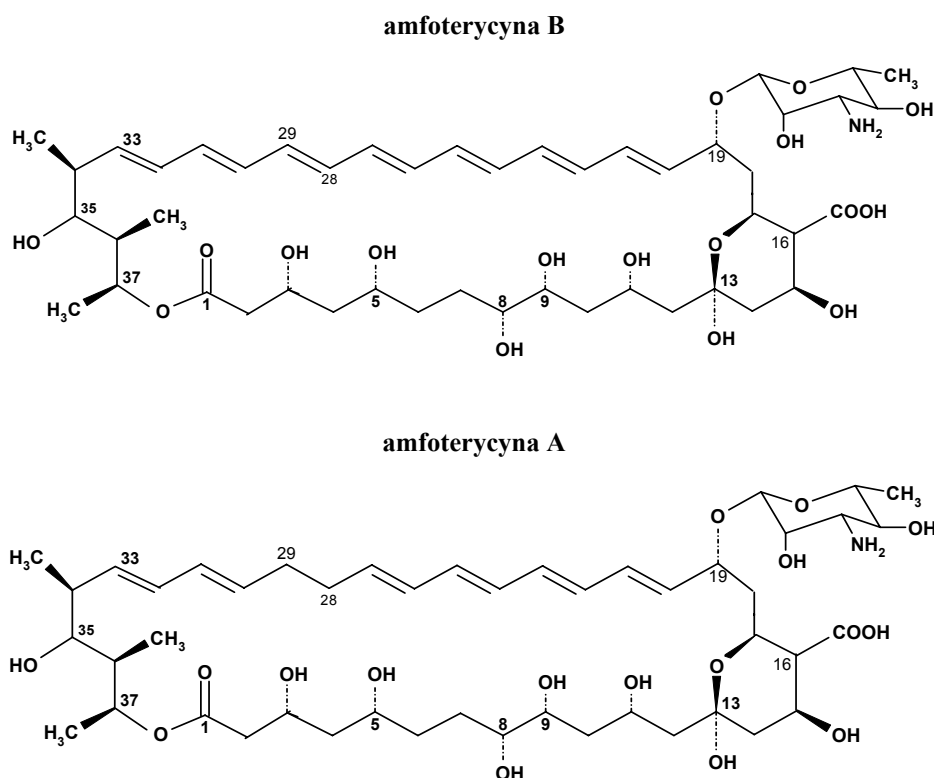
doktorskiej badań podjęto próbę analizy składu roztworów wodnych **AmB**, jako związku referencyjnego, dwóch wybranych kationowych pochodnych: **AMA** i **AMPA**, oraz siedmiu amfoterycznych pochodnych N-aminoacylowych nowej generacji: **K₉**, **K₁₀**, **K₁₇**, **K₁₉**, **K₂₀**, **K₂₁**, **PAMB**. Wyselekcjonowane do badań związki charakteryzują się różnym typem zmian strukturalnych w obrębie „głowy polarnej” cząsteczki antybiotyku, co stwarza możliwość ustalenia znaczenia zawady przestrzennej oraz stanu jonowego cząsteczki na stan antybiotyku w roztworze.

Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe wskazujące na istotny wpływ składu środowiska wodnego (stężenie i rodzaj soli, wpływ pH) na przebieg agregacji badania prowadzono w zróżnicowanych mediach tj.: woda, 155 mM NaCl (sól fizjologiczna), 150 mM NaCl buforowany 5 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ (PBS; pH = 7,4), bufor Tris (pH = 6,8).

Przebieg procesu agregacji oraz określenie stopnia agregacji badanych związków przeprowadzono w oparciu o spektroskopię absorpcyjną UV-VIS. Z uwagi na fakt, iż wprowadzenie podstawników do „polarnej głowy” cząsteczki AmB nie ma wpływu na właściwości optyczne chromoforu polienowego te same metody spektroskopowe zostały zastosowane do badania procesu agregacji zarówno AmB jak i jej pochodnych.

5.6.1.1. Oczyszczanie amfoterycyny B

Handlowy preparat amfoterycyny B (Sigma) zawiera niewielką domieszkę jej homologu - amfoterycyny A (28,29-dihydro amfoterycyna B). Stwierdzono, że amfoterycyna A [201] posiada identyczną strukturę jak AmB [202,203] za wyjątkiem braku wiązania podwójnego pomiędzy atomami węgla C₂₈ i C₂₉ w chromoforze (Rys. 45). W efekcie chromofor amfoterycyny A składa się tetraenu i dienu i charakteryzuje się pasmami absorpcyjnymi w zakresie 300-340 nm [204,205]. Podobieństwo struktur amfoterycyny A i B utrudnia proces separacji tych dwóch homologów, a w efekcie w znacznym stopniu wydłuża czas oraz zwiększa koszty produkcji amfoterycyny B na skalę przemysłową [206].

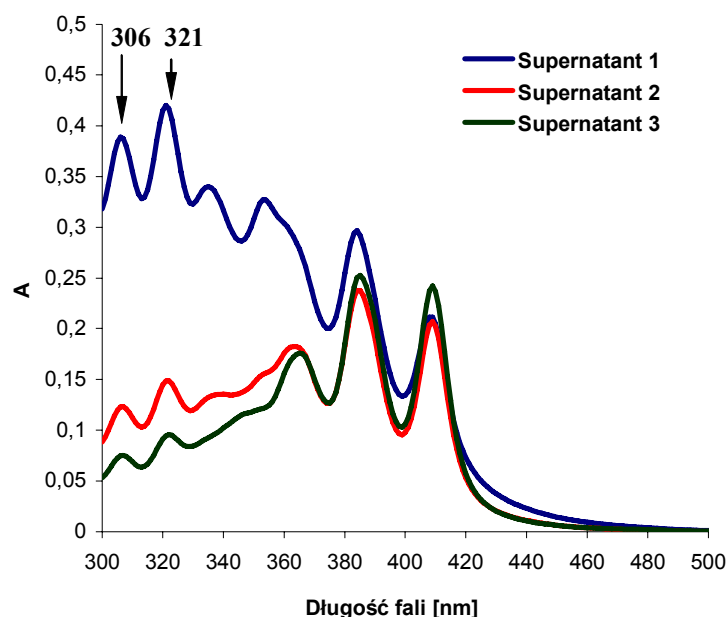


Rys. 45. Porównanie struktur amfoterycyny A [204,205] i B [202,203].

Ponieważ maksima absorpcji w widmie amfoterycyny A przypadają w obszarze charakterystycznym dla absorpcji zagregowanych form AmB, więc dla uzyskania wiarygodnych wyników o stanie AmB w roztworach wodnych należało zastosować preparat AmB praktycznie pozbawiony homologu A. Opracowano więc szybką i wydajną procedurę oczyszczania preparatu handlowego. Bazuje ona na spostrzeżeniu, że amfoterycyna A jest dużo lepiej rozpuszczalna w roztworach wodnych. W przypadku pochodnych AmB oczyszczanie natywnego antybiotyku nie jest konieczne z uwagi na fakt, iż w procesie syntezy i izolacji pochodnych metodami chromatograficznymi zanieczyszczenie amfoterycyną A zostaje skutecznie usunięte.

Opracowana metoda oczyszczania AmB (p. 4.1.1.1.) opiera się na kilkukrotnym frakcyjnym wytrącaniu antybiotyku z buforu Tris pH = 6,8. Z uwagi na większą rozpuszczalność amfoterycyny A w roztworach wodnych zastosowanie takiej sekwencji operacji pozwala na redukcję zawartości tego homologu w finalnej próbce AmB. Czystość AmB weryfikowano na podstawie charakterystycznych widm absorpcyjnych.

Poniżej przedstawiono przykładowe widma UV-VIS zarejestrowane dla supernatantów 1, 2, 3 zebranych w kolejnych etapach wytrącania AmB (Rys. 46).



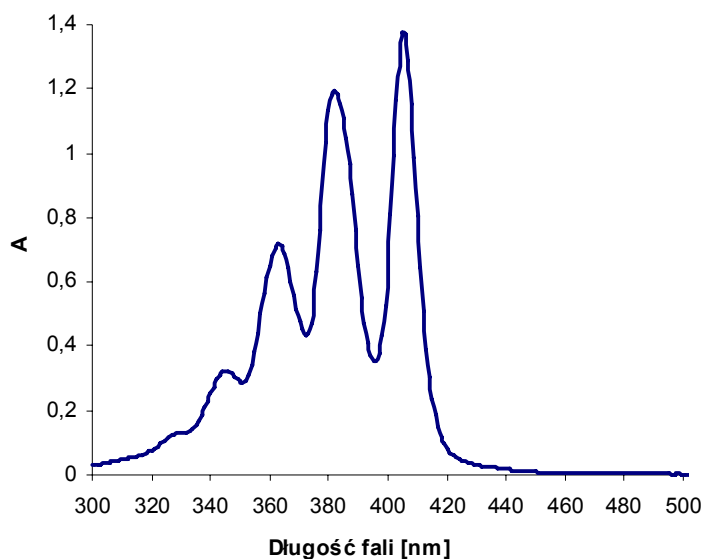
Rys. 46. Widma absorpcyjne supernatantów 1, 2, 3, zebranych w kolejnych etapach wtrącania AmB z buforu Tris, z zaznaczeniem pasm charakterystycznych dla amfoterycyny A.

Widać wyraźnie, że „supernatant 1” zawiera dużą ilość amfoterycyny A. Świadczy o tym wysoka intensywność widma w zakresie krótkofalowym z charakterystycznymi maksimami przy długościach fali 306 oraz 321 nm. Udział homologu A drastycznie spada w przypadku „supernatantu 2” oraz „supernatantu 3”. Kształt widm tych próbek przypomina już widmo AmB, ale typowa dla amfoterycyny A struktura wspomnianego dubletu pików jest jeszcze mocno zaznaczona. Poza tym w widmie w metanolu dla obu supernatantów nie obserwuje się właściwej dla formy monomerycznej AmB proporcji pików A_{408}/A_{383} (Tab. 15).

Tabela 15. Wartość stosunku absorbancji dla długości fali 408 i 383 nm w kolejnych supernatantach rozcieńczonych metanolem w stosunku objętościowym 1:1. Stosunek absorbancji dla czystej AmB wynosi **1,132**.

Supernatant : metanol	A_{408}/A_{383}
<i>Supernatant 1</i>	0,8257
<i>Supernatant 2</i>	0,9574
<i>Supernatant 3</i>	1,0375

Na poniższym rysunku (Rys. 47) zilustrowano przykładowe widmo w metanolu amfoterycyny B otrzymanej jako końcowy produkt w toku omówionych wyżej operacji oczyszczania.



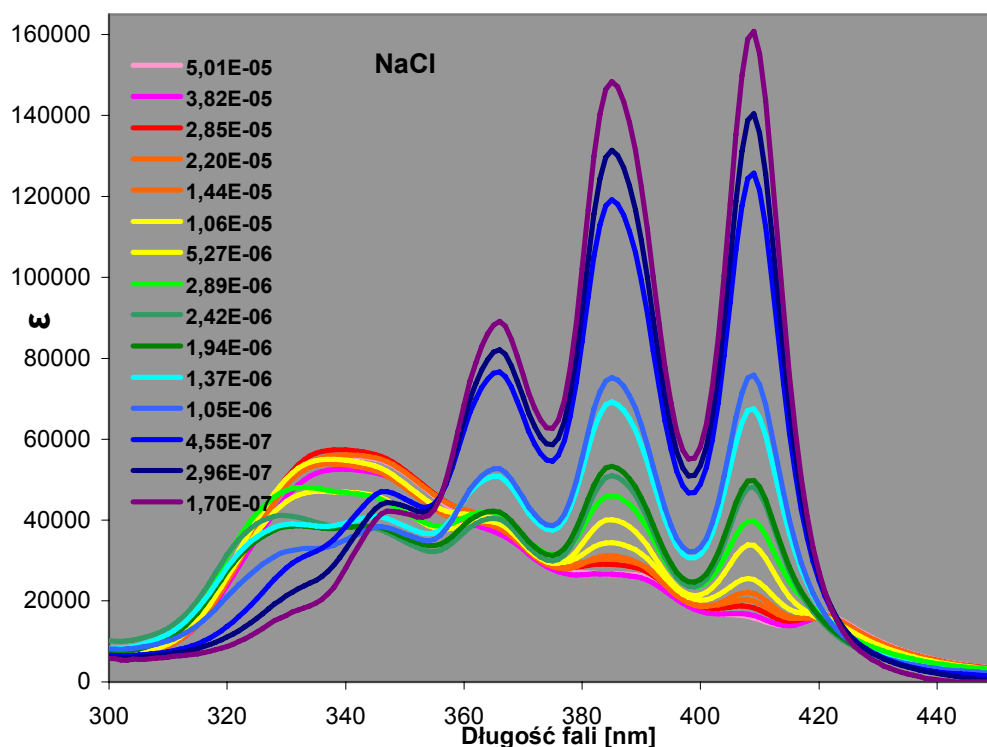
Rys. 47. Widmo absorpcyjne oczyszczonej AmB w metanolu. Stężenie antybiotyku 17,2 μM . Długość drogi optycznej 0,5 cm.

W widmie tym można wyróżnić charakterystyczne maksima absorpcji przy długościach fali 405, 382, 364 i 345 nm. Wartość stosunku absorbancji A_{405}/A_{382} wynosi 1,132. W zakresie krótkofalowym widma nie obserwuje się nawet śladów typowego dla amfoterycyny A dubletu pików (306 nm, 321 nm). W związku z tym można uznać prezentowane widmo za widmo czystej AmB. Wydaje się zatem, że zastosowana metoda umożliwia w efektywny i zasadniczo nieskomplikowany sposób odseparować AmB od jej homologu - amfoterycyny A.

5.6.1.2. Właściwości spektroskopowe AmB w roztworach wodnych

Badania procesu agregacji rozpoczęto od analizy składu roztworów wodnych AmB jako związku referencyjnego. Stwierdzono, iż we wszystkich badanych środowiskach wodnych widma AmB wykazują charakterystyczną zależność kształtu od stężenia (Rys. 48). Dla niskich stężeń antybiotyku, odpowiadających głównie formie monomerycznej, w obszarze 450 – 300 nm obserwuje się 4 pasma absorpcji przy 409, 385, 364, 347 nm, których intensywność, wzrasta wraz z długością fali. W miarę rosnącego stężenia widma ulegają stopniowym zmianom. Widmo form zagregowanych zdaje się charakteryzować obecnością 3 pasm przy 420, 385 i 360 nm oraz pojawieniem się nowego, szerokiego i względnie intensywnego pasma absorpcyjnego z maksimum

dla ok. 340 nm. Na Rys. 48 przedstawiono jako przykład zestaw widm AmB zarejestrowanych w NaCl.



Rys. 48. Zestaw widm dla AmB w soli fizjologicznej.

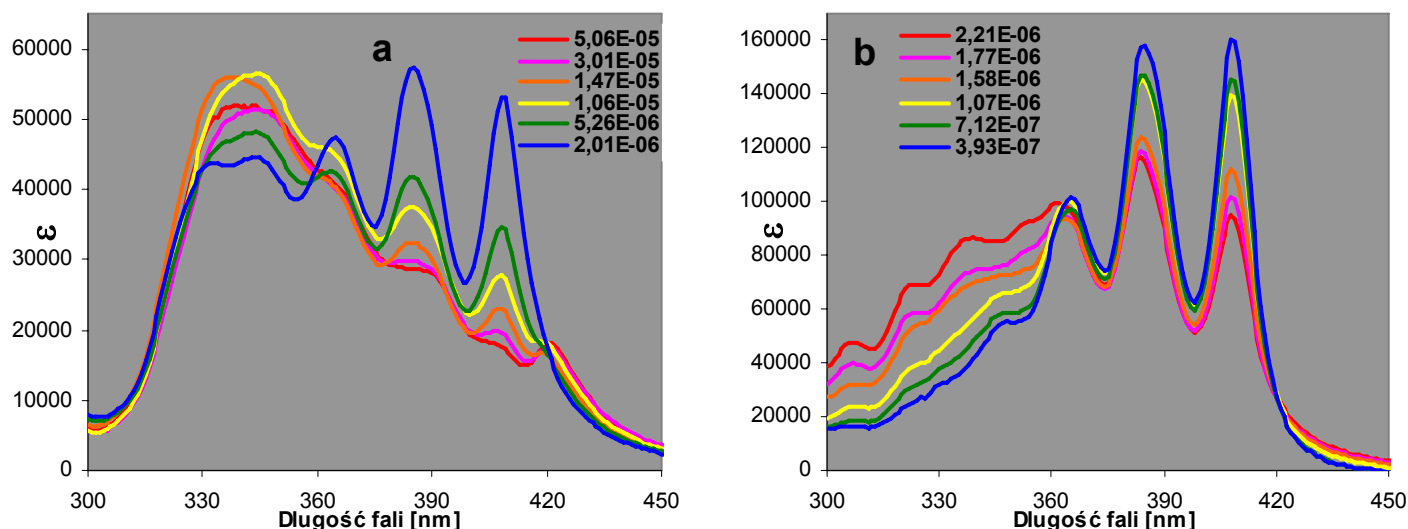
W przypadku żadnego z analizowanych zestawów widm AmB wykonanych w różnych środowiskach nie stwierdzono obecności punktów izosbestycznych. Sugeruje to, że we wszystkich roztworach występuje kilka form spektralnych.

5.6.1.3. Metoda sedymentacyjna

Badania procesu agregacji rozpoczęto od zgrubnej analizy składu roztworów wodnych AmB jako związku referencyjnego. W pierwszej kolejności podjęto próbę oszacowania proporcji monomeru oraz rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych ageragatów w oparciu o metodę sedymentacyjną. Separację form nierozpuszczalnych od rozpuszczalnych przeprowadzono na drodze wirowania (p. 4.5.1.). Stężenie monomeru wyznaczano w oparciu o wartość absorbancji przy długości fali 409 nm w roztworach wodnych. Całkowite stężenie antybiotyku oraz łączne stężenia form rozpuszczalnych: ($C_m + C_{ro}$) obliczono na podstawie widm w mieszaninie roztwór wodny : metanol w stosunku objętościowym 1:1. Ernst i wsp. [102] wykazali, że w tych warunkach antybiotyk występuje w formie monomerycznej i widmo nie zależy od

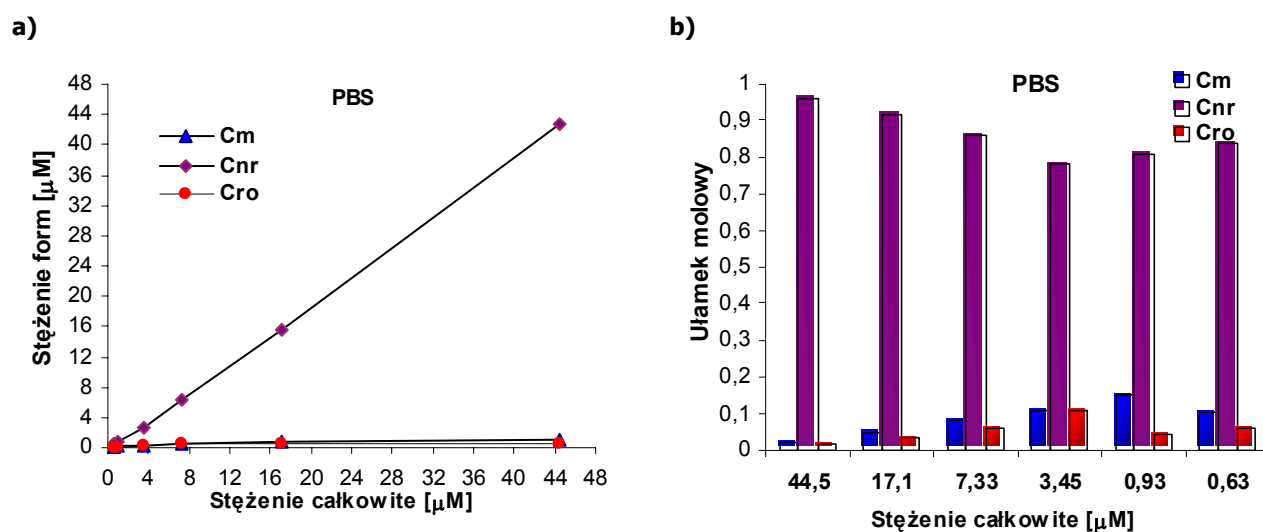
stężenia. Stężenia rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych agregatów wyznaczano natomiast zgodnie ze wzorem podanym w punkcie 4.5.1.

Na Rys. 49 przedstawiono przykładowe widma roztworów AmB zarejestrowane w buforze Tris przed wirowaniem (a) i po odwirowaniu próbek (b). Widma te wykazują zasadnicze różnice w intensywności i kształcie.

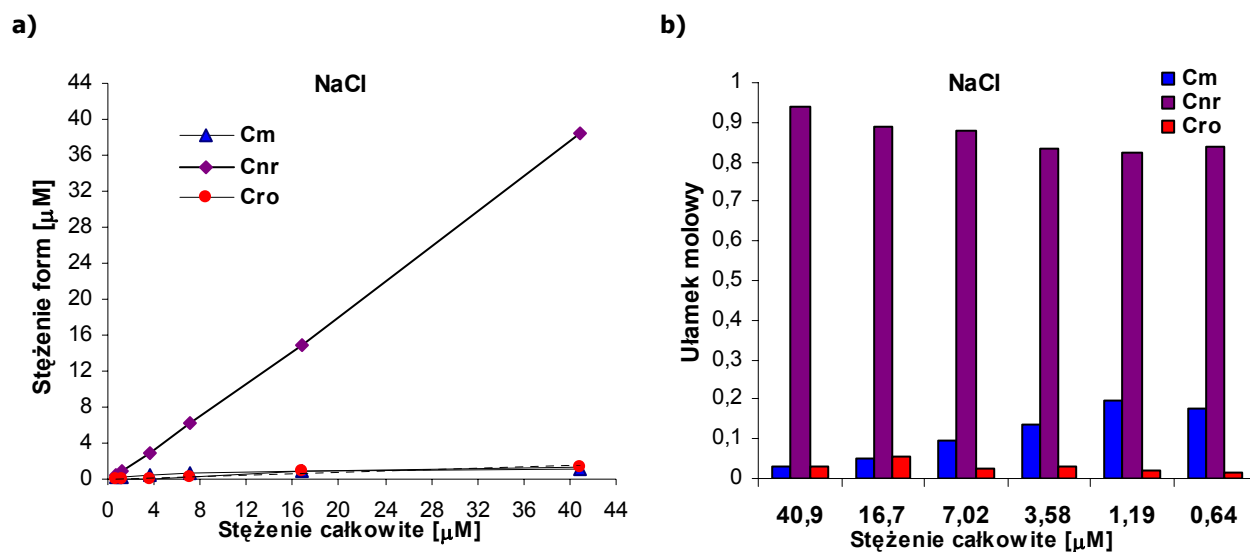


Rys. 49. Zestaw widm AmB w buforze Tris zarejestrowanych przed (próbki a) i po odwirowaniu (próbki b).

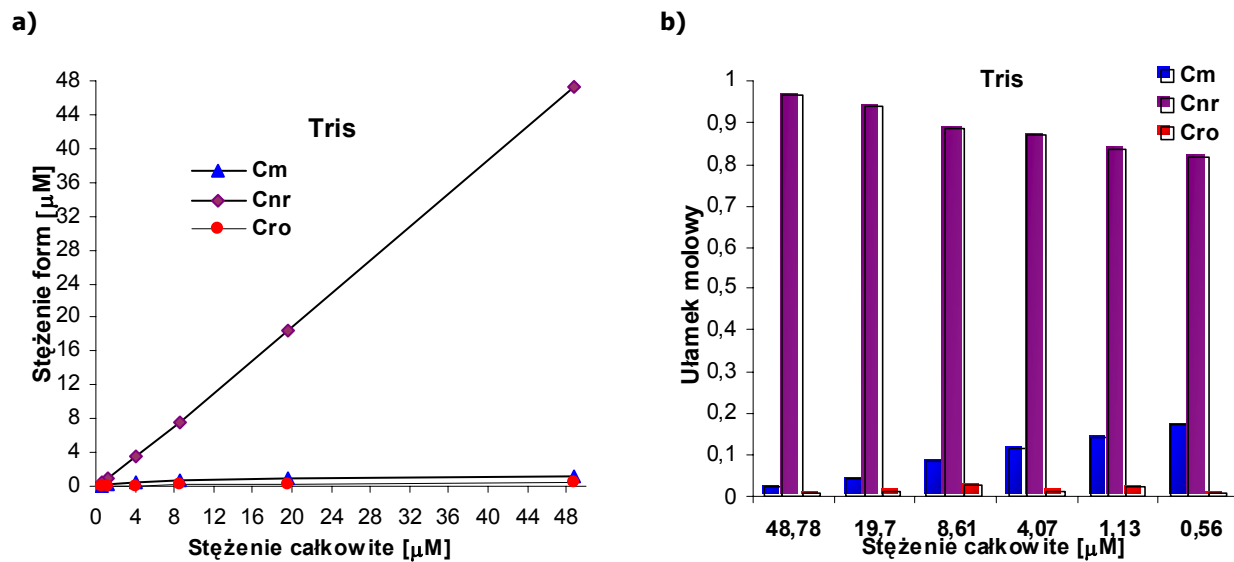
Na poniższych rysunkach (Rys. 50 - 53) przedstawiono zależność stężenia poszczególnych form AmB, obecnych w roztworach wodnych o różnym składzie, w funkcji stężenia całkowitego antybiotyku. Przedstawiono również wyznaczone ułamki molowe monomeru oraz rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych agregatów.



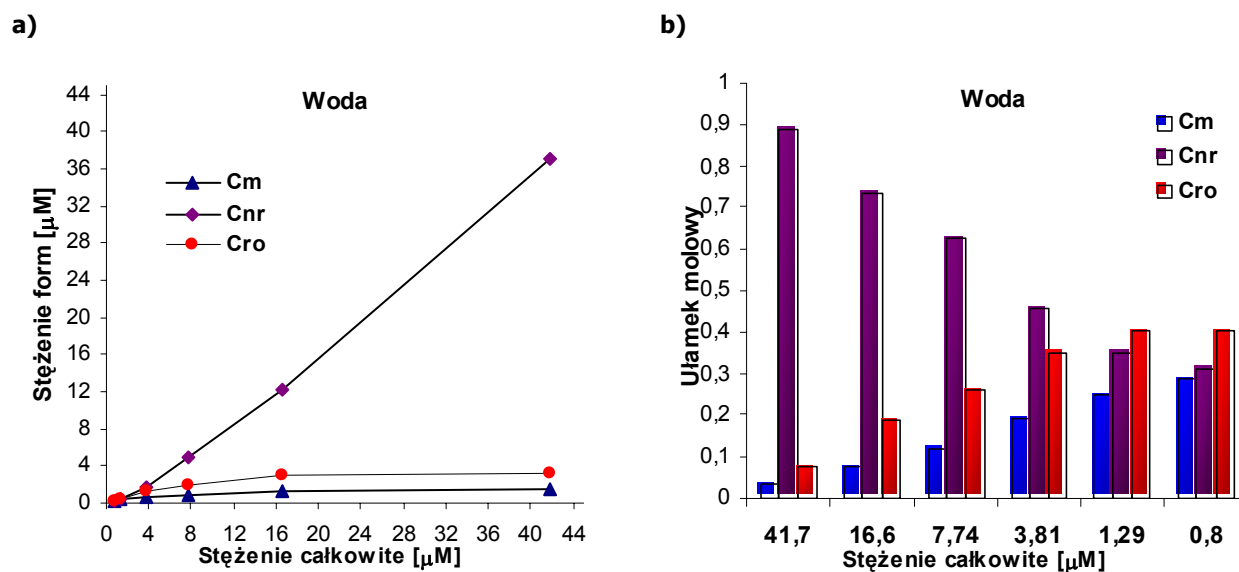
Rys. 50. a) stężenie poszczególnych form AmB oraz **b)** udział molowy poszczególnych form antybiotyku w zależności od stężenia całkowitego w PBS. **Cm** –stężenie monomeru; **Cnr**- stężenie agregatów nierozpuszczalnych; **Cr**-stężenie agregatów rozpuszczalnych.



Rys. 51. a) stężenie poszczególnych form AmB oraz **b)** udział molowy poszczególnych form antybiotyku w zależności od stężenia całkowitego w NaCl.

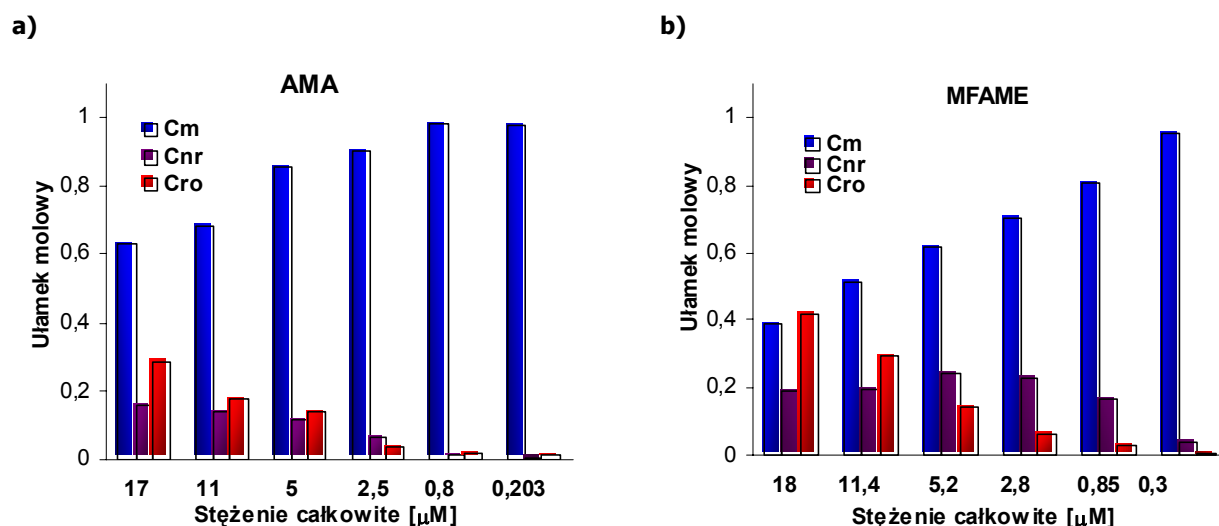


Rys. 52. a) stężenie poszczególnych form AmB oraz **b)** udział molowy poszczególnych form antybiotyku w zależności od stężenia całkowitego w buforze Tris.



Rys. 53. a) stężenie poszczególnych form AmB oraz **b)** udział molowy poszczególnych form antybiotyku w zależności od stężenia całkowitego w wodzie.

Jak widać z powyższych zestawień w roztworach soli fizjologicznej oraz buforów Tris i PBS wraz ze wzrostem stężenia całkowitego AmB (0,6-50 μM) drastycznie wzrasta stężenie agregatów nierozpuszczalnych, podczas gdy stężenie zarówno monomeru jak i agregatów rozpuszczalnych utrzymuje się zasadniczo na stałym poziomie, przynajmniej dla stężeń powyżej 10 μM . Nieco inaczej proporcje poszczególnych form przedstawiają się w wodzie. W tym środowisku obserwuje się zdecydowanie większy udział agregatów rozpuszczalnych. Ułamek molowy tych form w zakresie niskich stężeń antybiotyku jest około 10 - krotnie wyższy w porównaniu do odpowiednich wartości w soli i buforze Tris oraz około 6 – krotnie wyższy w porównaniu z PBS.



Rys. 54. Udział molowy poszczególnych form antybiotyku w zależności od stężenia całkowitego w soli fizjologicznej dla **a)** AMA; **b)** MFAME.

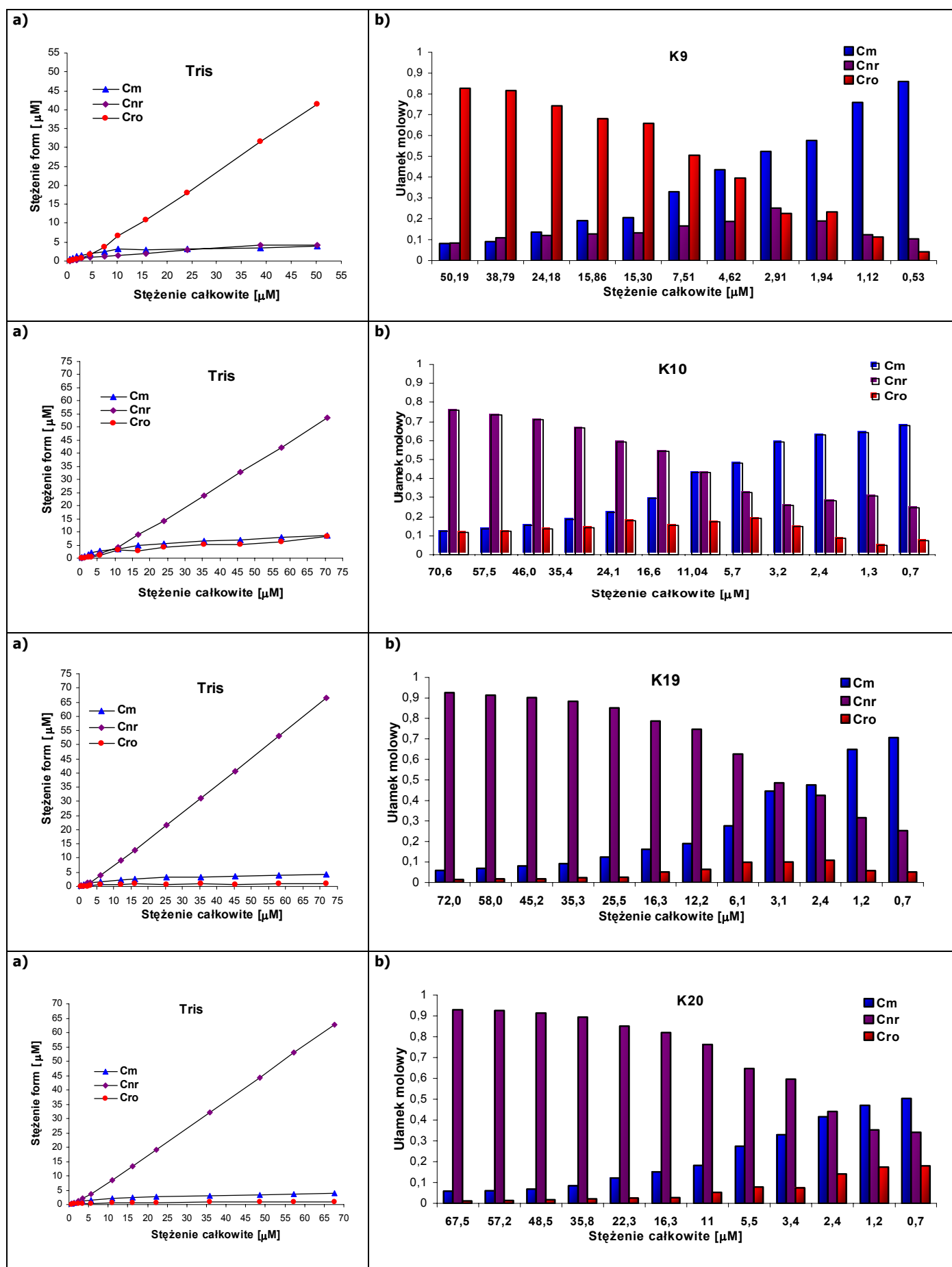
Na Rys. 54 zilustrowano zależność udziału molowego poszczególnych form od stężenia całkowitego antybiotyku w soli fizjologicznej dla AMA i MFAME. W odróżnieniu od antybiotyku wyjściowego dla pochodnych formą dominującą w badanym zakresie stężeń ogólnych antybiotyku jest monomer. Wraz ze wzrostem stężenia całkowitego związku obserwuje się powolny spadek zawartości monomeru i stopniowy wzrost udziału agregatów, wyraźnie silniej zaznaczony dla agregatów rozpuszczalnych.

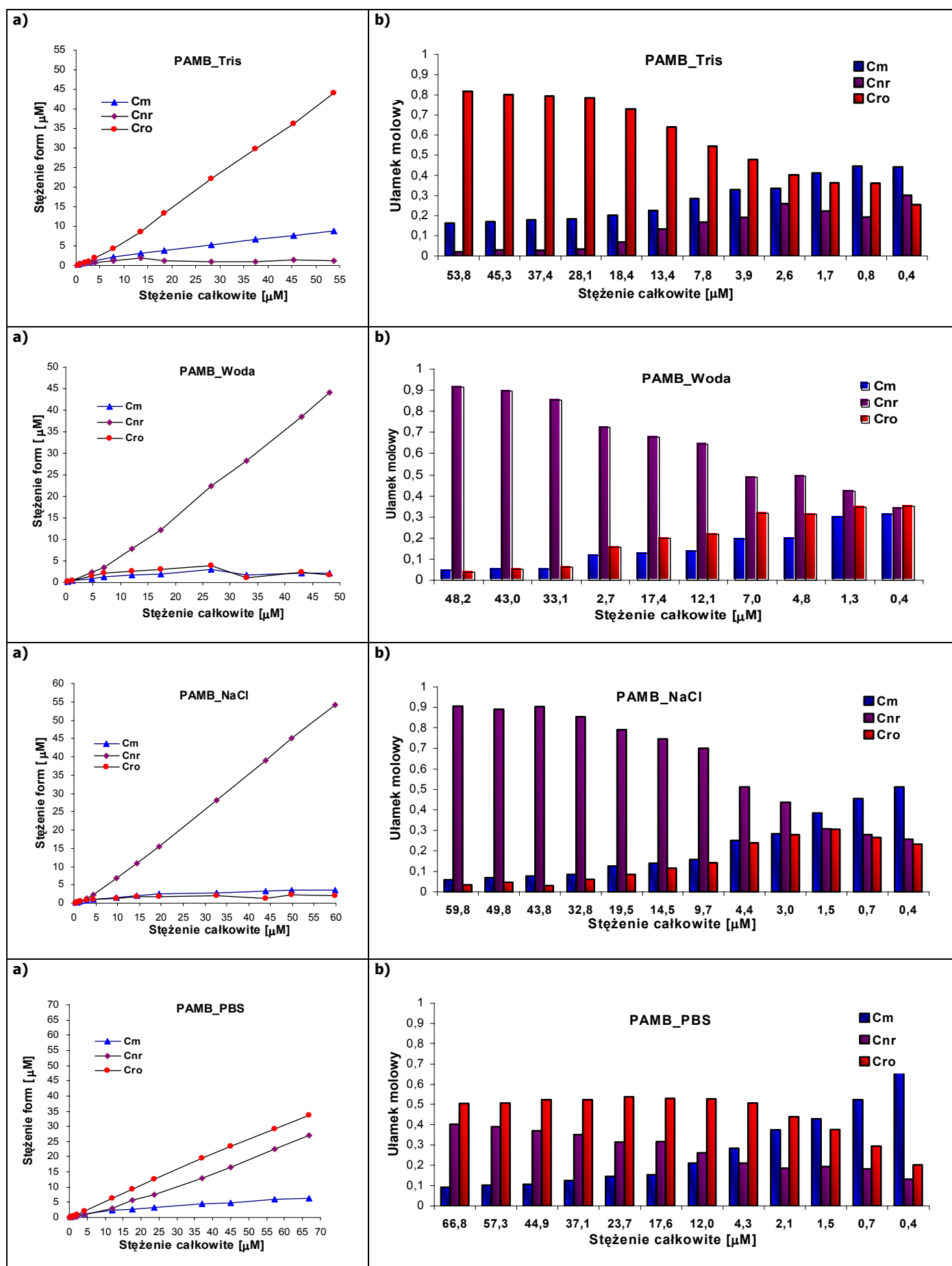
W przypadku tych pochodnych wydaje się, że podobnie jak dla AmB dla stężeń całkowitych powyżej 10 μM stężenie monomeru nie ulega zmianie pomimo wzrostu ogólnego stężenia antybiotyku.

Z kolei wśród należących do nowej generacji (seria „K”) zawadzonych przestrzennie N-aminoacylowych pochodnych AmB obserwuje się duże zróżnicowanie w zawartości poszczególnych form antybiotyku identyfikowanych metodą sedymentacyjną w zależności zarówno od struktury związku jak i składu środowiska wodnego. Na Rys. 55 zilustrowano zależność udziału molowego poszczególnych form od stężenia całkowitego antybiotyku w roztworach wodnych o różnym składzie dla wybranych pochodnych serii K. W przypadku K_{10} wraz ze wzrostem stężenia całkowitego obserwuje się sukcesywny spadek zawartości monomeru i wzrost udziału agregatu nierozpuszczalnego, podczas gdy stężenie agregatów rozpuszczalnych praktycznie w całym badanym zakresie stężeń ogólnych antybiotyku utrzymuje się na stałym poziomie ok. 20%. Z kolei dla K_9 stwierdza się odwrotny układ proporcji dla obu typów agregatów – wraz ze wzrostem stężenia ogólnego zwiększa się udział agregatu

rozpuszczalnego a największą zawartość agregatu nierozpuszczalnego wynoszącą ok. 20% notuje się dla zakresu niskich stężeń całkowitych pochodnej (2-7 μM). Obie pochodne różnią się w strukturze jedynie długością łańcucha węglowego podstawnika alifatycznego na grupie aminowej mykozaminy cząsteczki AmB – w przypadku K₉ to reszta β -estru t-butyłowego kwasu asparaginianowego, natomiast dla K₁₀ to reszta γ -estru t-butyłowego kwasu glutaminowego. Z kolei dla pochodnych K₁₉ oraz K₂₀, zawierających reszty odpowiednio: D-proliny i 4-hydroksyproliny, można zaobserwować niemalże identyczny profil zmian zawartości poszczególnych form. Wraz ze wzrostem stężenia ogólnego antybiotyku dla obu tych pochodnych notuje się, podobnie jak w przypadku AmB, drastyczny wzrost udziału agregatu nierozpuszczalnego a jednocześnie spadek zawartości formy monomerycznej. Ponadto zarówno dla K₁₉ jak i K₂₀ można stwierdzić, że udział agregatu rozpuszczalnego utrzymuje się właściwie na stałym poziomie ok. 5% i jedynie w zakresie niskich stężeń całkowitych antybiotyku (0,7-10 μM) osiąga nieco wyższą wartość rzędu ok. 20%. Podobny do omawianych pochodnych układ proporcji poszczególnych form obserwuje się również dla PAMB w wodzie oraz soli fizjologicznej. Różnica dotyczy jedynie poziomu zawartości agregatów rozpuszczalnych, który w porównaniu do tych samych wartości notowanych dla K₁₉ i K₂₀, jest nieco wyższy i dla zakresu niskich stężeń ogólnych sięga ok. 40%. Zupełnie inny układ obserwuje się natomiast dla PAMB w buforach: Tris i PBS. W środowiskach tych dominującą formą antybiotyku praktycznie w całym badanym zakresie stężeń całkowitych antybiotyku (2-70 μM) stanowi agregat rozpuszczalny. Zawartość tego typu agregatu w PBS dla wyższych stężeń sięga 80%, natomiast w buforze Tris utrzymuje się właściwie na stałym poziomie ok. 50%. Warto zwrócić uwagę na charakter zmian udziału agregatu nierozpuszczalnego PAMB w obu środowiskach. W PBS zawartość tej formy maleje wraz ze wzrostem stężenia całkowitego antybiotyku, podczas gdy w buforze Tris obserwuje się tendencją odwrotną.

Szczególnie interesujący wydaje się fakt wysokiej zawartości agregatów rozpuszczalnych zaobserwowany dla PAMB w buforze PBS, zważywszy na to, iż fosforany, jak stwierdzono wcześniej [110], mają charakter kosmotropów, a zatem powinny obniżać rozpuszczalność związku.





Rys. 55. a) stężenie poszczególnych form wybranych pochodnych serii K oraz **b)** udział molowy poszczególnych form antybiotyku w zależności od stężenia całkowitego w roztworach wodnych o różnym składzie.

5.6.1.4. Numeryczna dekompozycja widm (MCR-ALS)

Metoda sedymentacyjna pozwala na określenie proporcji rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych form antybiotyku, ale nie daje możliwości ustalenia, czy poszczególne formy odpowiadają określonym rodzajom agregatów, czy też stanowią ich mieszaninę. Rozwiązanie tego problemu jest kluczowe zarówno dla zrozumienia samego procesu agregacji jak i ustalenia właściwości biologicznych poszczególnych form.

Szczegółową analizę widm przeprowadzono przy użyciu zaawansowanych technik chemometrycznych. Miała ona na celu:

- określenie liczby form spektralnych obecnych w badanych roztworach w funkcji ogólnego stężenia antybiotyku oraz składu roztworu wodnego
- oszacowanie zawartości poszczególnych form.

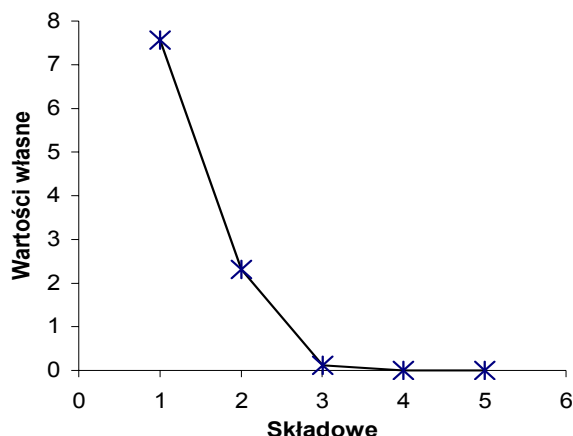
5.6.1.4.1. Liczba form spektralnych

W celu identyfikacji liczby i typów form spektralnych tworzonych przez AmB w roztworach wodnych zastosowano metodę głównych składowych - PCA (ang. *Principal Component Analysis*). W wersji klasycznej analiza wartości własnych pozwala zwykle poprawnie oszacować liczbę istotnych źródeł zmienności, które w tym przypadku odpowiadają liczbie form spektralnych obecnych w analizowanych roztworach.

Tabela 16. Zestawienie wartości własnych oraz %zmienności kolejnych składowych wyznaczonych dla zestawu widm AmB w buforze Tris.

	Składowe				
	1	2	3	4	5
wartości własne	7,5673	2,3097	0,1190	0,0032	0,0005
% zmienności	75,67	23,10	1,19	0,03	0,00
sum. % zmienności	75,67	98,77	99,96	99,99	100,00

Niemniej jednak klasyczna analiza wartości własnych nie przyniosła w tym przypadku jednoznacznych rezultatów. Poniżej jako przykład zaprezentowano wyniki uzyskane dla serii widm AmB w buforze Tris. Analogiczne wyniki uzyskano dla wszystkich badanych związków we wszystkich badanych roztworach wodnych.

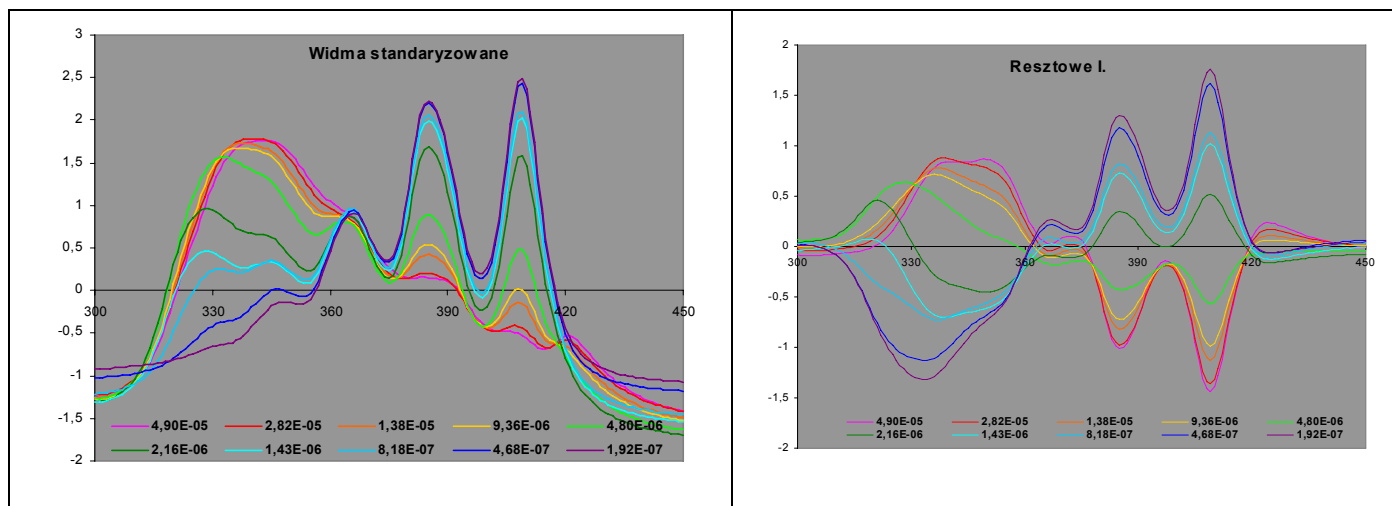


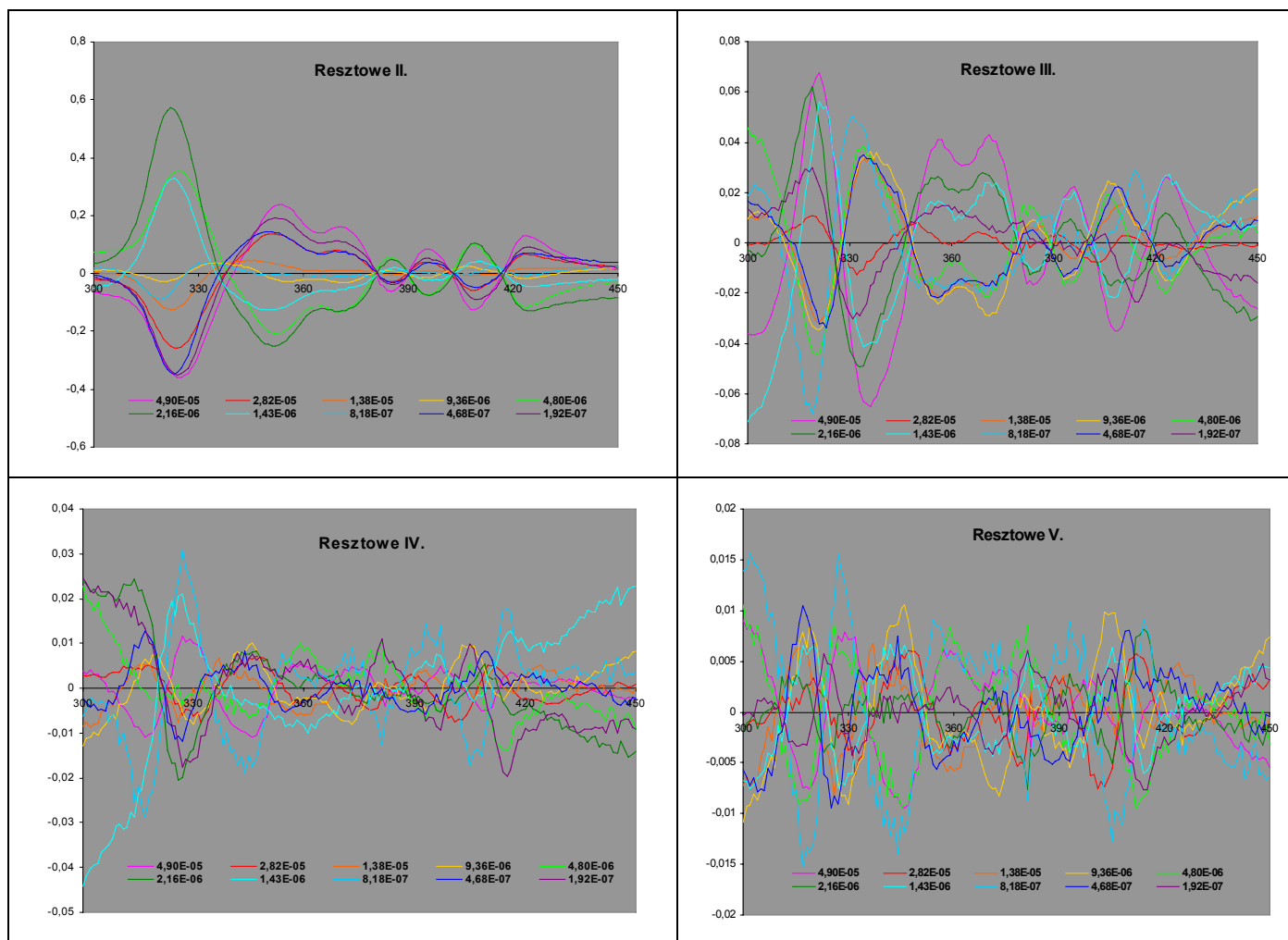
Rys. 56. Wykres osypiska dla zestawu widm AmB w buforze Tris.

Przedstawione w Tab. 16 wyniki pokazują, że pierwsza główna składowa wyjaśnia ponad 75% obserwowanej zmienności, a pierwsza i druga łącznie aż 98,77% zmienności. Sugeruje to, że tylko 2 pierwsze główne składowe są istotne.

Analogiczne wnioski wynikają z analizy tzw. wykresu osypiska (Rys. 56). Są one jednak sprzeczne z faktem, że na analizowanym zestawie widm brak jest punktów izosbestycznych. Świadczy to o tym, że w roztworach znajdują się co najmniej 3 formy spektralne.

Uzyskanie wiarygodnych wyników stało się możliwe dopiero dzięki starannej analizie widm resztowych (Rys. 57; przykład dla serii widm AmB w buforze Tris).





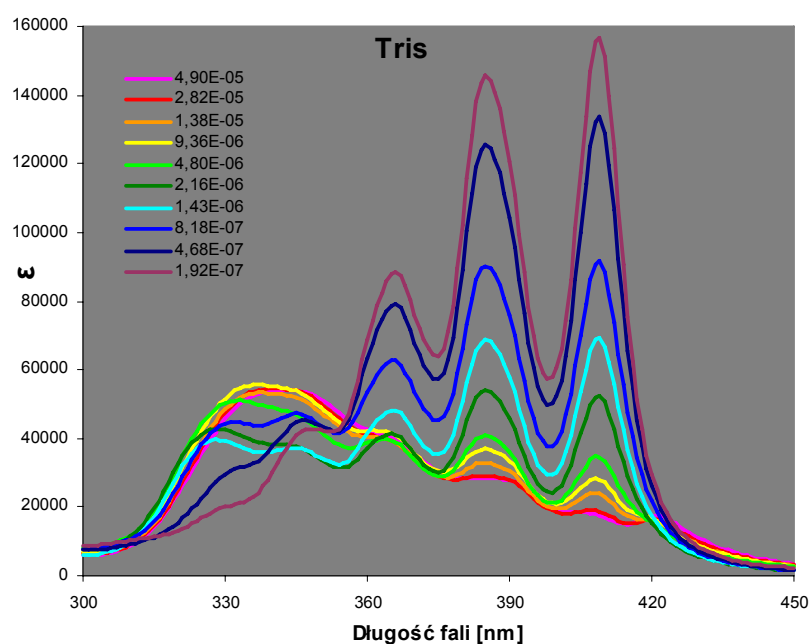
Rys. 57. Zestaw widm standaryzowanych oraz kolejne widma resztowe (od I do V rzędu) uzyskane w oparciu o metodę PCA dla serii widm AmB w buforze Tris.

Widma resztowe I-, II- i III-rzędu są względnie intensywne i wykazują obecność pasm absorpcyjnych. Dopiero w widmie resztowym IV-rzędu przeważa charakter szumu losowego. Tym samym stwierdzono współistnienie co najmniej 4 form spektralnych: monomeru (M) oraz 3 typów agregatów (X, Y, A).

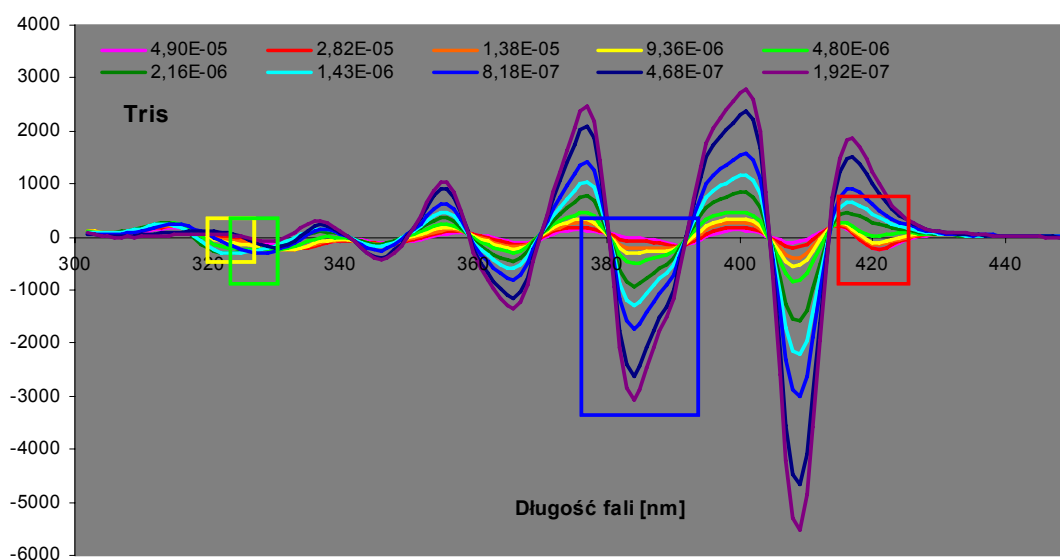
5.6.1.4.2. Charakterystyka form spektralnych – spektroskopia pochodnych

W celu wstępnej charakterystyki widm poszczególnych form spektralnych zastosowano **spektroskopię pochodnych** (ang. *derivative spectroscopy*) [198]. Technika ta charakteryzuje się zdecydowanie większą czułością i selektywnością w porównaniu ze spektroskopią klasyczną. Zwiększenie selektywności wynika z faktu, iż podczas różniczkowania widma pasma absorpcyjne ulegają zwężeniu, co powoduje, że pasma nakładające się w widmie podstawowym ulegają rozdzieleniu na wykresie pochodnych.

a)



b)



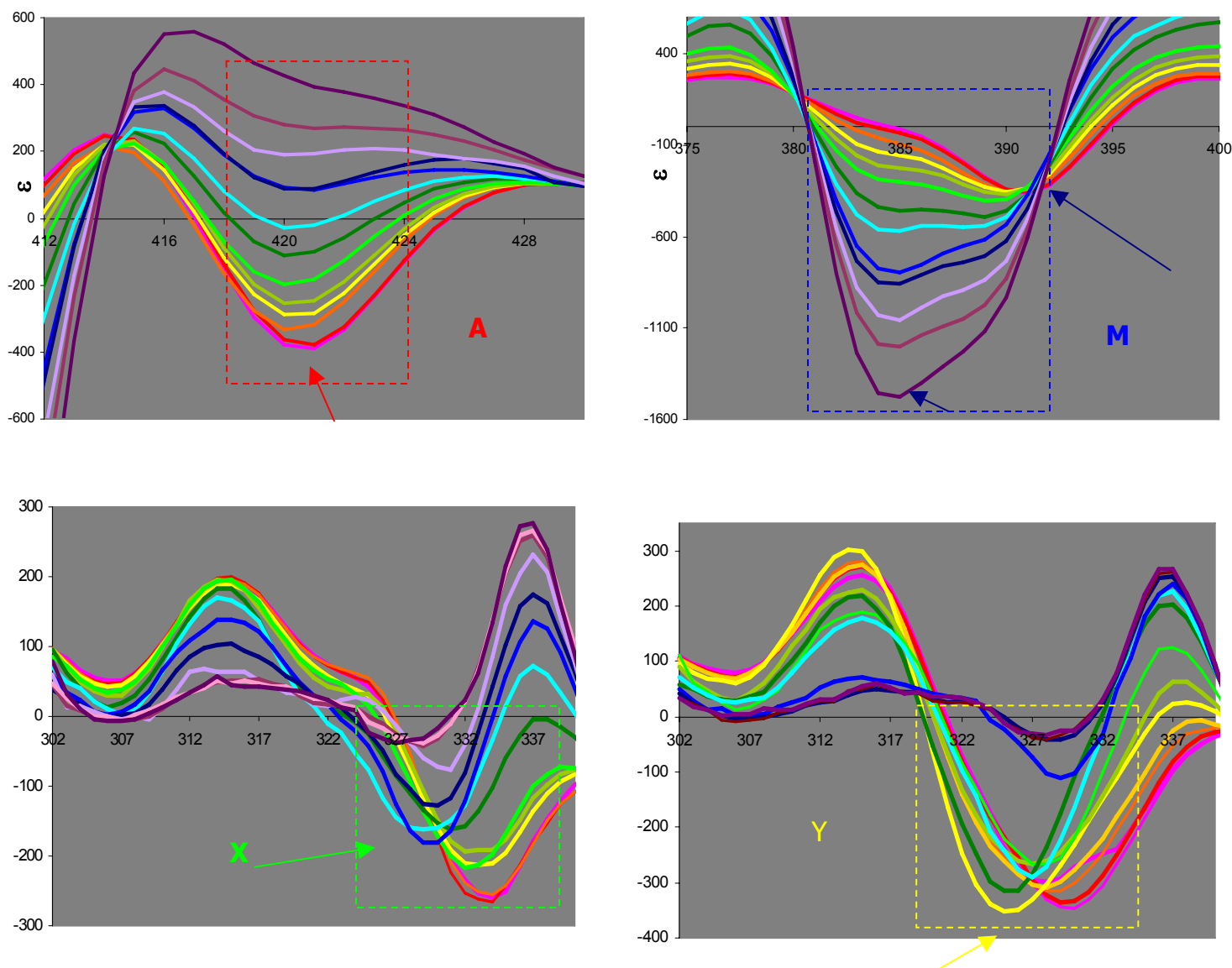
Rys. 58. Porównanie zestawu widm AmB w buforze Tris **(a)** z widmami drugich pochodnych **(b)**. Kolorowymi prostokątami wyróżniono zakresy długości fali, przy których obserwuje się charakterystyczne elementy widm poszczególnych form spektralnych.

Szczególnie przydatne są w tym celu widma drugiej pochodnej. Rys. 58 przedstawia porównanie zestawu widm absorpcyjnych dla AmB w buforze Tris z widmami drugich pochodnych.

Analiza widm pochodnych drugiego rzędu dla AmB i pochodnych pozwoliła na:

- i) lokalizację charakterystycznych pasm absorpcyjnych poszczególnych form spektralnych oraz
- ii) oszacowanie proporcji poszczególnych form.

Przykłady najbardziej charakterystycznych elementów w widmach drugich pochodnych wykorzystanych jako identyfikatory poszczególnych form spektralnych zilustrowano na Rys. 59.



Rys. 59. Najbardziej charakterystyczne elementy w widmach drugich pochodnych wykorzystane jako identyfikatory poszczególnych form spektralnych.

Przesunięcie maksimum absorpcji dla długości fali 385 nm w kierunku 390 nm wskazuje na zanik formy monomerycznej. Z drugiej strony, wyraźne maksimum dla 420 nm potwierdza obecność agregatu typu A, podczas gdy pasma z maksimum zlokalizowanym w obszarze 328-329 nm oraz 322-323, świadczą o występowaniu form agregatów pośrednich, odpowiednio X i Y.

Zastosowanie **spektroskopii pochodnych** pozwoliło również na uzyskanie pierwszego przybliżenia zawartości poszczególnych form spektralnych w roztworach o różnym składzie. Np. dla roztworów AmB w buforze Tris (Rys. 58) można stwierdzić, że:

- zawartość monomeru maleje monotonicznie ze wzrostem stężenia ogólnego; charakterystyczne pasmo przy 385 nm zanika przy stężeniach większych niż 3 μM
- agregat typu X, z charakterystycznym maksimum dla 333 nm, obecny w całym badanym zakresie stężeń antybiotyku, z największym udziałem dla przedziału 0,5-5 μM
- agregat typu Y, z charakterystycznym maksimum dla 324 nm, obecny jedynie w zakresie niskich stężeń antybiotyku (0,8-2 μM)
- charakterystyczne dla agregat typu A długofalowe pasmo przy 420 nm pojawia się w roztworze o stężeniu 5 μM i dla wyższych stężeń staje się coraz bardziej intensywne.

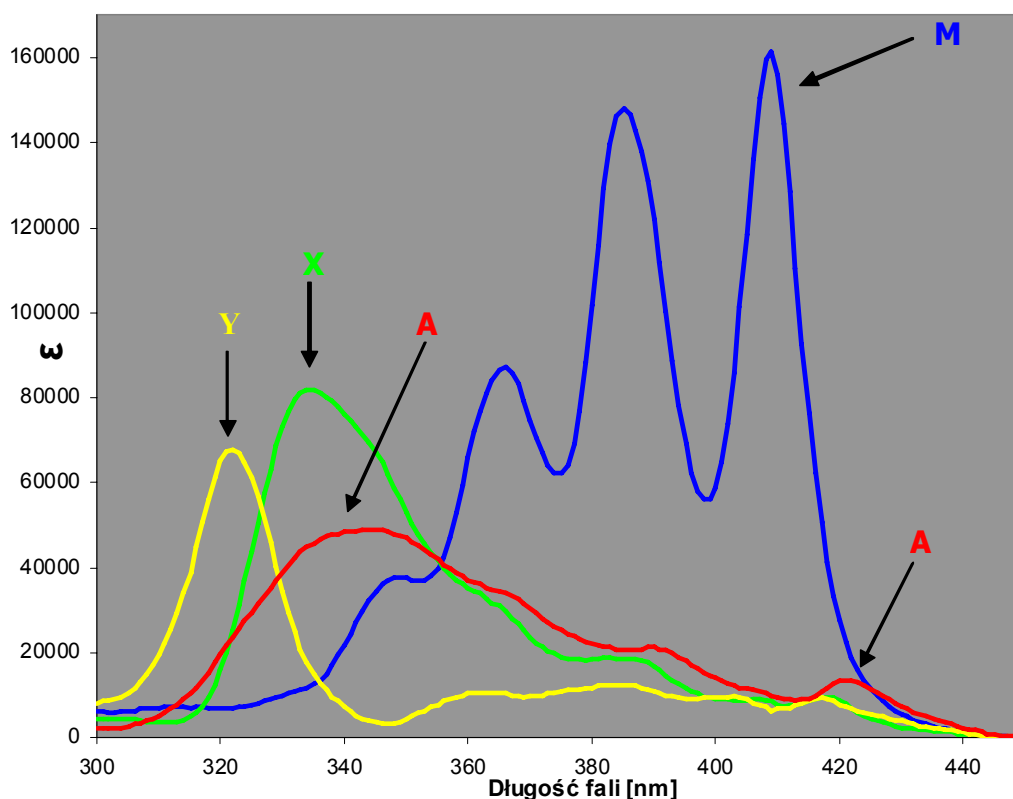
5.6.1.4.3. Zawartość form spektralnych – algorytm widm samouzgodnionych

Informacje otrzymane w oparciu o spektroskopię pochodnych zostały wykorzystane jako punkt startowy iteracyjnej procedury samouzgodnienia określanej mianem MCR-ALS (ang. *Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares*) [207-209]. Zastosowanie tej metody pozwala na jednoczesne określenie zarówno zawartości poszczególnych form spektralnych jak i ich widm.

Jako pierwsze przybliżenie składu próbek przyjęto ułamki molowe oszacowane w oparciu o analizę widm drugich pochodnych. Na ich podstawie uzyskano pierwsze przybliżenie widm bazowych. W kolejnych krokach widma te korygowano, w sytuacji gdy: **1)** współczynniki ekstynkcji molowych były ujemne; **2)** kształt pasm absorpcyjnych znacznie odbiegał od krzywej Lorentza. Po kilku iteracjach algorytmu wprowadzanie poprawek nie było konieczne. Fakt ten uznawano jako kryterium stopu algorytmu.

Zastosowanie metody samouzgodnienia widm (schemat podano w punkcie 4.5.2.3.) prowadzi do uzyskania w przypadku każdego zestawu widm bardzo podobnych widm poszczególnych form spektralnych, przy czym liczba form zależy od składu środowiska. Analiza widm AmB zarejestrowanych w buforach Tris i PBS oraz w soli

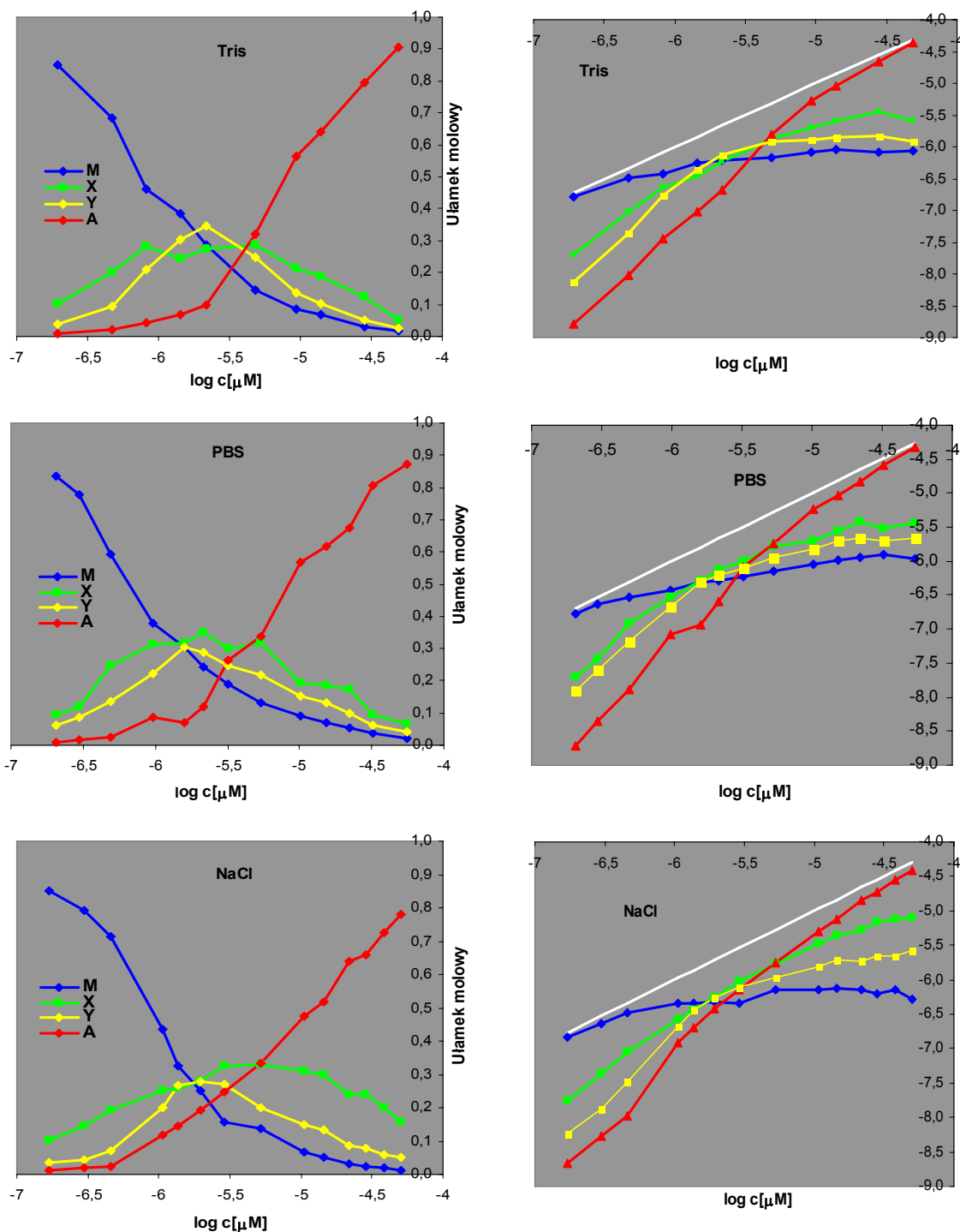
fizjologicznej ujawniła obecność 4 form spektralnych (Rys. 60), podczas gdy w wodzie stwierdzono występowanie jedynie 3 form: monomeru (M) oraz agregatów typu X i A.

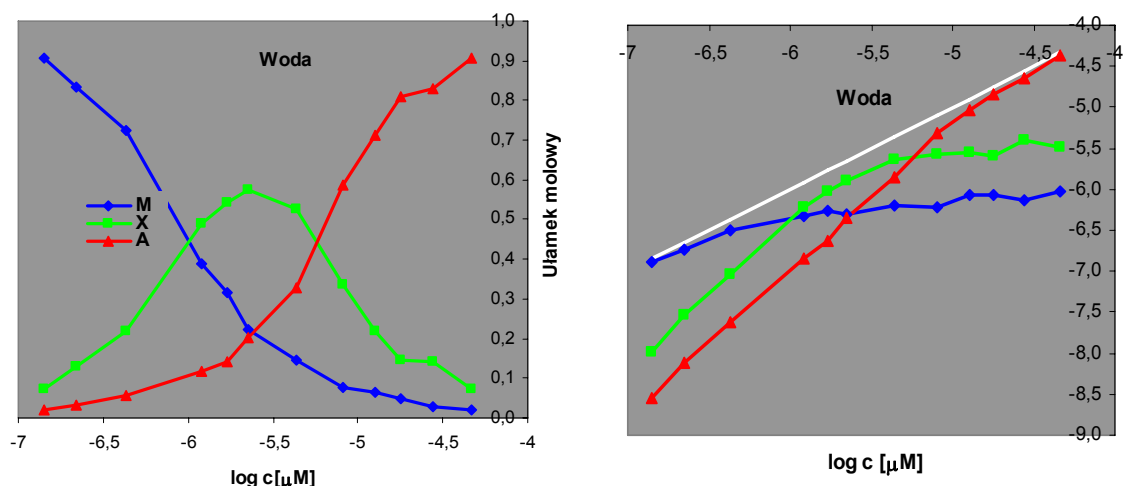


Rys. 60. Widma poszczególnych form spektralnych AmB obecnych roztworach wodnych zidentyfikowane w oparciu o numeryczną dekompozycję widm.

Jedno z odtworzonych widm zarówno pod względem kształtu jak i intensywności odpowiada widmu AmB w metanolu i może być przypisane formie monomerycznej antybiotyku (M). Pozostałe trzy formy spektralne (X, Y, A) można uznać za formy zagregowane AmB. Widma form X i Y, w odróżnieniu od formy monomerycznej, wykazują słabą strukturę oscylacyjną i charakteryzują się stosunkowo silnym krótkofalowym pasmem absorpcji, obserwowanym odpowiednio dla długości fali 333 nm ($\epsilon(\lambda_{\max}) \approx 90\,000$) i 322 nm ($\epsilon(\lambda_{\max}) \approx 70\,000$). Widmo formy A jest zdecydowanie odmienne. Jego najbardziej charakterystyczną cechą jest występowanie pasma absorpcji przy około 420 nm ($\epsilon(\lambda_{\max}) \approx 14\,000$), które przypisuje się silnie zagregowanej formie AmB [38,42,100,102-105]. W widmie formy A występuje również szerokie, krótkofalowe pasmo absorpcji z maksimum przy około 340 nm. Taki obraz widm bazowych poszczególnych form spektralnych z wszystkimi wymienionymi charakterystycznymi elementami znajduje swoje odzwierciedlenie w rzeczywistym przebiegu zarejestrowanych widm.

Zastosowanie numerycznej dekompozycji widm pozwoliło również na oszacowanie udziału poszczególnych form spektralnych AmB dla wszystkich badanych środowisk. Otrzymane wyniki przedstawiono poniżej w postaci zależności ułamków molowych i logarytmów stężeń monomeru (M) i agregatów: X, Y, A w funkcji logarytmu stężenia ogólnego antybiotyku (Rys. 61).





Rys. 61. Zależność ułamków molowych oraz logarytmów stężeń poszczególnych form spektralnych AmB w roztworach wodnych o różnym składzie w funkcji logarytmu stężenia ogólnego antybiotyku.

Porównując wyniki uzyskane metodą sedymentacyjną i metodą numerycznej dekompozycji widm można stwierdzić, iż:

- forma spektralna A stanowi główny składnik agregatu nierozpuszczalnego
- formy spektralne X i Y stanowią łącznie składniki agregatu rozpuszczalnego
- formy X i Y mają ograniczoną rozpuszczalność w roztworach wodnych i wchodzą również w skład agregatu nierozpuszczalnego.

Jak widać z powyższych zestawień w przypadku antybiotyku wyjściowego wraz ze wzrostem stężenia obserwuje się szybki spadek ułamka molowego formy M i wzrost udziału agregatu wielkocząsteczkowego A. Ułamek form pośrednich – agregatów X oraz Y wzrasta osiągając maksimum w zakresie średnich stężeń ogólnych antybiotyku, a następnie maleje. Warto jednocześnie zwrócić uwagę, iż stężenie form X i Y jak również monomeru dąży do nasycenia, podczas gdy stężenie formy A wzrasta nieograniczenie

W Tabeli 17 zestawiono oszacowania wartości maksymalnego stężenia odpowiednio monomeru (MMC) oraz agregatów.

Tabela 17. Zestawienie wartości maksymalnego stężenia monomeru oraz agregatów dla AmB w środowiskach wodnych o różnym składzie.

	Woda	NaCl	PBS	Tris
MMC*10⁶ [M]	0,79	0,64	1,08	0,85
MXC*10⁶ [M]	3,10	7,44	3,49	3,04
MYC*10⁶ [M]	-	2,34	2,09	1,34

gdzie: **MMC** – maksymalne stężenie monomeru
MXC – maksymalne stężenie formy X
MYC – maksymalne stężenie formy Y

Najwyższą wartość MMC obserwuje się w buforze PBS, a najniższą w soli fizjologicznej. W buforze Tris oraz w wodzie MMC przyjmuje wartość pośrednią w porównaniu do pozostałych środowisk. Z kolei wartości najwyższych stężeń formy zagregowanej X (MXC) są podobne w wodzie oraz buforach Tris i PBS, podczas gdy w soli fizjologicznej MXC jest niemalże dwukrotnie wyższe. Na szczególne zainteresowanie zasługuje forma zagregowana Y ze względu na jej brak w roztworach pozbawionych soli.

Wartym podkreślenia jest również fakt wyraźnego udziału form zagregowanych typu X i Y obserwowanego dla stężenia ogólnego antybiotyku ok. 1 μM , czyli w zakresie aktywności biologicznej AmB (Tabela 18). Wielu autorów uważa rozpuszczalne agregaty za formę antybiotyku toksyczną zarówno w stosunku do komórek grzybowych jak i zwierzęcych [26,76,101]. Jak widać z danych zawartych w Tabeli 16 największy udział form typu X obserwuje się w wodzie. Z kolei zawartość procentowa formy Y przyjmuje bardzo zbliżone wartości zarówno w soli fizjologicznej jak i w buforach, nie udało się jednak stwierdzić jej występowania w roztworach pozbawionych soli.

Tabela 18. Udział procentowy form zagregowanych typu X i Y wyznaczony dla stężenia ogólnego AmB – 1 μM .

10⁶ [M]	Woda	NaCl	PBS	Tris
[X]	49%	25%	31%	28%
[Y]	-	20%	22%	21%

Występowanie znacznego udziału rozpuszczalnych agregatów powoduje szybki spadek ułamka molowego formy M wraz ze wzrostem ogólnego stężenia AmB. Powoduje również, że nierozpuszczalne agregaty (forma A) stają się formą dominującą AmB dopiero przy stosunkowo wysokim stężeniu ogólnym antybiotyku. W Tabeli 19 zestawiono szacunkowe wartości ogólnego stężenia AmB, przy którym forma monomeryczna i nierozpuszczalne agregaty stanowią 50% udziału (odpowiednio $[M]_{1/2}$ oraz $[A]_{1/2}$).

Tabela 19. Zestawienie wartości stężeń AmB odpowiadających 50% zawartości monomeru i agregatu wielkocząsteczkowego w środowiskach wodnych o różnym składzie.

$10^6 [M]$	Woda	NaCl	PBS	Tris
$[M]_{1/2}$	0,83	0,89	0,66	0,76
$[A]_{1/2}$	6,31	14,45	8,91	7,94

gdzie: $[M]_{1/2}$ – stężenie antybiotyku odpowiadające 50% zawartości monomeru
 $[A]_{1/2}$ – stężenie antybiotyku odpowiadające 50% zawartości agregatu

We wszystkich badanych środowiskach wartości $[M]_{1/2}$ są zbliżone i nie obserwuje się zasadniczych różnic w zależności od składu roztworu. W przypadku parametru $[A]_{1/2}$ wartości są bardziej zróżnicowane. W soli fizjologicznej ogólne stężenie antybiotyku niezbędne dla osiągnięcia 50% zawartości agregatu jest około dwukrotnie większe niżeli w pozostałych środowiskach.

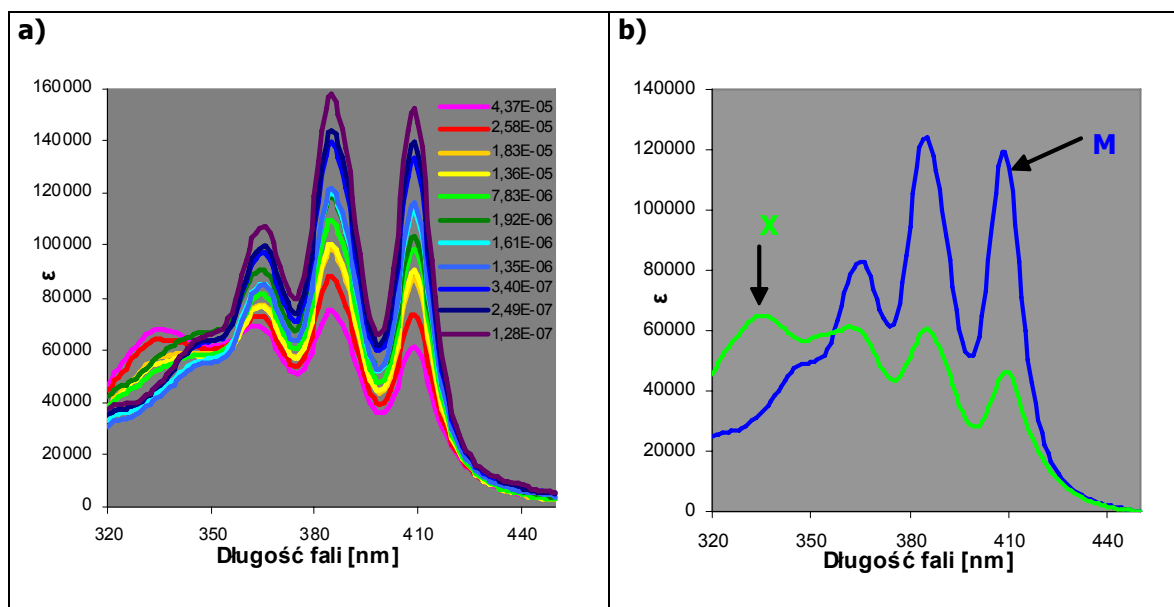
5.6.2. Agregacja pochodnych AmB

Metody numerycznej analizy widm wypracowane na przykładzie AmB zostały następnie zastosowane do analizy agregacji pochodnych tego antybiotyku. Ponieważ modyfikacje chemiczne dotyczą wyłącznie polarnej „głowy” cząsteczki antybiotyku i nie powinny mieć wpływu na geometrię i rozkład gęstości elektronowej w obrębie chromoforu polienowego przyjęto założenie, że widma poszczególnych form spektralnych powinny być również bardzo podobne, jeżeli nie identyczne.

5.6.2.1. AMA

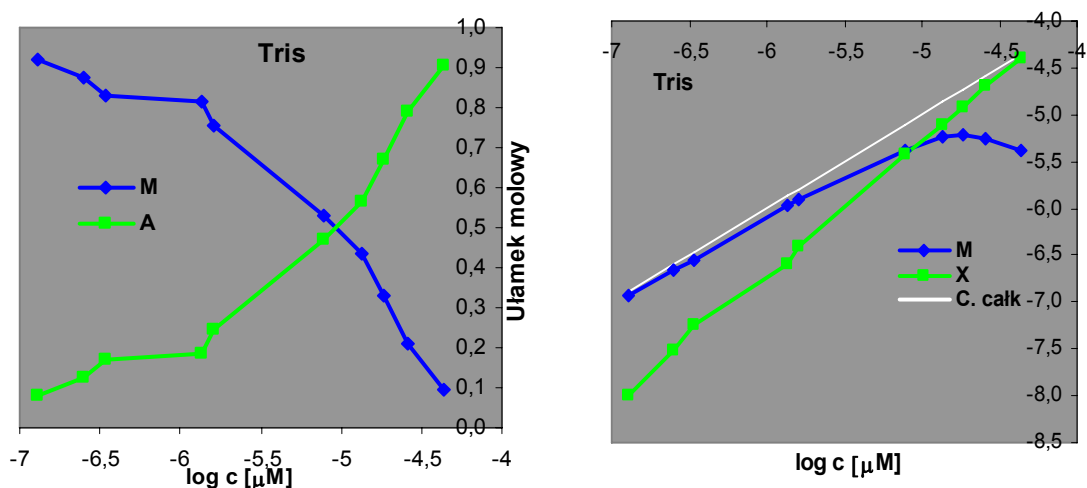
W widmach UV-VIS pochodnej AMA, we wszystkich badanych środowiskach wodnych, obserwuje się podobną jak dla AmB zmianę kształtu widm, chociaż znacznie mniej nasiloną (Rys. 62). Dla niskich stężeń obserwuje się typową dla formy monomerycznej strukturę oscylacyjną, chociaż proporcje intensywności pasm przy 409 i 385 nm są zaburzone. Przy stężeniach powyżej 10 μM pojawia się maksimum

krótkofalowe przy 333 nm, nie występuje jednak pasmo długofalowe przy 420 nm. Na Rys. 62a przedstawiono jako przykład zestaw widm AMA zarejestrowanych w buforze Tris.



Rys. 62. a) zestaw widm dla roztworów AMA w buforze Tris; b) widma form spektralnych obecnych w analizowanych roztworach.

Numeryczna analiza zestawów widm ujawniła, że w przypadku AMA występują w roztworach tylko 2 formy spektralne: monomer oraz agregat pośredni typu X (Rys. 62b).



Rys. 63. Zależność ułamków molowych oraz logarytmów stężeń poszczególnych form spektralnych AMA w buforze Tris w funkcji logarytmu stężenia ogólnego antybiotyku.

Na Rys. 63 przedstawiono przykładowe wyniki otrzymane w oparciu o metodę numerycznej dekompozycji widm w postaci oszacowania udziału poszczególnych form

spektralnych AMA w badanych środowiskach wodnych w postaci zależności ułamków molowych i logarytmów stężeń monomeru (M) i agregatu X w funkcji logarytmu stężenia ogólnego antybiotyku.

W Tabeli 20 zestawiono oszacowania wartości maksymalnego stężenia monomeru (MMC) oraz ogólnego stężenia AMA, przy którym forma monomeryczna i agregat X stanowią 50% udziału (odpowiednio $[M]_{1/2}$ oraz $[X]_{1/2}$).

Tabela 20. Zestawienie wartości maksymalnego stężenia monomeru oraz wartości stężeń AMA odpowiadających 50% zawartości monomeru i agregatu X w środowiskach wodnych o różnym składzie.

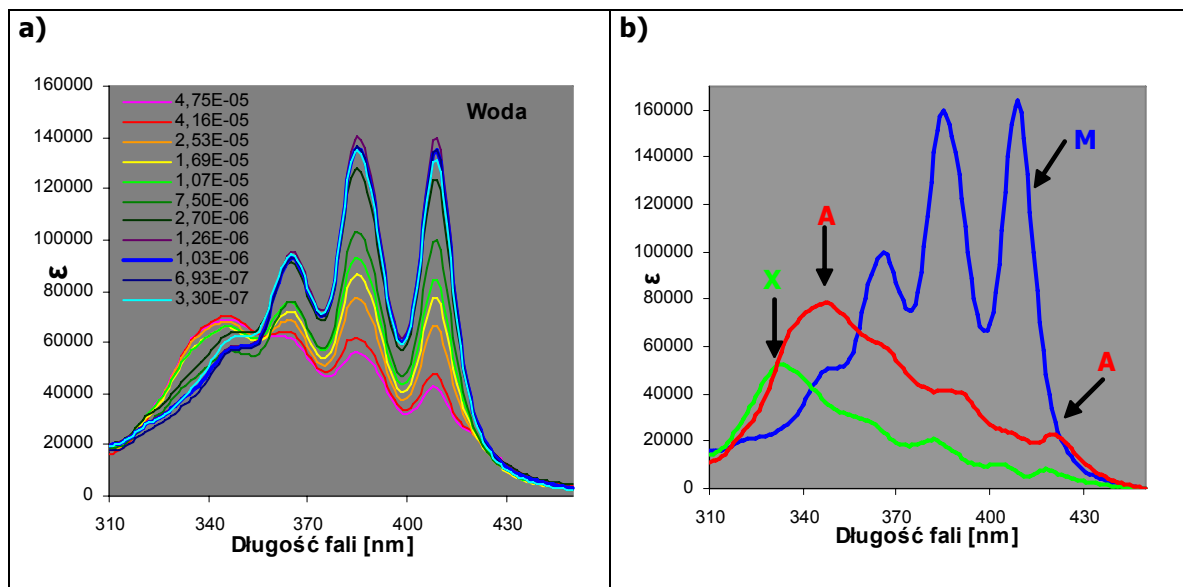
	Woda	NaCl	PBS	Tris
MMC*10⁶ [M]	14,6	5,74	3,91	5,35
$[M]_{1/2}$	25,0	5,75	2,75	8,91
$[X]_{1/2}$	25,0	5,75	3,98	8,91

Porównując przedstawione wyniki z analogicznymi wynikami uzyskanymi dla AmB widać wyraźną różnicę. Uwagę zwraca przede wszystkim wysokie stężenie formy monomerycznej AMA, zwłaszcza mocno zaznaczone w przypadku środowiska wodnego. MMC dla AMA w wodzie jest ponad 20-krotnie wyższe aniżeli odpowiednia wartość notowana dla antybiotyku wyjściowego. W przypadku soli oraz buforu Tris omawiana różnica jest około 7-krotna, natomiast w buforze PBS 3-krotna. Wartym zaznaczenia jest również fakt, iż 50% zawartości monomeru dla AMA osiąga się dla zdecydowanie wyższych stężeń antybiotyku. W środowisku wodnym wartość parametru $[M]_{1/2}$ jest aż 30-krotnie wyższa. Dla pozostałych środowisk notowane różnice względem AmB są około 10-krotne. Ponadto, niezwykle istotny jest również wysoki udział form monomerycznych AMA dla stężeń ogólnych antybiotyku ok. 1 μ M, czyli w zakresie aktywności biologicznej antybiotyku. Szczególnie wysoką wartość tego parametru stwierdza się dla AMA w środowisku wodnym- blisko 95,5%. Dla pozostałych środowisk wartość ta wynosi odpowiednio: bufor Tris – 81,4%; NaCl – 70,1%; bufor PBS – 67,8%.

5.6.2.2. AMPA

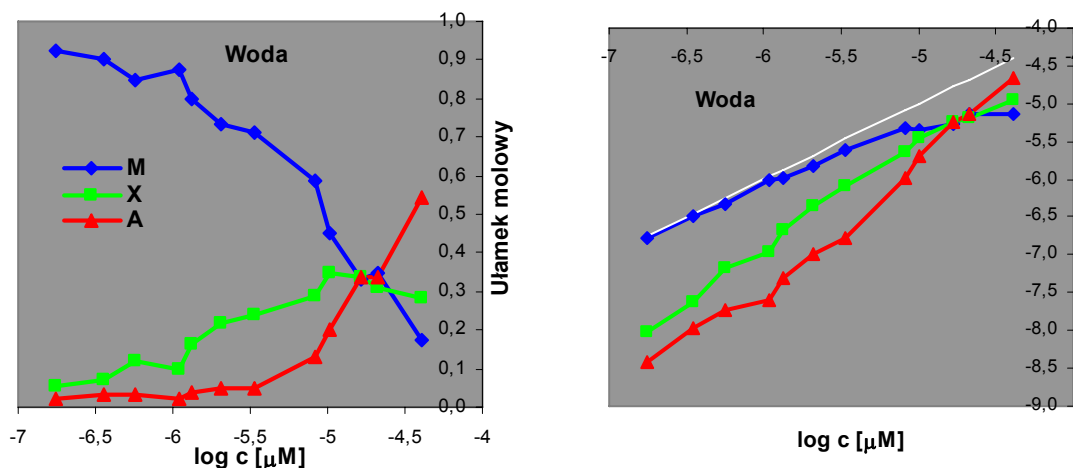
Widma AMPA podobnie jak AMA we wszystkich badanych środowiskach wodnych wykazują zbliżone do AmB położenie maksimów charakterystycznych dla formy monomerycznej. W przypadku form zagregowanych w odróżnieniu od AMA

można zaobserwować pasmo przy długości fali 420 nm, chociaż jest ono mniej wyraźnie zaznaczone aniżeli dla AmB. Poza tym maksimum najintensywniejszego pasma w obszarze krótkofalowym dla AMPA jest przesunięte i odpowiada długości fali 345 nm. Na Rys. 64 przedstawiono jako przykład zestaw widm AMPA w wodzie.



Rys. 64. a) zestaw widm dla roztworów AMPA w wodzie; b) widma form spektralnych obecnych w analizowanych roztworach.

Na Rys. 65 przedstawiono uzyskane wartości ułamków molowych oraz zmiany stężeń poszczególnych form spektralnych w funkcji ogólnego stężenia AMPA w wodzie. Również w tym przypadku obserwujemy występowanie maksymalnego stężenia monomeru, MMC. Wartości MMC wyznaczone dla AMPA (Tabela 21) są zasadniczo zbliżone do analogicznych wartości w tych samych środowiskach dla AMA i około 10-krotnie wyższe w porównaniu z AmB. Ponadto w przypadku AMPA, podobnie jak dla AMA, znaczący jest udział formy monomerycznej dla stężenia ogólnego antybiotyku ok. 1 μM , sięgający blisko 70%. Pojawia się również zapowiedź wystąpienia MXC, aczkolwiek wartość maksymalna nie została osiągnięta nawet przy ogólnym stężeniu antybiotyku równym 50 μM .



Rys. 65. Zależność ułamków molowych oraz logarytmów stężeń poszczególnych form spektralnych AMPA w wodzie w funkcji logarytmu stężenia ogólnego antybiotyku.

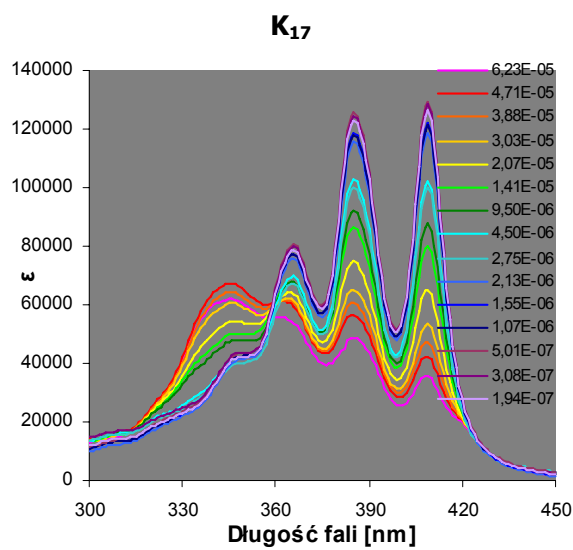
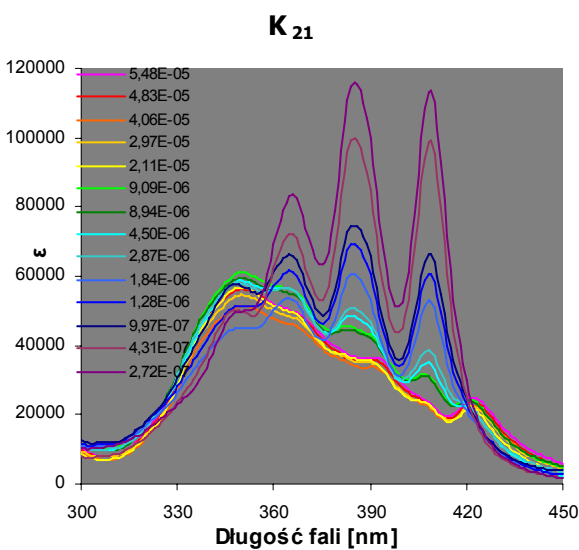
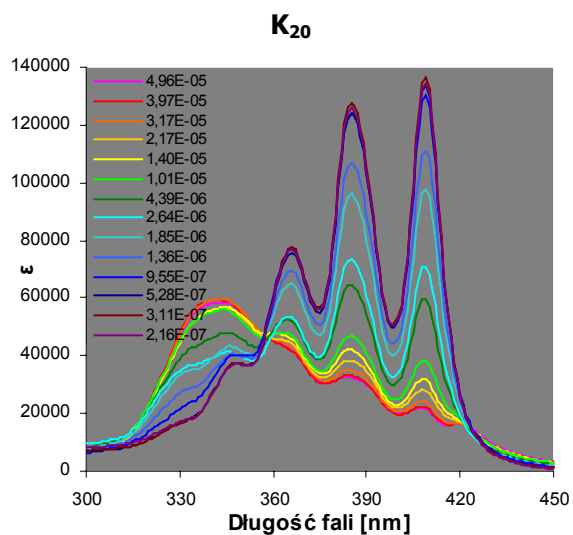
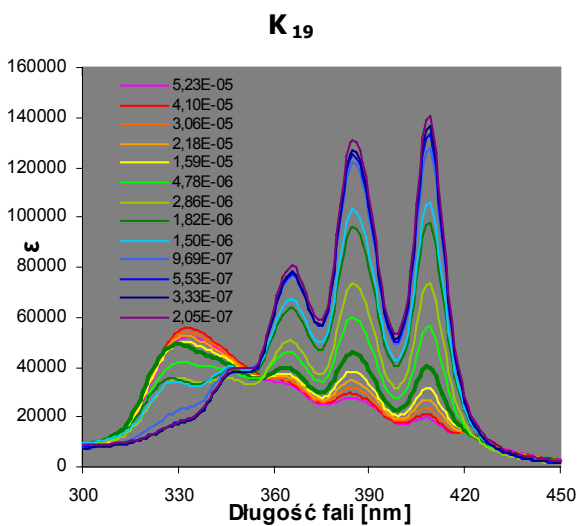
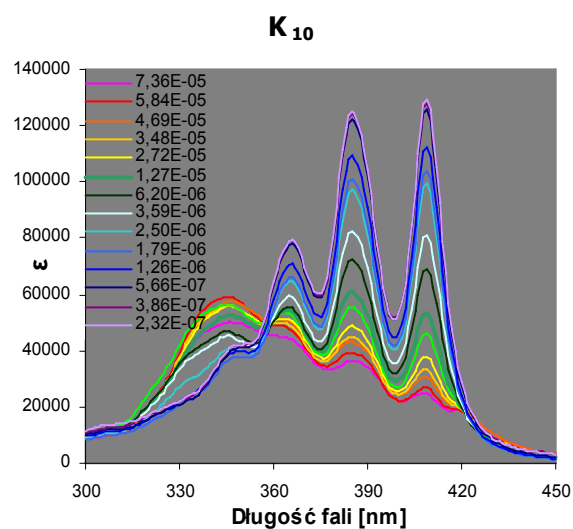
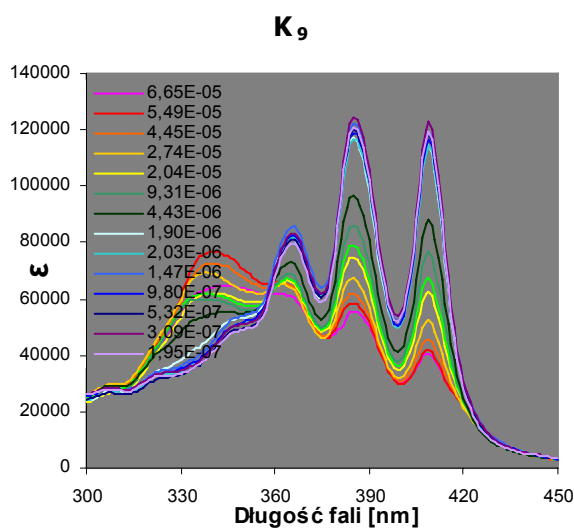
Cechą charakterystyczną roztworów AMPA jest niska zawartość w nich agregatów typu A. 50-procentowy udział tej formy obserwuje się dopiero przy ogólnym stężeniu rzędu 30 μM lub wyższym (Tabela 21).

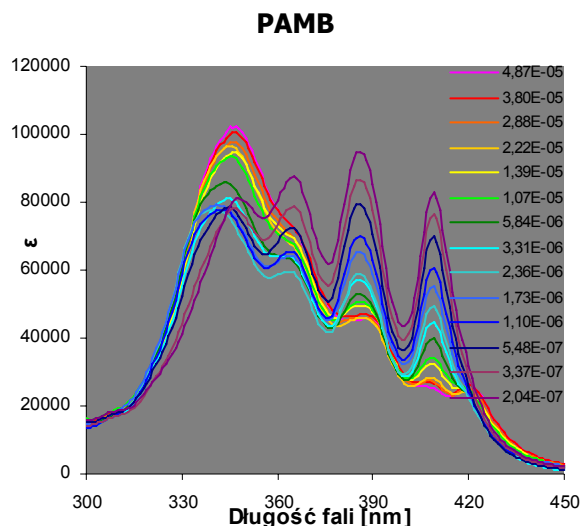
Tabela 21. Zestawienie wartości maksymalnego stężenia monomeru oraz wartości stężeń AMPA odpowiadających 50% zawartości monomeru i agregatu wielkocząsteczkowego w środowiskach wodnych o różnym składzie.

	Woda	NaCl	PBS	Tris
$\text{MMC} \cdot 10^6 [\text{M}]$	7,32	4,54	3,76	9,64
$[\text{M}]_{1/2}$	8,91	6,31	2,24	7,94
$[\text{A}]_{1/2}$	35,5	28,2	35,5	> 50

5.6.2.3. Pochodne serii K

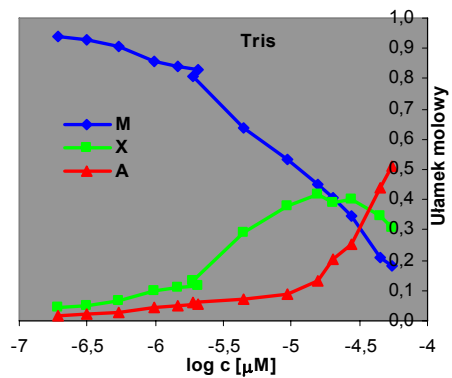
Na Rys. 66 przedstawiono przykładowe zestawy widm roztworów pochodnych serii K w buforze Tris. Zestawy widm dla pochodnych K_9 , K_{10} , K_{19} , K_{20} , K_{21} wykazują pewne podobieństwo. Dla niskich stężeń obserwuje zbliżone do AmB położenie maksimów charakterystycznych dla formy monomerycznej, chociaż w przypadku K_{21} oraz K_9 proporcje intensywności pasm przy 409 i 385 nm są nieco zaburzone. Maksimum długofalowe dla 420 nm typowe dla formy zagregowanej jest dla wszystkich 5 związków przesunięte i odpowiada długości fali 421 nm, przy czym dla K_9 jest ono zaznaczone w niewielkim stopniu i to dopiero dla stężeń powyżej 30 μM . Z kolei maksimum najintensywniejszego pasma w obszarze krótkofalowym dla K_{10} , K_{20} , K_{21} odpowiada długości fal odpowiednio 345, 341 nm i 349 nm, podczas gdy dla K_9 jest przesunięte do 333-335 nm, a dla K_{19} nawet do ok. 325 nm.



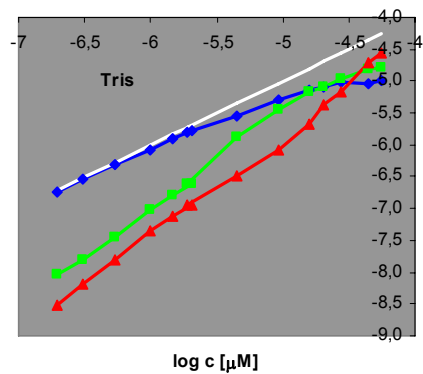


Rys. 66. Przykładowe zestawy widm pochodnych serii K w buforze Tris.

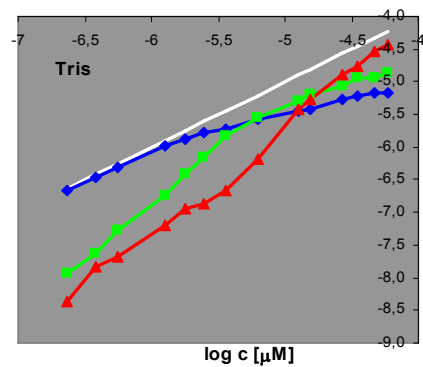
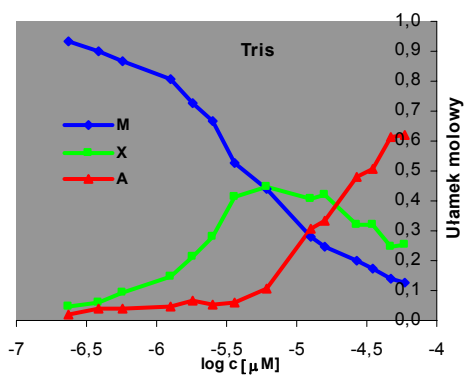
Od powyższej charakterystyki odbiegają wyniki uzyskane dla K₁₇ oraz PAMB. W przypadku K₁₇ dominującą formę w szerokim zakresie badanych stężeń antybiotyku stanowi monomer. Zarówno typowa dla formy monomerycznej struktura oscylacyjna jak i proporcje intensywności pasm przy 409 i 385 nm zostają zachowane. Obecność agregatu wielkocząsteczkowego można stwierdzić dopiero dla stężeń powyżej 20 μM . Maksimum krótkofalowe odpowiada długości fali 344 nm, przy czym pasmo długofalowe przy 420 nm jest jedynie lekko zaznaczone. Zupełnie odmienny układ obserwuje się w przypadku PAMB. Dla tego związku nawet dla najniższego stężenia – 0,2 μM trudno mówić o typowym widmie formy monomerycznej. Nawet przy niskich stężeniach tej pochodnej proporcje pików 409/385 są wyraźnie zaburzone. Ponadto wartości ekstynkcji molowej w obszarze długofalowym widma są nadspodziewanie niskie. Praktycznie w całym zakresie badanych stężeń (0,2- 50 μM) związek występuje w jakiejś formie zagregowanej. Maksimum długofalowe dla 421 nm jest bardzo wyraźnie zaznaczone począwszy od stężenia około 3 μM , natomiast krótkofalowe odpowiada długości fali 344 nm.



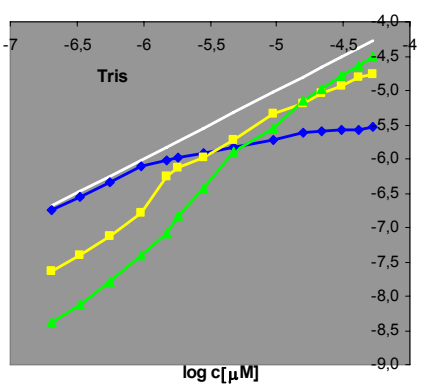
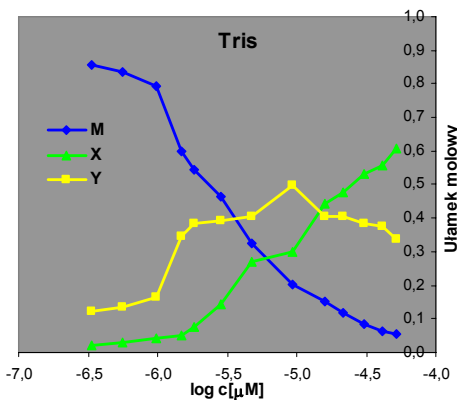
K_9



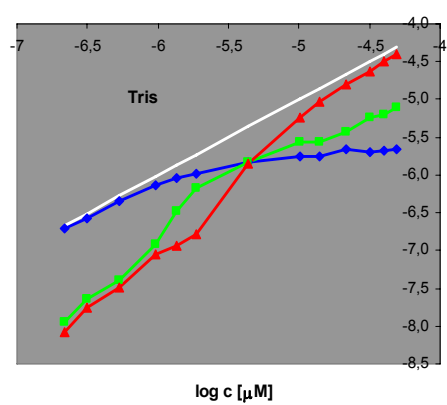
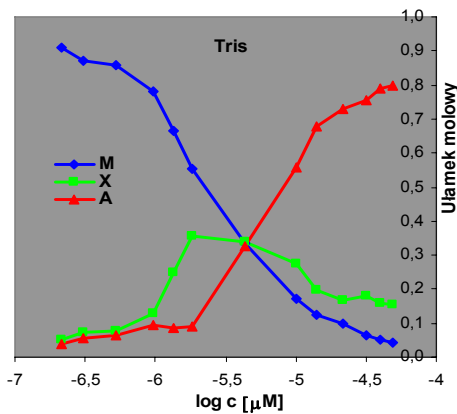
K_{10}

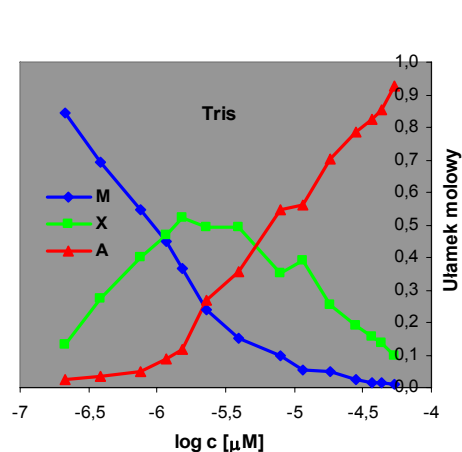


K_{19}

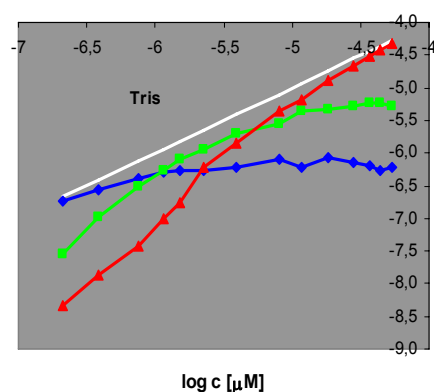


K_{20}

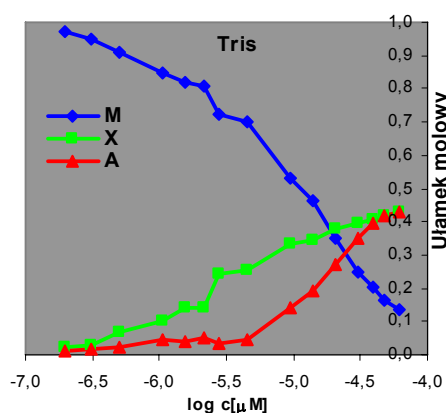




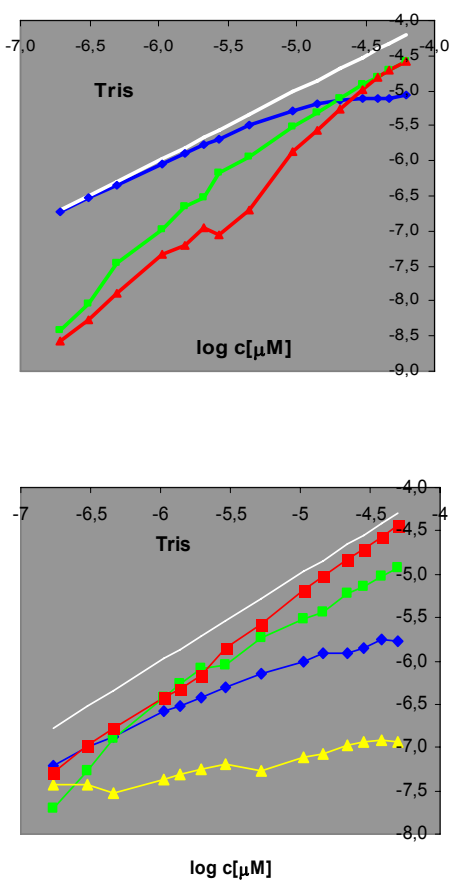
K₂₁



K₁₇



PAMB



Rys. 67. Zmiany składu roztworów pochodnych serii K w buforze Tris w funkcji ogólnego stężenia antybiotyku.

Do analizy uzyskanych zestawów widm metodą numerycznej dekompozycji wykorzystano uśrednione widma form spektralnych uzyskane dla AmB, AMA i AMPA. We wszystkich przypadkach okazały się one bardzo dobrym przybliżeniem widm rzeczywistych.

Zastosowanie numerycznej dekompozycji widm pozwoliło, dla każdej z pochodnych, określić zawartość poszczególnych form spektralnych w analizowanych roztworach wodnych, Rys. 67.

Jak wynika z powyższego zestawienia, poszczególne związki różnią się liczbą oraz typem form spektralnych. W przypadku pochodnych K₉, K₁₀, K₁₇, K₂₀ oraz K₂₁ stwierdzono obecność 3 form spektralnych: monomeru, agregatu pośredniego X i agregatu wielkocząsteczkowego A. Najmniejszy udział form zagregowanych obserwuje się dla pochodnych K₉ oraz K₁₇. Związki te występują właściwie w formie monomerycznej w zakresie stężeń ogólnych antybiotyku od 0,1 µM do ok. 20 µM. W przypadku K₁₉ z kolei nie stwierdza się obecności agregatu typu A. Pojawiają się natomiast dwa typy agregatów pośrednich: X i Y. Występowanie 4 form spektralnych obserwuje się jedynie dla PAMB. W przypadku tego związku uwagę zwraca dominujący udział formy agregatu wielkocząsteczkowego A, przy zdecydowanie ograniczonej zawartości formy monomerycznej oraz obecności agregatów pośrednich X i Y. Przy czym, warto dodać, że forma Y pojawia się jedynie w zakresie najniższych stężeń antybiotyku, podczas gdy zawartość formy X zaznacza się wyraźnie na poziomie około 30% praktycznie w całym badanym zakresie stężeń PAMB.

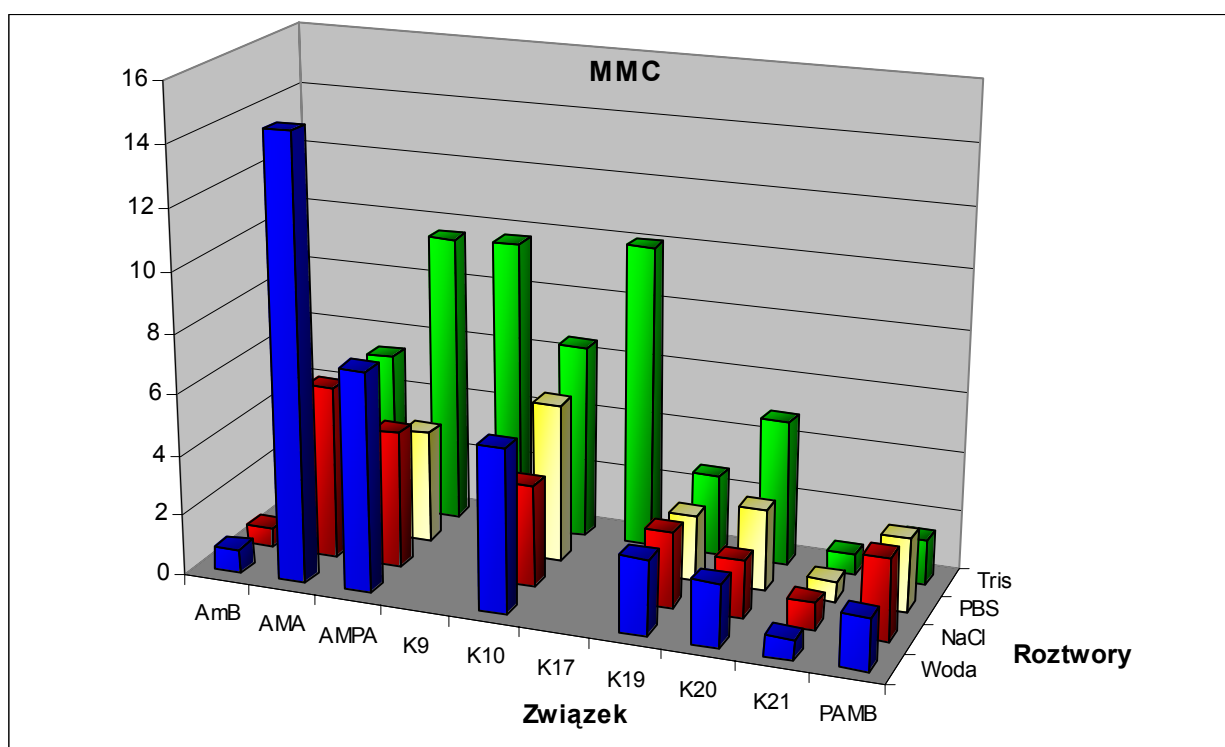
Ponadto należy zwrócić uwagę, że w przypadku wszystkich badanych związków serii K stężenie formy monomerycznej dąży do nasycenia, podczas gdy stężenie agregatów zwłaszcza wielkocząsteczkowych (forma A) wzrasta nieograniczenie.

W Tabelach 22, 23 i 24 zestawiono uzyskane wartości MMC, M_{1/2} i A_{1/2} dla pochodnych serii K w analizowanych roztworach wodnych. Dla porównania zamieszczono również wartości dla AmB i pochodnych AMA i AMPA.

Tabela 22. Zestawienie wartości MMC [µM] AmB i jej pochodnych w różnych roztworach wodnych.

Pochodne	Roztwory			
	Woda	NaCl	PBS	Tris
AmB	0,79	0,64	1,08	0,85
AMA	14,62	5,74	3,91	5,35
AMPA	7,32	4,54	3,76	9,64
K ₉	nb	nb	nb	9,72
K ₁₀	5,46	3,41	5,28	6,50
K ₁₇	nb	nb	nb	10,07
K ₁₉	2,52	2,49	2,18	2,68
K ₂₀	2,10	1,93	2,70	4,82
K ₂₁	0,66	0,90	0,68	0,66
PAMB	1,73	2,70	2,46	1,50

nb – nie badano



Rys. 68. Zestawienie wartości MMC dla AmB i jej pochodnych w roztworach wodnych o różnym składzie.

Najwyższą wartość MMC wśród zestawu badanych związków serii K obserwuje się dla K₁₇ w buforze Tris. Wartość ta jest porównywalna z analogicznymi wynikami uzyskanymi dla AMPA i ponad 10-krotnie wyższa aniżeli dla AmB. Bardzo podobną wartość MMC stwierdzono również dla pochodnej K₉. Wysoką wartość MMC, zbliżoną do MMC wyznaczonego dla AMA, wykazuje w tym samym środowisku K₂₀. W przypadku pozostałych badanych środowisk wartości MMC dla K₂₀ są do siebie zbliżone i w porównaniu z antybiotykiem wyjściowym około 2,5-krotnie wyższe. Zbliżone wartości MMC wykazują również pochodne K₁₉ i PAMB, jednak w odróżnieniu od K₂₀ wartość MMC w buforze Tris nie odbiega od pozostałych środowisk. Zupełnie odmiennie w stosunku do pozostałych związków serii K zachowują się wartości MMC dla K₂₁. W przypadku tej pochodnej MMC przyjmuje wartości zbliżone bądź nawet niższe od tych notowanych dla AmB (Rys. 68; Tabela 22).

Tabela 23. Zestawienie wartości $M_{1/2}$ [μM] AmB i jej pochodnych w różnych roztworach wodnych.

Roztwory				
Pochodne	Woda	NaCl	PBS	Tris
AmB	0,83	0,89	0,66	0,76
AMA	25,0	5,75	2,75	8,91
AMPA	8,91	6,31	2,24	7,94
K ₉	nb	nb	nb	10,70
K ₁₀	2,82	4,80	6,31	4,47
K ₁₇	nb	nb	nb	15,85
K ₁₉	2,51	3,98	2,51	2,4
K ₂₀	2,24	2,82	1,91	2,24
K ₂₁	0,80	0,35	0,63	1,0
PAMB	<0,13	0,28	0,15	<0,20

nb – nie badano

Podobne do omówionych wyżej wnioski można wysnuć na podstawie analizy wartości parametru $[M]_{1/2}$, czyli stężenia antybiotyku odpowiadającemu 50% zawartości monomeru (Tabela 23). Najwyższe wartości tego parametru obserwuje się dla pochodnych K₁₇ i K₉, zdecydowanie niższe dla K₁₀, szczególnie w wodzie. Dla pochodnych K₁₉ i K₂₀ wartości tego parametru są w zasadzie zbliżone do siebie niezależnie od badanego środowiska i około 2,5-krotnie wyższe w porównaniu z analogicznymi wynikami dla antybiotyku wyjściowego. W przypadku K₂₁ natomiast $[M]_{1/2}$ przyjmuje wartości zbliżone bądź niższe aniżeli dla AmB. Wyjątek wśród badanych związków stanowi pochodna PAMB z najniższymi wartościami omawianego parametru. Wartości te są kilkakrotnie niższe od tych uzyskanych dla AmB.

Tabela 24. Zestawienie wartości $A_{1/2}$ [μM] AmB i jej pochodnych w różnych roztworach wodnych.

Roztwory				
Pochodne	Woda	NaCl	PBS	Tris
AmB	6,31	14,45	8,91	7,94
AMA	*	*	*	*
AMPA	35,5	28,2	35,5	> 50
K ₉	-	-	-	55,0
K ₁₀	>70	15,8	23,4	35,5
K ₁₇	nb	nb	nb	>60
K ₁₉	*	*	*	*
K ₂₀	13,2	>56	19,1	8,32
K ₂₁	3,55	4,17	7,94	6,31
PAMB	10,3	>35,5	28,2	4,8

nb – nie badano

* - forma spektralna nie występuje

Porównanie $[A]_{1/2}$, czyli stężenia antybiotyku odpowiadające 50% zawartości agregatu nierozpuszczalnego (Tabela 24) również zwraca uwagę na pochodne K_9 i K_{17} z wartością tego parametru około 8-krotnie wyższą od tej wyznaczonej dla AmB. Najniższe wartości $[A]_{1/2}$, podobnie jak w przypadku omawianych wyżej parametrów wykazuje K_{21} .

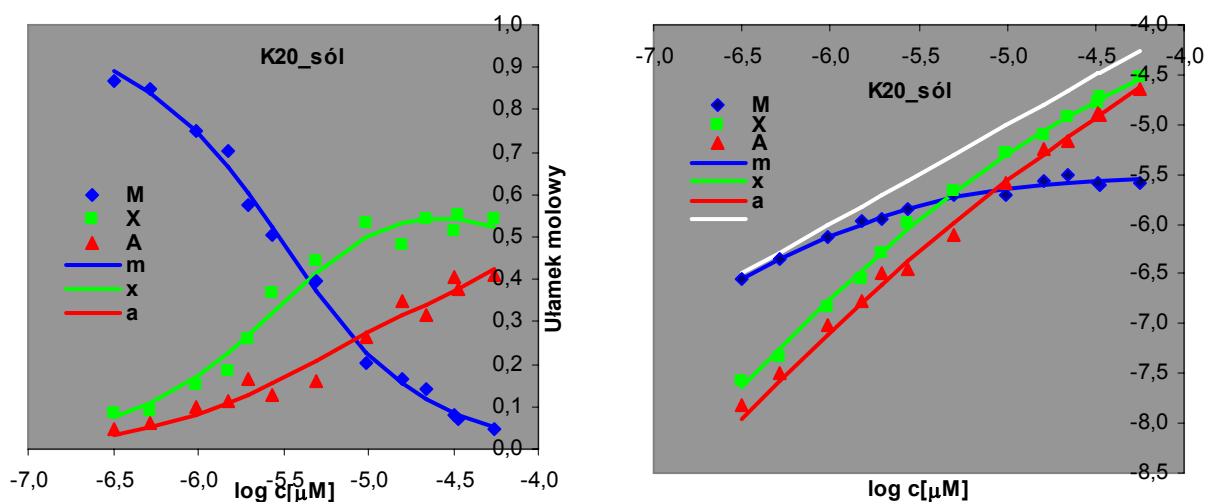
5.6.3. Wpływ modyfikacji chemicznych i składu roztworu wodnego na stałe agregacji

Uzyskane metodą numerycznej dekompozycji widm stężenia poszczególnych form spektralnych pozwalają na zaproponowanie modelu agregacji AmB i jej pochodnych oraz wyznaczenie stałych tego modelu.

Występowanie maksymalnego stężenia monomeru oraz w kilku przypadkach również maksymalnego stężenia agregatów pośrednich dostarcza silnej przesłanki, że agregacja ta ma charakter wieloetapowej agregacji nieograniczonej, p. 4.5.2.4. Jak wykazano [38], w modelu takiej agregacji należy wyodrębnić etap tworzenia dimeru związany ze zmianą właściwości spektralnych i opisywany stałą dimeryzacji K_D oraz wieloetapowy, nieograniczony proces agregacji dimerów opisany stałą agregacji K_A .

Ponieważ wykazano powyżej (p. 5.6.2), że we wszystkich badanych przypadkach agregacji AmB i jej pochodnych w roztworach wodnych dochodzi do tworzenia więcej niż jednego typu agregatu, więc model opisujący zjawisko agregacji musi przyjąć postać opisaną równaniem (2) p. 4.5.2.4. Dla n rodzajów agregatów model taki zawiera $2n$ parametrów: n stałych dimeryzacji K_{Di} oraz n stałych agregacji K_{Ai} . Określenie wartości tych parametrów zapewniających najlepsze dopasowanie modelu do konkretnego zestawu danych doświadczalnych nie jest możliwe metodami regresyjnymi i wymaga zastosowania wielowymiarowej optymalizacji numerycznej. W niniejszej pracy zastosowano w tym celu metodę Simplex w wersji Nelder-Meada.

Przykład dopasowania proponowanego modelu do danych doświadczalnych uzyskanych dla K_{20} w soli fizjologicznej przedstawia Rys. 69.



Rys. 69. Dopasowanie modelu do danych doświadczalnych przedstawione na przykładzie zależności ułamków molowych oraz logarytmów stężeń poszczególnych form spektralnych dla pochodnej K₂₀ w soli fizjologicznej w funkcji logarytmu stężenia ogólnego antybiotyku.

Uzyskane wartości parametrów modelu agregacji dla AmB i jej pochodnych w badanych roztworach wodnych przedstawia Tabela 25. W zastawieniu tym nie ujęto PAMB, z uwagi na brak możliwości dopasowania modelu do danych eksperymentalnych uzyskanych dla tej pochodnej.

Tabela 25. Zestawienie wartości stałych dimeryzacji (K_d) oraz stałych agregacji (K_a) dla AmB i badanych pochodnych.

Związek	Agreg.	Woda		Sól		PBS		Tris	
		K _D	K _A	K _D	K _A	K _D	K _A	K _D	K _A
AmB	X	5,56	6,73	5,35	6,92	5,63	6,05	5,60	6,24
	Y	-	-	5,36	6,85	5,79	5,85	5,60	6,18
	A	4,53	7,89	5,00	7,34	5,12	6,89	4,79	7,32
AMA	X	4,51	4,45	5,31	4,88	5,48	4,72	5,07	4,77
AMPA	X	5,01	3,33	5,02	4,47	5,52	3,80	5,56	6,73
	A	4,58	5,32	4,82	5,31	5,01	5,53	4,53	7,89
K ₉	X	nb	nb	nb	nb	nb	nb	4,73	4,74
	A	nb	nb	nb	nb	nb	nb	5,85	4,06
K ₁₀	X	5,32	4,92	4,78	5,86	4,77	5,54	5,08	5,04
	A	4,82	5,58	4,48	6,36	4,02	6,57	4,47	6,05
K ₁₇	X	nb	nb	nb	nb	nb	nb	4,73	4,89
	A	nb	nb	nb	nb	nb	nb	4,34	5,53
K ₁₉	X	5,27	5,89	4,90	6,24	5,06	6,19	5,28	5,82
	Y	4,61	6,66	3,91	7,37	4,13	7,26	4,82	6,4
K ₂₀	X	5,31	5,77	5,15	5,81	5,19	6,15	5,12	6,17
	A	5,10	6,06	4,82	6,18	4,87	6,55	4,72	6,75
K ₂₁	X	5,55	6,45	6,17	6,22	5,74	6,67	5,90	6,04
	A	5,36	6,75	5,24	7,35	5,17	7,32	5,22	6,93

nb – nie badano

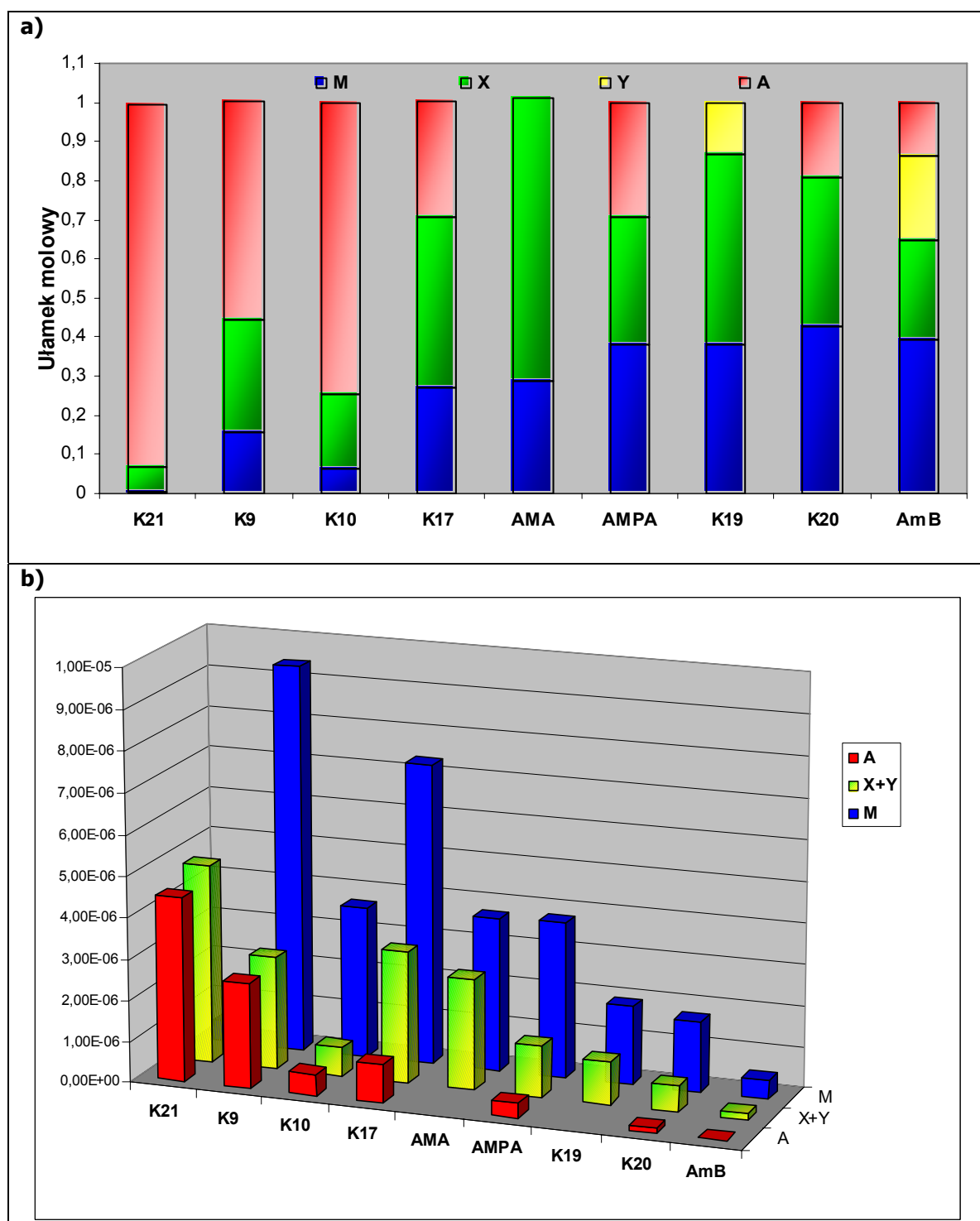
Warto zwrócić uwagę na charakterystyczne relacje występujące pomiędzy wartościami stałych dimeryzacji i stałych agregacji w poszczególnych typach agregatów. Za wyjątkiem AMA oraz K₉, agregat, którego udział wzrasta nieograniczenie wraz ze wzrostem stężenia roztworu (A dla AmB, AMPA, K₉, K₁₀, K₁₇, K₂₀ i K₂₁; X dla AMA; Y dla K₁₉) charakteryzuje się dużo większą stałą agregacji w porównaniu do stałej dimeryzacji. W przypadku agregatów „pośrednich” relacja ta nie jest tak wyraźna, a dla AMPA jest ona nawet odwrotna.

5.6.4. Wpływ stanu roztworu na właściwości biologiczne (permeabilizacyjne)

W oparciu o parametry i równanie zaproponowanego modelu agregacji dla wszystkich badanych związków wyznaczono skład roztworu w soli fizjologicznej dla stężenia antybiotyku odpowiadającego wartości EK₅₀, czyli stężenia indukującego 50% wypływu potasu z krwinek czerwonych. Wyjątek stanowi pochodna K₁₇, dla której obliczenia wykonano dla buforu Tris, z uwagi na dysponowanie danymi dotyczącymi agregacji jedynie w tym środowisku. Wyniki przedstawiono na Rys. 70, odpowiednio w postaci ułamków molowych (Rys. 70 a) oraz stężeń poszczególnych form spektralnych (Rys. 70 b).

W przypadku K₂₁, K₉, oraz K₁₀, pochodnych o najniższej aktywności permeabilizacyjnej względem erytrocytów (EK₅₀ odpowiednio 81; 61; 57 μ M), obserwuje się dominujący udział formy zagregowanej typu A (Rys. 70 a). W oparciu o metodę sedymentacyjną stwierdzono, że dla antybiotyku wyjściowego forma ta stanowi główny składnik agregatu nierozpuszczalnego.

Na podstawie wyników badań nad AmB wysunięto hipotezę, że za aktywność permeabilizacyjną w stosunku do zawierających cholesterol komórek ssaków odpowiedzialna jest tylko ta część antybiotyku, która występuje w formie małocząsteczkowych agregatów. Odpowiada to formom spektralnym X i Y. Rys. 70 b przedstawia stężenia poszczególnych form przy stężeniu antybiotyku odpowiadającemu EK₅₀. Widać wyraźnie, że standardowy efekt biologiczny nie jest związany z określonym stężeniem żadnej konkretnej formy antybiotyku.



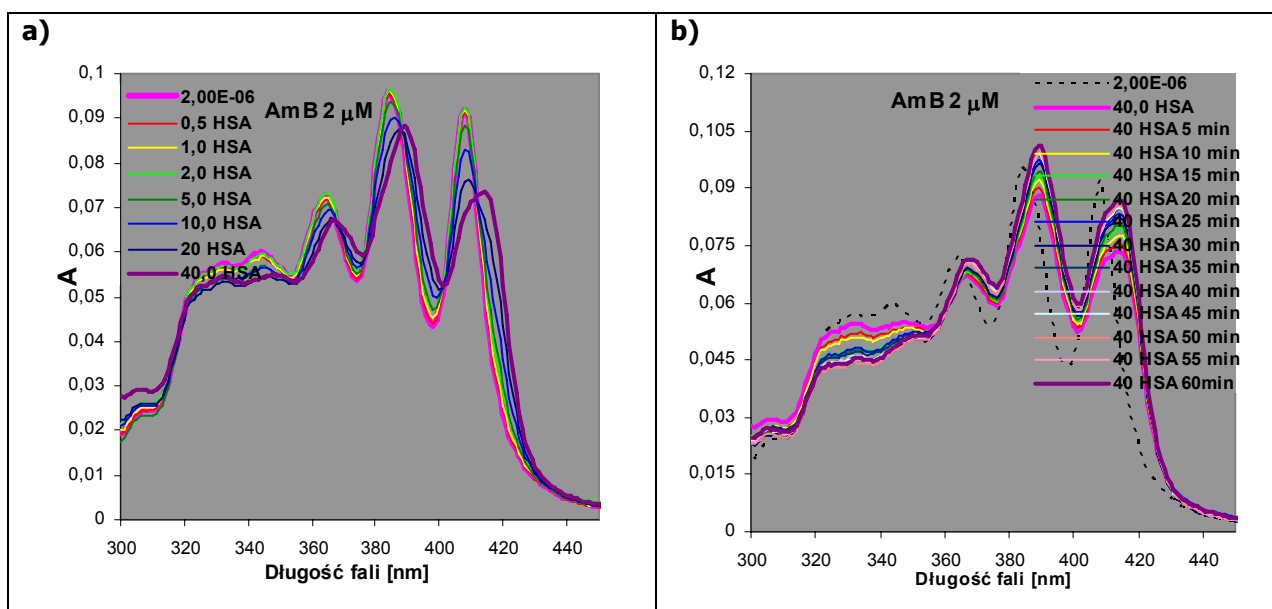
Rys. 70. a) ułamek molowy; **b)** stężenie poszczególnych form spektralnych w soli fizjologicznej wyznaczone dla stężenia antybiotyku indukującego 50% wpływu potasu z krwinek czerwonych (EK_{50}). Związki zostały uszeregowane w kierunku wzrastającej aktywności permeabilizacyjnej.

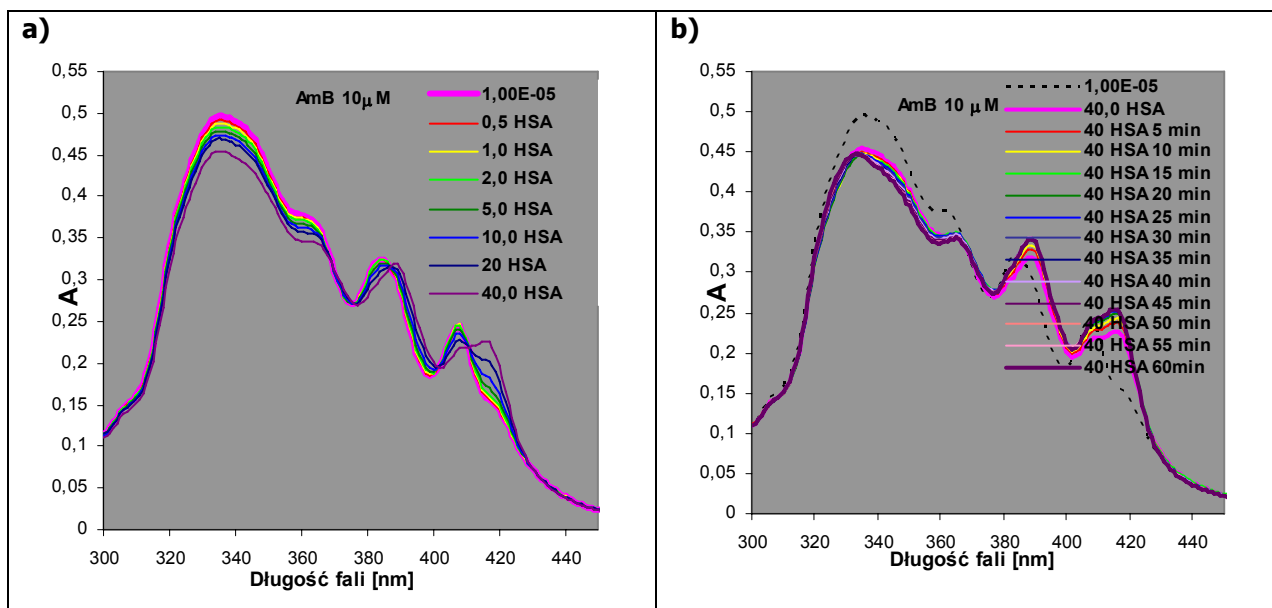
5.6.5. Wpływ surowicy krwi na stopień agregacji badanych związków

Poprawna ocena wpływu stanu pochodnych AmB na jej aktywność biologiczną *in vivo* wymaga dodatkowo uwzględnienia wpływu na to zjawisko wielkocząsteczkowych składników osocza krwi. Określenie wpływu białek i lipoprotein surowicy na stopień agregacji AmB stworzyłoby możliwość zrozumienia i wyjaśnienia mechanizmu, według którego interakcje ze składnikami krwi wpływają na toksyczność tego cennego antybiotyku, a tym samym zwiększyłyby szanse na opracowanie optymalnie efektywnej formy leku.

5.6.5.1. Albumina

Najpierw podjęto próbę określenia efektu związania antybiotyku z albuminą surowicy ludzkiej (HSA) na jego stan agregacji. Oznaczenia wykonano dla AmB jako związku referencyjnego oraz dwóch wybranych pochodnych: AMA i PAMB. Kinetykę oraz stan równowagi wiązania antybiotyku z białkiem śledzono w oparciu o spektroskopię UV-VIS. Wszystkie pomiary prowadzono w buforze PBS (pH = 7,4). Na Rys. 71 a, 72 a i 73 a przedstawiono widma absorpcyjne zarejestrowane dla badanych związków, użytych w stężeniach 2 i 10 μM , w obecności wzrastającego stężenia HSA (0,5 - 40 μM). Obok dla najwyższego stężenia albuminy (40 μM) przedstawiono przebieg zmian absorpcji w czasie (Rys. 71 b, 72 b i 73 b).





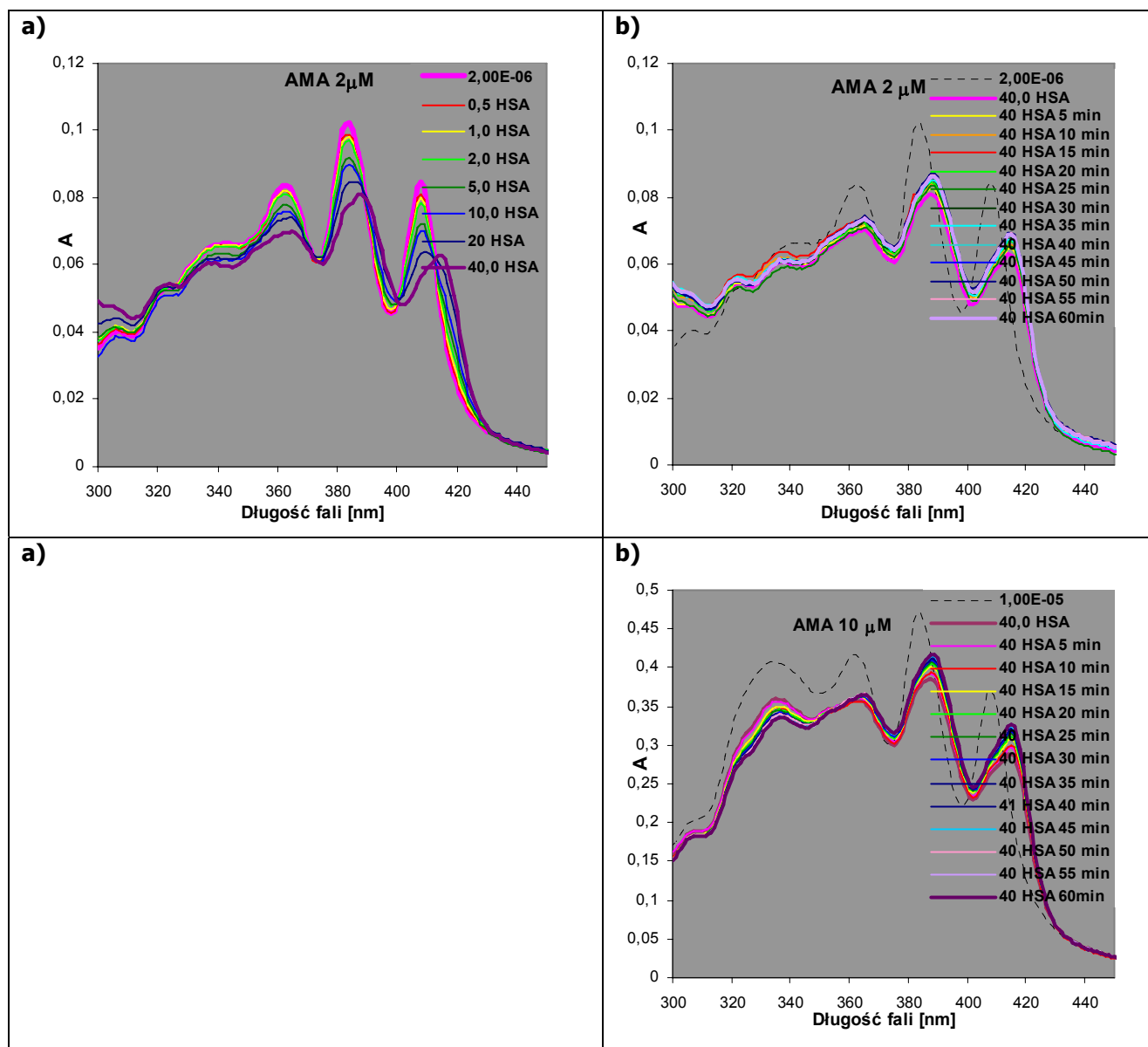
Rys. 71. Widma absorpcyjne AmB o stężeniu odpowiednio 2 i 10 μM w buforze PBS w obecności HSA. Stężenie białka 0,5 – 40 μM.

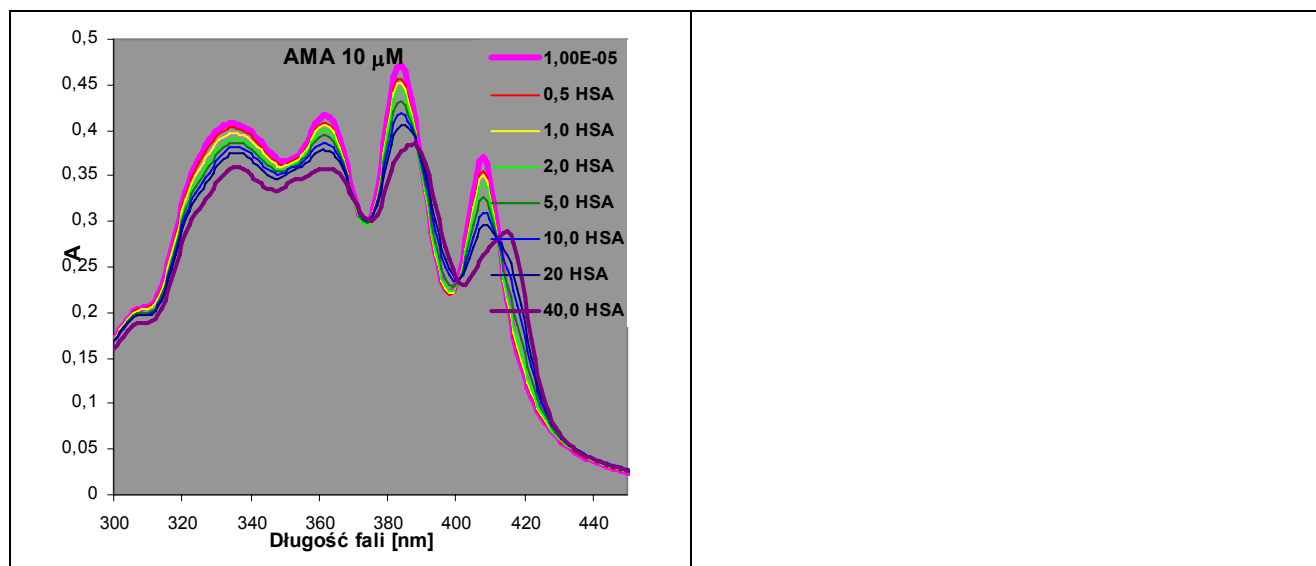
W widmie AmB w buforze PBS w obszarze 450 - 300 nm można wyróżnić 4 wyraźne pasma absorpcji przy długości fali 408, 384, 362, 335 nm oraz lekko zaznaczone pasmo przy 420 nm, przypisywane silnie zagregowanej formie antybiotyku [38,42,100,102-105]. W obecności HSA dochodzi do stopniowej zmiany widma antybiotyku. W miarę rosnącego stężenia albuminy obserwuje się obniżenie intensywności maksimum przy 335 nm wraz z przesunięciem batochromowym dla pasm długofalowych odpowiednio do 415, 388, 365 nm. Wyniki te są zgodne z uzyskanymi wcześniej przez innych autorów [210,211]. Maksimum przy długości fali 415 nm jest uznawane za charakterystyczny wskaźnik związania antybiotyku z białkiem.

Warto zwrócić uwagę, że wiązanie się AmB z albuminą dotyczy przede wszystkim formy monomerycznej tego antybiotyku. Obserwuje się nieznaczne obniżenie intensywności pasma krótkofalowego, charakterystycznego dla form zagregowanych, jednakże ogólne relacje pomiędzy poszczególnymi formami AmB nie ulegają istotnej zmianie.

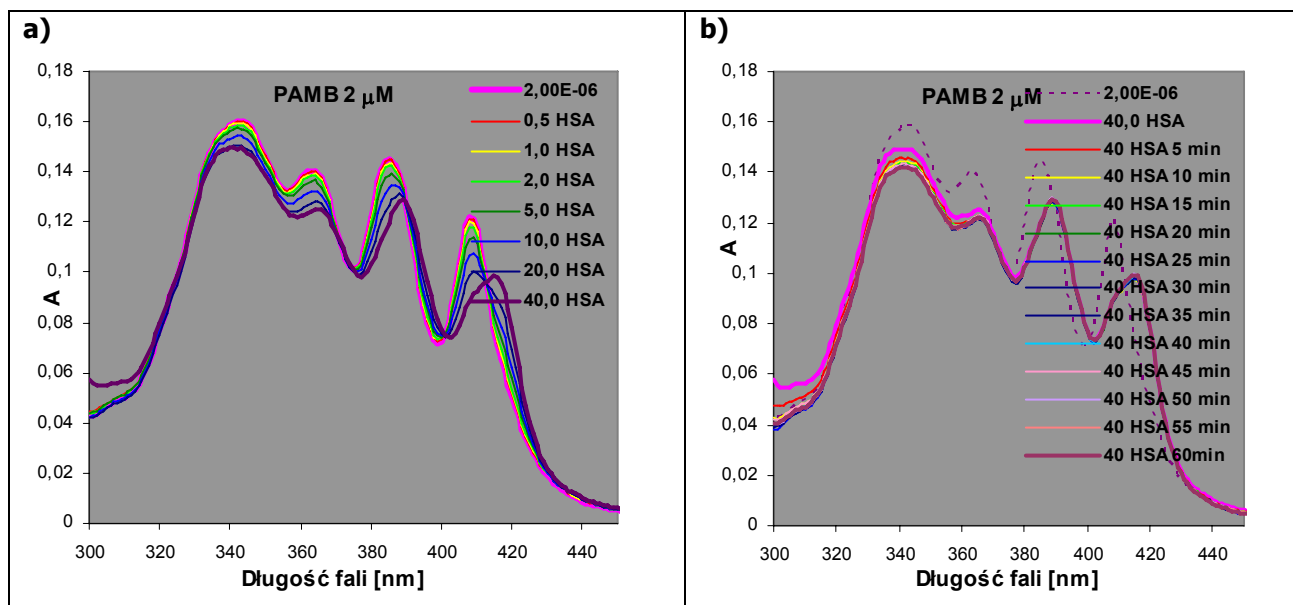
Śledząc z kolei kinetykę wiązania białka z AmB (Rys. 71 b) można zauważyć, iż po upływie 30-35 min od momentu dodania ostatniej porcji HSA (stężenie końcowe 40 μM) zmiany obserwowane w widmie antybiotyku są niewielkie i można już właściwie mówić o osiągnięciu stanu równowagi w tworzeniu kompleksu albumina-AmB. Jest to zgodne doniesieniami Aramwit'a i współaut. [212], według których deagregacja AmB w wyniku działania HSA zachodzi w ciągu pół godziny.

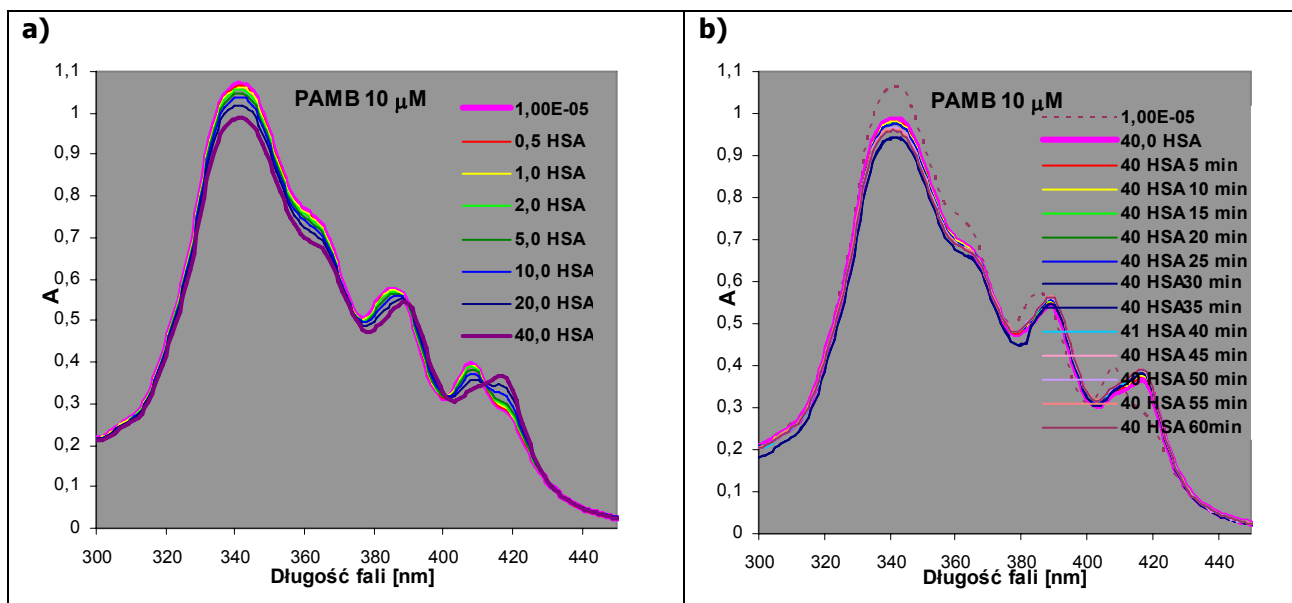
W przypadku badanych pochodnych AmB, tj. AMA i PAMB, oddziaływanie z HSA prowadzi do bardzo podobnych pod względem jakościowym zmian w przebiegu widm jak dla antybiotyku wyjściowego (Rys. 72; 73). W obecności albuminy dla obu badanych pochodnych obserwuje się stopniowe obniżenie intensywności maksimum krótkofalowego, dla długości fali odpowiednio 333 nm (AMA) i 345 nm (PAMB) wraz z przesunięciem widma w kierunku fal dłuższych i wykształceniem charakterystycznego dla kompleksu antybiotyk-białko pasma przy 415 nm. Z uwagi na wysoką zawartość formy monomerycznej w przypadku AMA omawiane zmiany widm są zdecydowanie wyraźniejsze aniżeli dla PAMB. PAMB w szerokim zakresie stężeń występuje w formie zagregowanej i nawet dla stężenia 2 μM można już stwierdzić obecność maksimum długofalowego przy 420 nm. W związku z tym, formowanie kompleksów tego antybiotyku z albuminą wydaje się być utrudnione.





Rys. 72. Widma absorpcyjne AMA o stężeniu odpowiednio 2 i 10 μM w buforze PBS w obecności HSA. Stężenie białka 0,5 – 40 μM .





Rys. 73. Widma absorpcyjne PAMB o stężeniu odpowiednio 2 i 10 μM w buforze PBS w obecności HSA. Stężenie białka 0,5 – 40 μM .

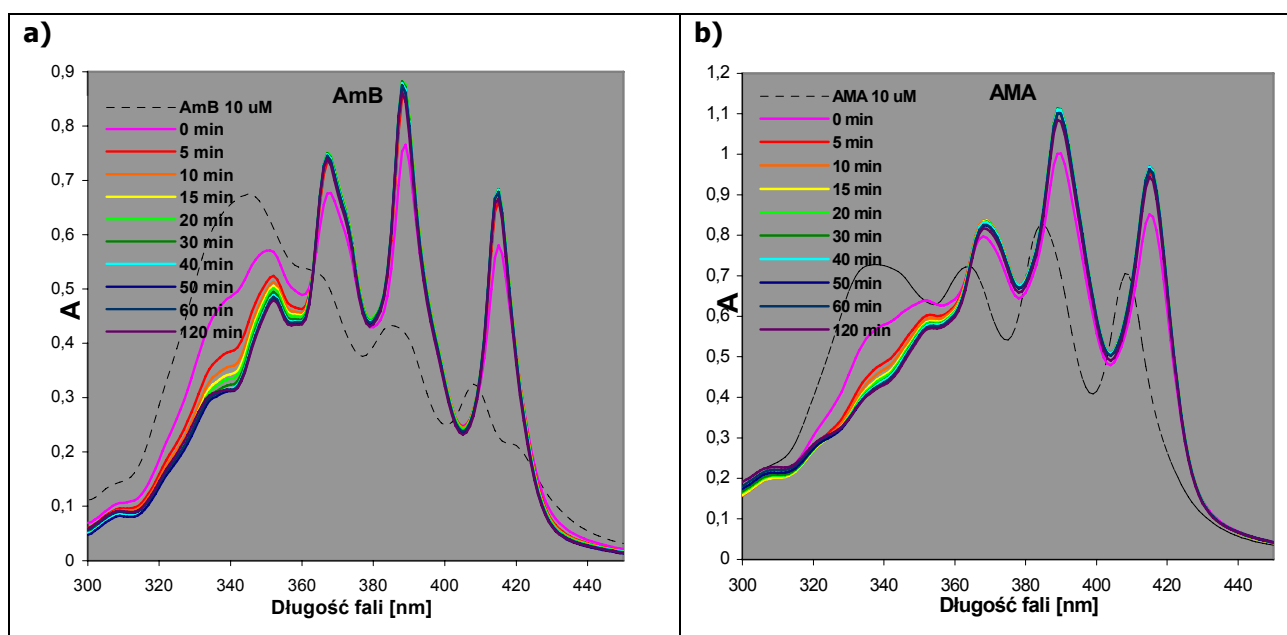
5.6.5.2. Surowica

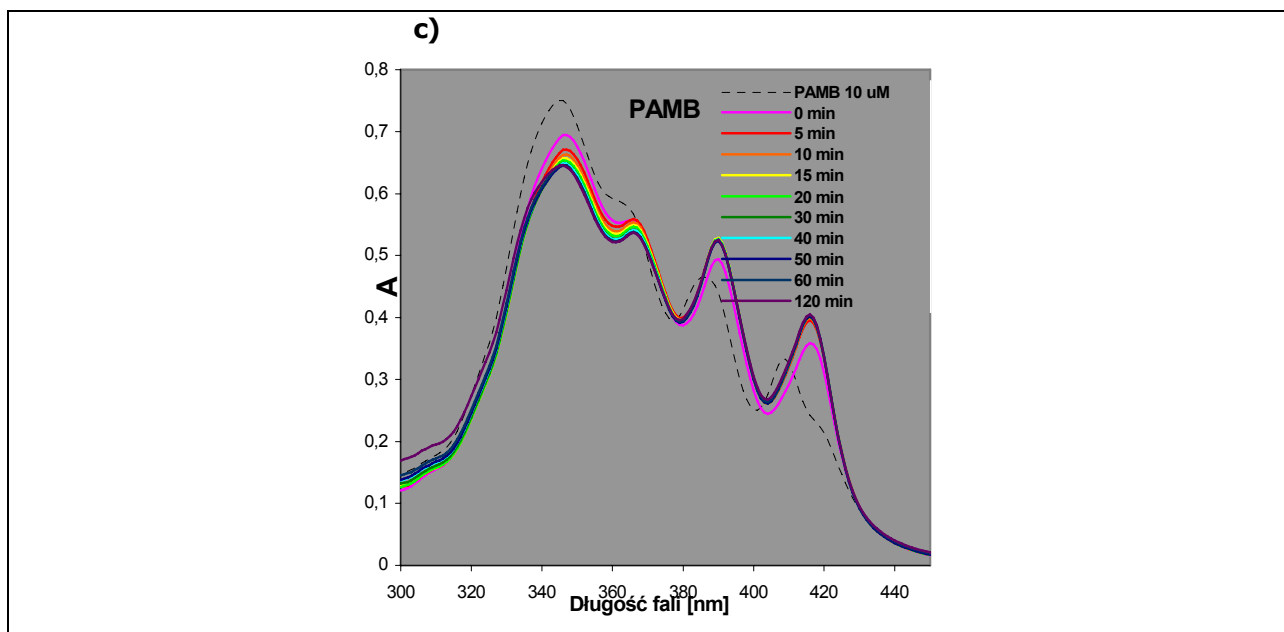
Biorąc pod uwagę fakt, iż z terapeutycznego punktu widzenia istotne jest uwzględnienie oddziaływań AmB i jej pochodnych nie tylko wybiórczo z albuminą, ale również innymi składnikami osocza krwi, dla antybiotyku wyjściowego oraz obu badanych pochodnych zastosowanych w stężeniu 10 μM zarejestrowano widma UV-Vis w buforze PBS z dodatkiem 20 % pełnej surowicy ludzkiej (Rys. 74). Dla porównania w zestawieniu uwzględniono również widma badanych związków wykonane w buforze PBS. W przypadku AmB w obecności surowicy ludzkiej obserwuje się zanik maksimum krótkofalowego dla około 340 nm, a jednocześnie wzrost intensywności widma w obszarze długofalowym, wraz z pojawieniem się struktury oscylacyjnej z maksimum dla długości fal 415, 388, 367 nm (Rys. 74 a). Wskazuje to przede wszystkim na prawie całkowity zanik form zagregowanych. Ponadto, biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe [213] można stwierdzić, iż taki obraz widm jest charakterystyczny dla antybiotyku w formie związanej z lipoproteinami typu LDL. Kształt zarejestrowanego w obecności surowicy widma AmB oraz położenie poszczególnych pasm są zbliżone do znanego z literatury widma AmB w kompleksie z cholesterolem [63,211], co jest zgodne z obserwacjami innych autorów wskazującymi na cholesterol jako miejsce wiązania antybiotyku w LDL [214,215].

Podobną do antybiotyku wyjściowego pod względem jakościowym zmianę przebiegu widm w obecności surowicy notuje się dla AMA (Rys. 74 b). Położenie

poszczególnych pasm po utworzeniu kompleksu pochodnej z lipoproteinami jest zbliżone do AmB, jedynie proporcje pików dla 415 i 367 nm są nieco zmienione.

Zupełnie inaczej kształtuje się obraz widm zarejestrowanych dla PAMB (Rys. 74 c). W odróżnieniu od AmB oraz AMA w obecności surowicy ludzkiej nie stwierdza się dla tej pochodnej zaniku form zagregowanych. Obserwuje się jedynie obniżenie intensywności maksimum krótkofalowego przy 345 nm o ok. 10% bez zmiany jego położenia oraz przesunięcie batochromowe dla pasm długofalowych. Wydaje się, że agregaty tworzone przez PAMB są wyjątkowo trwałe, a z lipoproteinami oddziałują przede wszystkim cząsteczki antybiotyku w formie monomerycznej. Jest to interesujące spostrzeżenie zważywszy na fakt, iż PAMB jest pochodną o radykalnie obniżonej toksyczności w stosunku do komórek zwierzęcych. Jak stwierdzono, w ramach niniejszej rozprawy, wpływ potasu z krwinek czerwonych indukowany przez PAMB zachodzi dopiero w stężeniach ponad 100-krotnie wyższych aniżeli w przypadku AmB, a ponadto związek ten praktycznie nie indukuje hemolizy.





Rys. 74. Widma absorpcyjne **a)** AmB; **b)** AMA; **c)** PAMB, o stężenie 10 μM , zarejestrowane w surowicy ludzkiej rozcieńczonej buforem PBS w stosunku 1:5. Linia przerywaną oznaczono widma badanych związków wykonane w buforze PBS (bez uprzedniej preinkubacji).

6. Dyskusja

Narastający problem oporności wielolekowej oraz ograniczony arsenał skutecznych leków przeciwgrzybiczych stwarzają pilną potrzebę intensywnych poszukiwań nowych ulepszonych preparatów, które mogłyby być stosowane w terapii grzybic układowych. Optymalny chemoterapeutyk powinien charakteryzować się: wysoką aktywnością przeciwgrzybową, szerokim spektrum działania, efektem grzybobójczym (nie grzybostatycznym), brakiem indukowania oporności specyficznej, aktywnością względem szczepów z opornością wielolekową, niską toksycznością [4]. Żaden z dostępnych obecnie w klinice leków przeciwgrzybiczych nie spełnia tych wymagań. Niezbędne jest więc poszukiwanie korzystniejszych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych. Jedną z dróg prowadzących do tego celu jest modyfikacja chemiczna istniejących leków. Analizując wady i zalety dostępnych w klinice preparatów można stwierdzić, że antybiotyk - amfoterycyna B (AmB) z grupy makrolidów polienowych charakteryzuje się największą ilością cech pozytywnych. Jest więc on optymalnym „związkiem wiodącym” (ang. *lead compound*) dla racjonalnych chemicznych modyfikacji zmierzających do otrzymania idealnego preparatu. Wykazano, że główna wada tego cennego antybiotyku, jaką jest jego toksyczność, może być efektywnie zniwelowana dzięki racjonalnie prowadzonym modyfikacjom chemicznym. AmB działa na poziomie błony cytoplazmatycznej tworząc kanały zaburzające kontrolę transportu błonowego.

W ramach badań prowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii nad poszukiwaniem nowych leków przeciwgrzybowych otrzymano wiele pochodnych amfoterycyny B [4,39,40]. Szczególnie korzystne właściwości wykazuje **MFAME**, która zachowuje aktywność przeciwgrzybową wyjściowego antybiotyku, a równocześnie charakteryzuje się radykalnie obniżoną toksycznością wobec komórek zwierzęcych [39-44]. Związek ten należy do generacji pochodnych AmB zawierających duży objętościowy podstawnik w obrębie „polarnej głowy” cząsteczki antybiotyku zdolny do indukowania efektu zawady sterycznej. Poszukując przyczyn niskiej toksyczności tego rodzaju pochodnych zaproponowano szereg koncepcji uwzględniających różne aspekty, natury zarówno fizykochemicznej jak i biologicznej, działania tych związków na poziomie molekularnym. Za najbardziej prawdopodobną uważa się hipotezę zgodnie z którą mechanizm wysokiej selektywności zawadzonych

przestrzennie pochodnych AmB polega na tym, że tworzą one efektywne, letalne kanały w zawierających ergosterol komórkach grzybowych, natomiast w komórkach zwierzęcych, w których błonach występuje cholesterol, powstające kompleksy antybiotyk-sterol nie są zdolne do utworzenia funkcjonalnego kanału [4,41-44]. Weryfikacja tej tezy wymaga jednak przeprowadzenia wielokierunkowych badań obejmujących szeroki wachlarz tego typu związków. Zaprojektowana i zsyntezowana ostatnio nowa rodzina zawadzonych przestrzennie *N*-aminoacylowych pochodnych AmB [40], tzw. seria K stwarza doskonałą możliwość wyjaśnienia zagadki natury selektywnej toksyczności zawadzonych przestrzennie pochodnych AmB, tym bardziej, że jak wynikało ze wstępnych oznaczeń biologicznych, związki te mimo dużego podobieństwa w strukturze zachowują podobną wysoką aktywność przeciwgrzybową a jednocześnie zróżnicowaną w znacznym stopniu toksyczność w stosunku do komórek ssaków.

Poznanie natury czynników i mechanizmów, które decydują o poprawie selektywnej toksyczności zawadzonych przestrzennie pochodnych AmB stanowiło zasadniczy przedmiot prowadzonych przeze mnie w ramach niniejszej rozprawy badań. W badaniach tych uwzględniłam również niezwykle ważny z punktu widzenia przydatności związków przeciwgrzybowych (antymykotyków) w terapii, aspekt aktywności tego typu pochodnych AmB względem opornych szczepów grzybowych.

Aktywność względem szczepów opornych

W literaturze niewiele dostępnych jest informacji na temat wpływu mutacji bądź nadekspresji genów odpowiedzialnych za zjawisko oporności grzybów na działanie makrolidów polienowych. Poznano i opisano wprawdzie rzadkie przypadki występowania oporności specyficznej w odniesieniu do tego typu związków, ale niewiele jak dotąd wiadomo o ich aktywności w stosunku do szczepów z wykształconą opornością wielolekową. Podjęłam w związku z tym badania nad działaniem AmB i wybranych pochodnych w stosunku do szczepów grzybowych reprezentujących różne mechanizmy oporności tj. mutantów ergosterolowych *Candida albicans* oraz wielolekoopornych szczepów *Saccharomyces cerevisiae*. Badania te miały na celu znalezienie odpowiedzi na następujące pytania czy: a) zmiany w składzie sterolowym błony w jakikolwiek sposób wpływają na wrażliwość komórek grzybowych na działanie AmB i pochodnych; b) chemiczne modyfikacje AmB w kierunku poprawy selektywnej toksyczności leku zmieniają aktywność antybiotyku wobec szczepów

opornych oraz c) jaki jest mechanizm, według którego AmB i pochodne przewyżniają zjawisko MDR.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, iż zarówno AmB jak i badane pochodne hamują wzrost i działają grzybobójczo w stosunku do wszystkich testowanych szczepów opornych. W przypadku mutantów ergosterolowych *Candida albicans* (erg-2 i erg-16) zaobserwowałam około 5- krotnie niższą wrażliwość w zestawieniu ze szczepem wyjściowym (C.a.), co wyraźnie koreluje z redukcją aktywności permeabilizacyjnej AmB i pochodnych, badanej zarówno w oparciu o ruch protonów (H^+) jak i wpływ potasu (K^+). Podobną prawidłowość zanotowano wcześniej dla komórek *Rhodotorula gracilis* i nystatyny [216,217]. W przypadku mutantu tego szczepu (M67), niezdolnego do biosyntezy ergosterolu, zaobserwowano zmniejszoną przepuszczalność błony dla kationów (H^+ ; K^+) w porównaniu z dzikim szczepem. W obecności nystatyny elektrochemiczny gradient protonowy generowany w poprzek błony, umożliwiający transport cukrów (D-xyloza), zanikał tylko w komórkach szczepu wyjściowego, podczas gdy w komórkach mutantu pozostawał nienaruszony. Poza tym, jak wykazałam, proces wymiany H^+/K^+ zachodzi dla mutantów w odmienny sposób aniżeli dla szczepu wyjściowego. Stwierdziłam, że AmB i pochodne nie indukują w badanych mutantach ergosterolowych sprzężonej wymiany potasu na proton pobierany ze środowiska, a jedynie uwalnianie potasu wewnątrzkomórkowego, przy czym ze zdecydowanie mniejszą wydajnością niż w szczepie dzikim. Wydaje się, że zmiana wrażliwości mutantów ergosterolowych na działanie AmB i badanych pochodnych związana jest z niezdolnością tego typu szczepów do wytwarzania ergosterolu na skutek defektów w szlaku jego biosyntezy na różnych etapach, co w efekcie prowadzi do akumulacji intermediatów o zmienionej strukturze, a w dalszej konsekwencji do zmian w płynności błony [152]. Szczep **erg-16** w związku z mutacją genu kodującego **5,6-dehydrogenazę** sterolową gromadzi zymosterol, episterol, ergosta-7-en-3- β -ol, ergosta-7,22-dien-3- β -ol, podczas gdy w komórkach **erg-2** nieposiadających funkcjonalnej $\Delta^8\Delta^7$ – **izomerazy** akumulowany jest zymosterol i fekosterol [183]. Można przypuszczać, że w wyniku zmian w składzie sterolowym błony mutantów, permeabilizacja indukowana przez AmB i pochodne, w odróżnieniu od szczepu wyjściowego produkującego ergosterol, nie prowadzi prawdopodobnie do formowania specyficznych kanałów, ale raczej przybiera charakter działania detergentowego. Należy w tym miejscu wyraźnie podkreślić znaczenie faktu, iż mimo kilkakrotnie obniżonej aktywności w stosunku do mutantów ergosterolowych badane związki nadal

zachowują aktywność względem tego typu szczepów, aczkolwiek według mechanizmu o innej naturze [218].

W celu oceny roli struktury sterolu w oddziaływaniu AmB i badanych pochodnych z błonami komórek grzybowych oraz określenia zależności pomiędzy aktywnością biologiczną a stopniem wiązania z komórkami zastosowałam dla szczepu standardowego *C. albicans* (C.a) oraz mutantów ergosterolowych (erg-2 i erg-16) fluorescencyjną metodę transferu energii. Metoda ta wykorzystywana była między innymi do śledzenia oddziaływania AmB z komórkami zwierzęcymi (tymocyty, komórki nerkowe) [219,220] oraz grzybowymi i bakteryjnymi [43,44,191]. Zastosowana do pomiarów sonda fluorescencyjna, TMA-DPH ulega szybkiej, zgodnej ze współczynnikiem podziału inkorporacji do błony plazmatycznej, na co wskazuje znaczny wzrost intensywności fluorescencji po dodaniu sondy do zawiesiny komórek. Z uwagi na dodatni ładunek sonda zakotwicza się na granicy faz lipidy błonowe/woda, a fragment fenyłowy cząsteczki zostaje interkalowany pomiędzy łańcuchy kwasów tłuszczowych fosfolipidów sięgając węgli C₈-C₁₀. Dodanie antybiotyku prowadzi do wygaszania fluorescencji, w wyniku transferu energii pomiędzy cząsteczkami sondy będącej jej donorem, a chromoforem polienu jako akceptorem. Transfer energii między tymi cząsteczkami jest możliwy ze względu na nakładanie się widma emisyjnego sondy i absorpcyjnego polienu.

Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdziłam istnienia korelacji pomiędzy wrażliwością szczepu w stosunku do badanych związków a powinowactwem antybiotyku do komórki. Wydajność transferu energii, odzwierciedlająca ilość antybiotyku związanego z błoną wyznaczona dla AmB i pochodnych, przyjmuje zbliżone wartości w komórkach szczepu wyjściowego (C.a) jak i mutantów (erg-2, erg-16) posiadających defekt w szlaku biosyntezy ergosterolu. Podobną prawidłowość stwierdzono wcześniej dla komórek grzybowych (*C. albicans* ATCC 10261), zwierzęcych (K532) i bakteryjnych (*E. coli* C-600), czyli zawierających odpowiednio ergosterol, cholesterol i pozbawionych sterolu [43,44]. Zaobserwowano, że AmB i MFAME wykazują zbliżony stopień wiązania z błoną niezależnie od różnic we wrażliwości komórek w stosunku do tych antybiotyków. Zdolność oddziaływania antybiotyku z komórką nie jest zatem determinowana tylko i wyłącznie obecnością i strukturą sterolu. Wyniki licznych badań prowadzonych w układach modelowych błon wskazują wyraźnie na możliwość formowania kompleksów AmB i pochodnych z fosfolipidami błonowymi [19,50,96,132]. Poza tym, sama obecność antybiotyku w

błonie nie zawsze jest wystarczająca dla zwiększenia jej przepuszczalności, jak i działania toksycznego, chociaż może być źródłem tych efektów. Brak korelacji pomiędzy powinowactwem antybiotyku do komórki a toksycznością potwierdzono już wcześniej w przypadku tymocytów oraz erytrocytów dla serii znakowanych węglem ^{14}C pochodnych AmB [221]. Wydaje się, że podobna ilość antybiotyku w błonie może powodować różne zaburzenia w strukturze i funkcjonowaniu błony w różnych typach komórek [43,44].

Warto niemniej jednak zwrócić uwagę na różny sposób „zachowania się” AmB i pochodnych w błonie badanych szczepów, czego odzwierciedleniem jest występowanie dwóch typów wygaszania fluorescencji tj. mono- i dwufazowego. Zaobserwowano, iż przypadku szczepu wyjściowego C.a. profil dwufazowy występuje w przypadku wszystkich testowanych związków, podczas gdy dla mutantów ergosterolowych ten typ wygaszania fluorescencji występuje tylko dla AmB. Pochodne, AMA i MFAME, indukują jednofazową kinetykę wygaszania fluorescencji [218].

Haynes i współaut. [191], którzy w oparciu o fluorescencyjną metodę transferu energii badali działanie AmB na wrażliwe oraz odporne w wyniku drastycznego obniżenia zawartości ergosterolu w błonie komórki *Cryptococcus neoformans* zaproponowali ciekawą interpretację przebiegu obu typów wygaszania fluorescencji TMA-DPH. Zgodnie z tą koncepcją, spadek intensywności fluorescencji sondy obserwowany po dodaniu AmB jest konsekwencją transferu energii pomiędzy znajdującymi się w błonie cząsteczkami donora (sonda) i akceptora (antybiotyk). Dalsze zmiany sygnału fluorescencji notowane dla kinetyk dwufazowych są efektem oddziaływania AmB z obecnym w błonie steroidem i tworzeniem transbłonowych kanałów w wyniku agregacji kompleksów AmB-sterol. Kompleksy te na drodze dyfuzji lateralnej przemieszczają się w błonie gromadząc się w domenach błony bogatych w sterol, co prowadzi do wzrostu odległości od cząsteczek sondy, które pozostają w fosfolipidowych, ubogich w sterol domenach błony. Ze względu na to, iż efektywność transferu energii zależy od odległości między cząsteczkami donora i akceptora, oddalenie się cząsteczek antybiotyku od cząsteczek sondy prowadzi do obniżenia transferu energii między nimi, a w konsekwencji wzrostu sygnału fluorescencji. Istnieje również możliwość, że kompleksy AmB-sterol mają mniejszą zdolność do wygaszania fluorescencji TMA-DPH, aniżeli wolna AmB. Wzrost sygnału fluorescencji powyżej sygnału wyjściowego może być uwarunkowany penetracją cząsteczek sondy ze środowiska wodnego do wnętrza komórki, ułatwioną na skutek zmian w strukturze

błony. Sygnał fluorescencji pochodzi zatem od większej ilości cząsteczek sondy, aniżeli na początku. Haynes i współaut. wysunęli hipotezę, że dwufazowy przebieg kinetyki wygaszania fluorescencji świadczy o zdolności do tworzenia przez AmB w błonie kanałów. Jednofazowy profil, który zaobserwowano dla opornego szczepu *C. neoformans*, niezdolnego do biosyntezy ergosterolu, wskazuje zdaniem autorów, iż AmB nie jest zdolna do kompleksowania ze zmodyfikowanymi sterolami, a w konsekwencji kanały nie są formowane. Istnieją jednakże dowody eksperymentalne świadczące o wpływie składu środowiska na profile wygaszania fluorescencji [43,44]. Zaobserwowano, że w przypadku komórek zawieszonych w soli fizjologicznej przebiegi indukowane przez AmB mają charakter dwufazowy, podczas gdy w buforze HEPES profil wygaszania fluorescencji jest monofazowy. Ponadto dla komórek zwierzęcych (K562) uzyskano monofazowe przebiegi, zarówno dla wysoce toksycznej AmB jak i nietoksycznej pochodnej, MFAME, co wyraźnie sugeruje, że dwufazowy profil wygaszania fluorescencji nie zawsze odzwierciedla tworzenie struktur permeabilizujących błonę. Poza tym istnieje możliwość penetracji antybiotyku do wnętrza komórki i jego internalizacji, o czym świadczą wyższe wartości transferu energii dla sondy DPH, która w odróżnieniu do TMA-DPH, wnika do głębszych bardziej hydrofobowych obszarów błony komórkowej i wiąże się zarówno z błoną cytoplazmatyczną jak i wewnątrzkomórkowymi strukturami błonowymi [43,44]. Wydaje się zatem, że metoda fluorescencyjna pozwala na oznaczenie wiązania antybiotyku z błoną, ale nie daje możliwości jednoznacznego wnioskowania o konsekwencjach tego oddziaływania.

Na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań stwierdzono, iż większość szczepów wielolekoopornych zachowuje wrażliwość na związki działające na poziomie błony komórkowej, łącznie z amfoterycyną B [45], ale mechanizm tego zjawiska nie został jak dotąd wyjaśniony. Porównawcze badania nad mechanizmem działania AmB i MFAME wykonane w Katedrze Technologii Leków i Biochemii na szczepach *S. cerevisiae* wrażliwym (JG436) i opornym (PS12-4) zawierającym transporter Cdr1p pozwoliły stwierdzić, iż testowane antybiotyki indukują w przypadku obu szczepów stymulację komórek, permeabilizację błony oraz efekt toksyczny [46]. Zaproponowano na tej podstawie, że zachowanie aktywności wobec szczepów MDR wynika z faktu, iż AmB jak i jej pochodne nie są prawdopodobnie substratami błonowych pomp eksportujących. Potwierdzenie tej hipotezy wymagało jednak przeprowadzenia

dotatkowych badań na szczepach charakteryzujących się różnymi mechanizmami oporności i zawierających pompy błonowe o różnej wymogach substratowych.

W oparciu o wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy stwierdziłam, iż mutanty wielolekooporne *S. cerevisiae* wyposażone w pompy białkowe dwóch rodzajów, ABC (ADCDR2) oraz MFS (ADCaMDR1) zachowują podobną wrażliwość jak szczep wyjściowy (AD1234568) zarówno w stosunku do AmB jak i pochodnych. Wskazują na to zarówno wyniki uzyskane w testach długiego (MIC, MFC) jak i krótkiego działania (ruch protonów H^+ , wpływ jonów potasu K^+ , kinetyka wymiany H^+/K^+). Ponadto AmB i pochodne wykazują podobne powinowactwo w stosunku do błon komórkowych wszystkich badanych szczepów, niezależnie od typu posiadanych przez nie pomp eksportujących, co stwierdziłam w oparciu o fluorescencyjną metodę transferu energii. Powyższe obserwacje wyraźnie sugerowały, iż AmB i pochodne prawdopodobnie nie są substratami transporterów błonowych obu typów: ABC i MFS. Potwierdzeniem tego przypuszczenia są wyniki badań, w których wykazałam brak wpływu glukozy jako źródła energii na przebieg wygaszania fluorescencji sondy TMA-DPH w komórkach wszystkich testowanych szczepów MDR, zarówno znajdujących się w fazie stacjonarnej jak i metabolizujących. W celu uzyskania dodatkowych dowodów eksperymentalnych potwierdzających zaproponowaną hipotezę przeprowadziłam eksperymenty z komórkami szczepów wielolekoopornych znakowanych rodaminą 6G. Zależny od energii eksport barwnika obserwowałam jedynie w przypadku mutanta ADCDR2 wyposażonego w transporter białkowy typu ABC. Brak kompetycji w procesie transportu R6G zachodzącego za pośrednictwem Cdr2p wskazuje, iż badane antybiotyki nie są substratami tego rodzaju pomp błonowych.

Ostatnio stwierdzono, iż adriamycyna stosowana w leczeniu chorób nowotworowych wzmacnia ekspresję genu *CDR1*, kodującego transporter białkowy typu ABC, i zasugerowano że może to spowodować wzrost oporności na AmB patogennych szczepów grzybów, wywołujących poważne schorzenia u pacjentów poddawanych terapii przeciwnowotworowej [222]. Jednakże w świetle prezentowanych w niniejszej rozprawie wyników wskazujących, że AmB i jej pochodne nie są substratami błonowych pomp eksportujących, sugestia ta nie wydaje się słuszna.

Znane są dowody eksperymentalne, które wyraźnie wskazują, że zdolność do interakcji z transporterami błonowych silnie zależy od rozmiarów molekularnych substratu [175]. Czynniki te wydają się mieć krytyczne znaczenie niezależnie od wymagań dotyczących hydrofobowości. W przypadku transportera Pdr5p stwierdzono, że minimalna objętość

cząsteczki substratu wynosi ok. $90 \text{ \AA}^3$ z optimum w zakresie $200\text{--}225 \text{ \AA}^3$. Dalszy wzrost rozmiarów cząsteczki substratu wywiera niekorzystny wpływ na efektywność eksportu pomp błonowych. W oparciu o metody obliczeniowe oszacowano objętość cząsteczek AmB, AMA i MFAME na równe odpowiednio 985, 988 i $1178 \text{ \AA}^3$ [223]. Objętość cząsteczki MFAME jest wyraźnie większa ze względu na obecność dużego podstawnika na grupie aminowej mykozaminy. Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia można przypuszczać, że tego typu związki nie spełniają wymogów sterycznych transporterów MDR z uwagi na duże rozmiary cząsteczek.

Selektywność permeabilizacyjna względem błon ergo- i cholesterolowych

Kolejny etap prowadzonych przeze mnie badań dotyczył zagadnienia powstawania i wydajności kanałów błonowych tworzonych przez wybrane pochodne AmB. Badania te prowadziłam w układzie modelowym z zastosowaniem sztucznych błon lipidowych. Pęcherzyki lipidowe, już od chwili odkrycia, są powszechnie wykorzystywane w badaniach wpływu antybiotyków polienowych na przepuszczalność błonową. Większość tych badań koncentruje się na charakterystyce właściwości jonoforowych (jonoselektywności) makrolidów polienowych. Niemniej jednak mimo intensywnych wieloletnich studiów w tej dziedzinie struktury uszkodzeń powstających w błonie w wyniku działania AmB ciągle nie udało się wykazać metodami eksperymentalnymi, chociaż koncepcja takich struktur została zaproponowana w oparciu o metody modelowania molekularnego [82]. Wyniki doświadczeń prowadzonych na różnych rodzajach błon, o różnym składzie lipidowym i w różnych warunkach nie są do końca spójne. Prawdopodobnie powstają kanały o różnej strukturze, właściwościach i selektywności względem migrujących cząsteczek. Nie jest wiadomym czy selektywność kanału ma związek z selektywną toksycznością antybiotyku.

Na podstawie prowadzonych wcześniej badań nad działaniem polienów na pęcherzyki lipidowe z wykorzystaniem metod ^{31}P -NMR stwierdzono, że aktywność jonoforów takich jak makrolidy polienowe uzależniona jest od właściwości i stabilności formowanego kanału [57,224]. Permeabilizacja pęcherzyków wymaga zgromadzenia się wystarczającej do uformowania kanału liczby cząsteczek antybiotyku na powierzchni bądź we wnętrzu pęcherzyków lipidowych. Ze względu na wysoką ruchliwość jonu w kanale, obserwowane zmiany jego stężenia nie odzwierciedlają właściwie przepuszczalności kanału, ale raczej kinetykę formowania kanału.

Uwalnianie kationu z pęcherzyków zależy od względnego tempa dwóch procesów: 1) tworzenia kanału w wyniku akumulacji odpowiedniej ilości cząsteczek antybiotyku w błonie bądź na jej powierzchni; 2) wymianie antybiotyku pomiędzy pęcherzykami. Wyróżnia się dwa skrajnie przypadki. Jeżeli tempo formowania kanału jest znacznie szybsze aniżeli wymiana antybiotyku pomiędzy pęcherzykami spadek gradientu pH zachodzi według mechanizmu „wszystko albo nic”. Wówczas koegzystują dwie populacje pęcherzyków – tylko jedna część jest spermeabilizowana w wyniku uformowania kanału i wykazuje pH zewnętrznego środowiska, podczas gdy pozostała część pęcherzyków zachowuje pH początkowe. W przypadku, gdy wymiana antybiotyku jest szybsza, mamy do czynienia z mechanizmem „progresywnym”, zgodnie z którym wszystkie pęcherzyki ulegają permeabilizacji jednocześnie ale „tracą” gradient pH tylko częściowo [224].

Na podstawie badań aktywności permeabilizacyjnej AmB i wybranych pochodnych względem pęcherzyków ergo- i cholesterolowych przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy w oparciu o metodę fluorymetryczną trudno jednoznacznie wnioskować o mechanizmie działania badanych związków. Wydaje się, że AmB oraz AMA, K₉, K₁₀, K₁₇, K₁₉, K₂₀, K₂₄ działają na pęcherzyki obu typów według mechanizmu „wszystko albo nic”. Natomiast mechanizm działania wysoko selektywnych związków - MFAME i PAMB w stosunku do pęcherzyków cholesterolowych trudno jednoznacznie wyjaśnić. Niemniej jednak w przypadku tych dwóch związków można stwierdzić, że natura procesu zwiększania przepuszczalności błon zawierających cholesterol jest zdecydowanie odmienna. W odróżnieniu od pozostałych związków, MFAME i PAMB, nawet dla najwyższych stężeń nie indukują całkowitego wypływu potasu z pęcherzyków cholesterolowych. Przypuszczalnie związki te nie są w stanie utworzyć efektywnych struktur kanałowych permeabilizujących tego typu błony a ich działanie w bardzo wysokich stężeniach najprawdopodobniej ma charakter detergentowy.

Struktura roztworów wodnych AmB i pochodnych

Istnieją sugestie wielu autorów, iż istotnym czynnikiem determinującym aktywność biologiczną i selektywną toksyczność AmB jak również jej pochodnych jest stan, w jakim antybiotyk występuje w roztworze wodnym [26,41,76,101,131]. Wiadomo, że agregacja AmB jak i jej pochodnych jest procesem złożonym, wieloetapowym, jednakże jak dotąd dokładny mechanizm tego procesu nie został

wyjaśniony [38]. Koniecznym stało się zatem przeprowadzenie precyzyjnych analiz składu roztworów wodnych dla AmB, jako związku referencyjnego, oraz wybranych pochodnych (AMA, AMPA, K₉, K₁₀, K₁₇, K₁₉, K₂₀, K₂₁, PAMB), identyfikacja tworzonych przez nie form zagregowanych i podjęcie próby skorelowania zawartości poszczególnych form z aktywnością biologiczną.

Monitorowanie procesu agregacji oraz określenie stopnia agregacji badanych związków prowadziłam w oparciu o spektroskopię absorpcyjną UV-VIS. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, iż widma absorpcyjne AmB oraz badanych pochodnych zarejestrowane w środowiskach wodnych o różnym składzie (woda, sól fizjologiczna, PBS, Tris) są zależne od stężenia oraz nie wykazują obecności punktów izosbestycznych. Ta ostatnia obserwacja wskazuje, że w badanych roztworach występują więcej niż dwie formy spektralne.

Szczegółowa analiza widm została przeprowadzona przy użyciu zaawansowanych technik chemometrycznych. W celu identyfikacji liczby form spektralnych tworzonych przez AmB i jej pochodne zastosowałam metodę głównych składowych – PCA (ang. *Principal Component Analysis*). Klasyczna analiza wartości własnych nie przyniosła jednak jednoznacznych rezultatów. Dzięki starannej analizie widm resztowych stwierdziłam współistnienie co najmniej 4 form spektralnych: monomeru (M) oraz 3 typów agregatów (X, Y, A) o różnym stopniu agregacji i różnej rozpuszczalności. Zastosowanie iteracyjnej procedury samouzgodnienia określanej mianem **MCR-ALS** (ang. *Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares*) pozwoliło z kolei na uzyskanie widm poszczególnych form spektralnych oraz określenie zawartości tych form w roztworach o różnym składzie.

Uzyskane dzięki zastosowaniu metody MCR-ALS widmo formy monomerycznej antybiotyku w środowisku wodnym jest bardzo podobne do widma w metanolu i mieszaninie metanol/woda. Jedyna różnica polega na nieznacznym, o ok. 1 nm, przesunięciu pasm absorpcyjnych w obszarze długofalowym. Przesunięcie to wynika najprawdopodobniej z różnic w otoczeniu chromoforu: w roztworach alkoholowych i alkoholowo-wodnych jest ono znacząco mniej polarne niż w roztworach wodnych.

Widma bazowe pozostałych 3 form spektralnych mają zupełnie odmienny charakter. Brak w nich typowej dla monomeru struktury oscylacyjnej w obszarze długofalowym, za to wszystkie posiadają silne pasmo absorpcyjne w obszarze krótkofalowym. Poszczególne widma różnią się przede wszystkim położeniem maksimum tego pasma.

Tego typu widma dla chromoforu polienowego interpretowane są zazwyczaj jako marker agregacji cząsteczek. W powstającym hydrofilowym agregacie zdecydowanie hydrofobowe chromofory lokują się we wnętrzu agregatu. Bliskie sąsiedztwo i określona orientacja chromoforów przejawia się właśnie zanikiem struktury oscylacyjnej i przesunięciem maksimum absorpcji w kierunku krótszych fal. Obserwowane różnice w położeniu maksimum pasma absorpcji zdają się wskazywać, że AmB i jej pochodne zdolne są do tworzenia w roztworach wodnych co najmniej 3 form zagregowanych o różnej organizacji.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdziłam, iż obecność oraz proporcje poszczególnych form spektralnych uzależnione są przede wszystkim od rodzaju pochodnej. Wydaje się, iż istotny wpływ na przebieg procesu agregacji ma również stan jonowy cząsteczki. Obserwacja ta potwierdza wyniki wcześniejszych badań dotyczących zjawiska agregacji AmB i jej pochodnych [38]. W przypadku pochodnych pierwszej generacji – amidów AMA, AMPA - obdarzonych w obojętnym pH dwoma elementarnymi ładunkami dodatnimi, charakterystyczny jest wysoki udział monomeru a jednocześnie brak (AMA) bądź wyraźna redukcja zawartości agregatu wielkocząsteczkowego typu A, który wydaje się być „zastępowany” przez formę pośrednią X (AMPA). Z kolei w przypadku „zwitter-jonowych” *N*-aminoacylowych pochodnych nowej generacji udział agregatu A jest wyraźny, przy czym proporcje tej formy i zakres występowania są zróżnicowane w zależności od struktury związku. Najwyższą zawartość agregatu A stwierdziłam w przypadku pochodnych K₂₁ i PAMB. Obie te pochodne zawierają w rejonie „głowy polarnej” podstawniki o charakterze lipofilowym. Wśród całej serii badanych pochodnych zasadniczo trudno jest znaleźć związek wykazujący duży udział agregatu pośredniego typu Y. Obecność tej formy stwierdza się jedynie w przypadku K₁₉ oraz PAMB. Przy czym dla PAMB zawartość formy Y notuje się jedynie w zakresie niskich stężeń ogólnych antybiotyku.

Wydaje się, że w odróżnieniu od doniesień dotyczących MFAME [42], skład środowiska wodnego (różne bufony, różna siła jonowa) nie ma wpływu na widma form spektralnych badanych pochodnych. Decyduje natomiast, podobnie jak typ pochodnej, o stężeniu antybiotyku, przy którym poszczególne formy spektralne występują w przewadze.

Stężenia poszczególnych form spektralnych uzyskane w oparciu o metodę numerycznej dekompozycji widm zostały wykorzystane do konstrukcji modelu agregacji. Na podstawie wcześniejszych prac dotyczących procesów agregacji AmB

[38] stwierdzono, że stężenie monomeru nie rośnie nieograniczenie, ale przyjmuje pewną graniczną wartość, którą określono mianem MMC. Zaproponowano występowanie agregacji o charakterze nieograniczonym. W pierwszym etapie agregacji dochodzi do łączenia amfipatycznych monomerów do hydrofilowych dimerów. W kolejnych etapach dimery oddziałują ze sobą tworząc coraz większe agregaty. Wzrost agregatów na drodze inkorporacji monomerów jest mniej prawdopodobny z uwagi na to, iż w tym przypadku lipofilowa część cząsteczki musiałaby pokonać hydrofilową powierzchnię agregatu. W niniejszej rozprawie przyjęto model wieloetapowej agregacji nieograniczonej [38]. Wartości stałych dimeryzacji K_d oraz agregacji K_a wyznaczałam z iteracyjnego dopasowania równań modelu do danych doświadczalnych metodą algorytmu Simplex w wersji Nelder-Meada. Zaobserwowałam występowanie charakterystycznej zależności pomiędzy wartościami stałych dimeryzacji i stałych agregacji w poszczególnych typach agregatów. Za wyjątkiem AMA oraz K_9 , agregat, którego udział wzrasta nieograniczenie wraz ze wzrostem stężenia roztworu (A dla AmB, AMPA, K_9 , K_{10} , K_{17} , K_{20} i K_{21} ; X dla AMA; Y dla K_{19}) charakteryzuje się dużo większą stałą agregacji w porównaniu do stałej dimeryzacji. W przypadku agregatów „pośrednich” relacja ta nie jest tak wyraźna, a dla AMPA jest ona nawet odwrotna.

Aktywność AmB w stosunku do komórek zwierzęcych przypisuje się rozpuszczalnym oligomerom podczas gdy monomery oraz nierozpuszczalne agregaty uznawane są za formy nietoksyczne [26,76,101]. Stwierdzono, że forma monomeryczna antybiotyku wykazuje znacznie wyższą selektywność w porównaniu do agregatów rozpuszczalnych. Postuluje się, że monomery nie są zdolne do formowania kanałów w błonach zawierających cholesterol. W przeciwieństwie do tego, rozpuszczalne agregaty posiadają aktywność zarówno w stosunku do błon ergo- jak i cholesterolowych.

Wydaje się, że istotne znaczenie w zjawisku selektywnej toksyczności ma nie tyle sam stopień agregacji, co organizacja form zagregowanych. Wykazano wcześniej [38], że zmiany stanu jonowego cząsteczki wpływają nie tylko na przebieg agregacji i rozpuszczalność agregatów, ale również na widma samych agregatów. Siłą napędową procesu agregacji jest „izolacja” hydrofobowego chromoforu polienowego od kontaktu ze środowiskiem wodnym, dlatego postuluje się, że nawet niewielkie zmiany w strukturze agregatów powinny znaleźć swoje odzwierciedlenie w położeniu i intensywności pasm absorpcyjnych. Stwierdzono na przykład [38], że położenie maksimum krótkofalowego w widmie agregatów zależy od stanu jonowego cząsteczki. Agregaty AmB w stanie jonu obojnego wykazują maksimum przy ok. 346 nm,

agregaty estru metylowego AmB lub agregaty AmB w silnie kwaśnym środowisku (cząsteczka obdarzona ładunkiem dodatnim) posiadają maksimum przy ok. 334 nm, a cząsteczki o ładunku ujemnym (AmB w środowisku alkalicznym lub N-acetyloamfoterycyna B) przy ok. 327 nm. Jest charakterystyczne, że ww. położenia krótkofalowego maksimum absorpcji odpowiadają różnym typom agregatów wykrytym dzięki numerycznej dekompozycji widm: agregat typu A – 346 nm, typu X – 334 nm, typu Y – 328 nm. Obserwacja to stwarza podstawy do pewnych sugestii dotyczących przyczyn powstawania różnych form agregatów.

Uznaje się powszechnie, że jedną z cech spektroskopowych zagregowanych form AmB jest występowanie w ich widmach CD silnego dubletu ekscyticznego przy ok. 340 nm [100,225,226]. W widmach tych obserwuje się również charakterystyczną strukturę oscylacyjną w długofalowej części widma z charakterystycznym pasmem przy ok. 420 nm. Widmo to przypisywane jest wielkocząsteczkowym agregatom AmB – agregaty typu A. Na podstawie różnic zaobserwowanych w widmach CD MFAME w porównaniu z widmami AmB zasugerowano [41], że w roztworach wodnych tej pochodnej formowane są agregaty o odmiennej geometrii. Przypuszcza się, że ten właśnie czynnik może być odpowiedzialny za radykalne obniżenie toksyczności MFAME.

Rozważając wpływ stanu antybiotyku w roztworze na jego aktywność biologiczną przyjmuje się zwykle, że nierozpuszczalne agregaty o dużym stopniu asocjacji nie mają wpływu na aktywność. Założenie to nie zawsze musi być prawdziwe. Stwierdzono [41], że w miarę wiązania się z błoną form rozpuszczalnych agregaty nierozpuszczalne mogą ulegać dysocjacji i tworzyć rozpuszczalne formy aktywne. Tym samym nie można bezpośrednio przenosić wyników uzyskanych w modelowych roztworach wodnych na sytuację istniejącą w zawieszynie komórek nawet, jeżeli podłoże płynne nie zawiera składników mogących sorbować antybiotyki. Sama obecność komórek lub pęcherzyków lipidowych może mieć wpływ na zawartość poszczególnych form antybiotyku. Nie bez znaczenia pozostaje również wpływ wielkocząsteczkowych składników osocza krwi na stan antybiotyku. Na podstawie szeregu badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* wykazano bowiem, że AmB przejawia zdolność do wiązania się z białkami surowicy ludzkiej, głównie z albuminą (HSA) oraz kwaśną α_1 – glikoproteiną (AAG) [63,211,227,228]. Uważa się, że tego typu oddziaływania mają istotne znaczenie dla efektywności terapeutycznej leków. Przypuszcza się, iż w przypadku AmB proteiny surowicy ludzkiej pełnią rolę mediatora pomiędzy stanem agregacji antybiotyku a jego

toksycznością. Wpływ białek surowicy na stopień agregacji AmB, nie został jednak jak dotąd w pełni wyjaśniony. Wyniki licznych badań wskazują na istnienie specyficznych oddziaływań amfifil-białko, które to interakcje współzawodniczą z procesem agregacji związków o charakterze amfifilowym [229]. Brajtburg i współaut. [63] wykazali, że AmB wiąże się silnie z białkami surowicy, łącznie z albuminami, co prowadzi w efekcie do redukcji toksyczności antybiotyku. Brezis i współaut. [227] z kolei zaobserwowali wyraźne obniżenie toksyczności AmB w warunkach zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, w przypadku gdy antybiotyk administrowany jest razem z albuminami. Według koncepcji Armawit'a i współaut. [212] efekty te są wynikiem formowania przez HSA niekonwalencyjnych kompleksów z AmB, co prowadzi w rezultacie do zwiększenia krytycznego stężenia agregacji antybiotyku (CAC, ang. *critical aggregation concentration*), jak również redukcji stopnia agregacji (rozmiaru agregatów) oraz wzrostu rozpuszczalności leku. Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia w ramach niniejszej rozprawy podjęłam próbę określenia wpływu, jaki wywiera albumina na stan AmB oraz dwóch wybranych pochodnych: AMA i PAMB. Jak zaobserwowałam, w obecności HSA dochodzi do obniżenia najintensywniejszego pasma widma AmB w obszarze krótkofalowym, identyfikowanego z formą agregatu pośredniego typu X, co sugeruje redukcję zawartości formy zagregowanej w wyniku dysocjacji do formy monomerycznej. W ten sposób albumina może stać się specyficznym „nośnikiem” zdeagregowanej i postulowanej jako nietoksyczna formy AmB. Formowanie kompleksów HSA z antybiotykiem w formie monomerycznej jest tym bardziej prawdopodobne, że metodami powierzchniowo wzmacnianej spektroskopii Ramana (SERS - *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) nie stwierdzono występowania w fazie wodnej „wolnych” monomerów w obecności surowicy ludzkiej [213]. W przypadku pochodnych AmB zmiany przebiegu widm w wyniku oddziaływania z HSA są bardzo podobne pod względem jakościowym jak te obserwowane dla antybiotyku wyjściowego. Niemniej jednak dla PAMB wydaje się, że kompleksowanie z albuminą jest utrudnione z uwagi na wysoką zawartość form zagregowanych notowaną dla tej pochodnej.

W oparciu o wyniki licznych badań przeprowadzonych zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* stwierdzono wcześniej, że AmB przejawia dużą zdolność do wiązania się nie tylko albuminą ale również z lipoproteinami krwi [63,228,230]. Jednym z czynników odpowiedzialnych za stopień tych oddziaływań jest stosunek molowy cholesterol-fosfolipidy. Brajtburg i współaut. [63] wykazali, że AmB wiąże się silniej z

lipoproteinami o małej (LDL) i bardzo małej gęstości (VLDL), aniżeli z lipoproteinami o dużej gęstości (HDL). Stwierdzono, że formowanie kompleksów z lipoproteinami nie wywiera wpływu na aktywność antybiotyku wobec zawierających ergosterol komórek grzybowych, ale może modulować jego działanie w stosunku do komórek zwierzęcych, w których błonach występuje cholesterol. Obserwacje te zostały poparte wynikami badań Barwicz i współaut. [211]. Zasugerowali oni, że prawdopodobnie za wysoką nefrotoksyczność AmB obserwowaną w warunkach *in vivo* odpowiedzialne jest kompleksowanie antybiotyku z lipoproteinami typu LDL. Rozważa się hipotezę, iż AmB po związaniu z lipoproteinami zmienia ich metabolizm prowadząc do powstania metabolitów wykazujących zdolność do wazokonstrykcji (zwężenia światła naczyń krwionośnych), uważanej za jedno z możliwych głównych źródeł toksyczności antybiotyku [231]. W związku z powyższymi doniesieniami, koniecznym stało się określenie „zachowania” AmB i pochodnych nie tylko w obecności czystej albuminy, ale również pełnej surowicy ludzkiej. W tych warunkach zaobserwowałam zdecydowane różnice w przebiegu rejestrowanych widm dla AmB i AMA w zestawieniu z wynikami uzyskanymi dla PAMB. Otóż w odróżnieniu od AmB i AMA, nie stwierdza się dla tej pochodnej znaczącego rozpadu form zagregowanych, co sugerowałoby, że w ustroju prawdopodobnie rezerwuarem PAMB nie są kompleksy z białkami osocza i lipoproteinami.

W świetle przedstawionych w niniejszej pracy wyników, PAMB wydaje się najciekawszym wśród serii testowanych związków, z punktu widzenia właściwości zarówno natury biologicznej jak i fizykochemicznej. Związek ten charakteryzuje się wysoką selektywnością działania, indukując permeabilizację krwinek czerwonych dopiero w stężeniach ponad 100-krotnie wyższych aniżeli antybiotyk wyjściowy. Wydaje się, że natura mechanizmu działania tego związku w stosunku do erytrocytów jest odmienna aniżeli w przypadku antybiotyku wyjściowego. AmB działając na krwinki powoduje lizę koloidoosmotyczną, będącą wynikiem ruchu jonów zgodnie z gradientem ich stężeń, przy czym zmiany powstałe w błonie nie powodują jej niespecyficznego destrukcji a związek jedynie w niewielkim stopniu wpływa na jej trwałość mechaniczną. Na podstawie wyników uzyskanych dla PAMB, można przypuszczać, iż ten powszechnie uznawany dla AmB mechanizm hemolizy nie występuje w tym przypadku a zwiększanie przepuszczalności błony erytrocytów w dużych stężeniach związku zachodzi na innej drodze. Wszystkie makrolidy polienowe jako związki amfipatyczne wykazują w dużych stężeniach działanie detergentowe.

Biorąc pod uwagę wymieniane i omawiane w poprzednich rozdziałach niniejszej rozprawy czynniki o istotnym znaczeniu dla selektywnej toksyczności AmB, jak różnicowe powinowactwo do ergosterolu i cholesterolu, oraz występowanie antybiotyku w formie monomerycznej w roztworach wodnych, nie można wytłumaczyć istoty korzystnych właściwości pochodnej - PAMB. W przypadku tego związku nawet przy najniższych stężeniach, stwierdza się obecność form zagregowanych, przy czym wydaje się, że agregaty PAMB wykazują wyjątkową trwałość. Świadczy o tym przede wszystkim fakt, iż w mieszaninie roztwór wodny:metanol w stosunku objętościowym 1:1 związek ten, w przeciwieństwie do wszystkich pozostałych pochodnych, nie występuje w formie monomerycznej (dane nieprzedstawione). Monomeryzację antybiotyku osiąga się dopiero po zastosowaniu układu 1:8 (dla wysokich stężeń) bądź 1:4 (dla niskich stężeń). Jak wykazałam PAMB zachowuje się „nietypowo” również w obecności surowicy ludzkiej. Jego oddziaływanie z lipoproteinami surowicy jest na tyle słabe, że w badanych warunkach większość antybiotyku pozostaje w formie zagregowanej A.

Podsumowując wyniki tych prac można stwierdzić, iż postulowana przez wielu autorów hipoteza o istotności zmian struktury roztworów wodnych antybiotyku (formy monomeryczne i zagregowane) w zjawisku selektywnej toksyczności wydaje się być słuszna jedynie dla niskoselektywnego antybiotyku wyjściowego i ewentualnie jego niskoselektywnych pochodnych I generacji. Nie ma ona jednakże charakteru generalnego i nie można w jej oparciu tłumaczyć istoty selektywnego działania zawadzonych przestrzennie wysokoselektywnych, niskotoksycznych pochodnych AmB. Pochodne takie wykazują wprawdzie pewien wzrost udziału uznawanej jako nietoksycznej formy monomerycznej antybiotyku, niemniej jednak, jak stwierdziłam, stężenia poszczególnych form spektralnych w środowiskach wodnych o różnym składzie zmieniają się dramatycznie i trudno w zasadzie mówić o wyraźnej relacji pomiędzy strukturą roztworu a efektem biologicznym działania tychże związków. Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wydają się wskazywać, na to że prawdopodobnie w zjawisku selektywnej toksyczności kluczowe znaczenie odgrywają przede wszystkim różnice w zdolności do tworzenia kanałów niezależnej od zdolności kompleksowania się ze sterolami w komórkach zawierających w błonach odpowiednio ergo- i cholesterol. Przypuszczenie to potwierdzają eksperymenty z udziałem pęcherzyków lipidowych, w których to zaobserwowałam istnienie zasadniczych różnic

w tempie oraz wydajności permeabilizacji indukowanej przez badane pochodne w zależności od składu sterolowego.

Konkluzja

Selektywność działania (selektywna toksyczność) oraz aktywność względem szczepów opornych są szczególnie trudnymi do rozwiązania, ważnymi problemami w projektowaniu nowych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych. Nowe, zawierające zawadę przestrzenną N-podstawione pochodne antybiotyku polienowego amfoterycyny B (AmB) zdają się przybliżać nas do pomyślnego rozwiązania tych problemów. Przeprowadzone przeze mnie badania pozwoliły na poznanie istoty korzystnych właściwości tej grupy związków, dając racjonalne podstawy dla ukierunkowanych dalszych modyfikacji tego antybiotyku. Kluczowe wnioski wynikające z mojej pracy są następujące:

- mutanty drożdżaków z defektem biosyntezy ergosterolu (oporność specyficzna) zachowują wrażliwość na badane związki, jest ona jednak kilkakrotnie mniejsza, zaś mechanizm ich działania polega głównie na niespecyficznym dezintegracji błony, a nie na tworzeniu specyficznych kanałów błonowych
- badane związki zachowują pełną aktywność względem szczepów z opornością wielolekową zawierających pompy eksportujące zarówno z nadrodzin ABC jak i MFS. Natura tej wrażliwości polega na tym, że związki te nie są substratami tych pomp ze względu na ich duże objętości cząsteczkowe.
- zbadanie licznej grupy pochodnych AmB o radykalnie zwiększonej selektywnej toksyczności ugruntowuje tezę o istotności zawady przestrzennej w N-podstawionych pochodnych dla uzyskiwania związków o niskiej toksyczności
- wysoka selektywna toksyczność zawadzonych przestrzennie pochodnych AmB nie jest wynikiem różnicowego powinowactwa związków zarówno do błony cytoplazmatycznej jak i steroli błonowych, ani też nie jest warunkowana monomeryzacją pochodnych w roztworach wodnych. Stwierdzenie to zaprzecza powszechnym w literaturze tezom o naturze selektywnej toksyczności AmB i jej pochodnych.
- nietoksyczne pochodne AmB działają w oparciu o nowy mechanizm selektywnej toksyczności, w którym kluczowe znaczenie odgrywają różnice w zdolności do tworzenia letalnych kanałów błonowych niezależne od zdolności do kompleksowania się ze sterolami w komórkach zawierających ergo- i cholesterol.

7. Literatura

1. **White T.C., Marr K.A., Bowden R.A.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:382-402
2. **Haynes K.** 2001. Virulence in *Candida* species. *Trend. Microbiol.* **9**(12):591-595
3. **Prasad R., Panwar S.L., Smriti M.** 2002. Drug resistance in Yeasts-an emerging scenario. *Adv. Microb. Phys.* **46**:155-200
4. **Borowski E.** 2000. Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity. *II Farmaco* **55**: 206-208
5. **Prasad R., Gupta N., Gaur M.** Molecular basis of antifungal resistance. Calderone RA, Sans-Blas G, eds. *Pathogenic Fungi: Cellular and Molecular* Horizon Scientific Press, USA; 2004, pp 357-414
6. **Prasad R., Panwar S.L., Krishnamurthy S.** Drug resistance mechanisms of human pathogenic fungi. Calderone RA, Cihlar RL, eds. *Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications*. New York: Marcel Dekker; 2000; pp 601-631
7. **Prasad R., Kapoor K.** 2005. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol.* **242**: 215-48
8. **Carrillo-Munoz A.J., Giusiano G., Ezkurra P.A., Quindos G.** 2006. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioterap.* **19**(2):130-139
9. **Odds F.C., Brown A.J.P., Gow N.A.R.** 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**(6):272-279
10. **Kontoyiannis D.P., Lewis R. E.** 2002. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet.* **359**:1135-44
11. **DiDomenico B.** 1999. Novel antifungal drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:509-515
12. **Sanglard D.** 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:379-385
13. **Sanglard, D., Bille J.** Current understanding of the modes of action and resistance mechanisms to conventional and emerging antifungal agents for treatment of *Candida* infections. In: *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington, D.C., USA, 2002; pp 349-383
14. **Proia L.A.** 2006. New antifungal therapies. *Clin. Microbiol. Newslett.* **28**(22):169-173
15. **Petit C., Yardley V., Gaboriau F., Bolard J., Croft S.L.** 1999. Activity of heat-induced reformulation of amphotericin B deoxycholate (Fungizone) against *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 390-392
16. **Paredes R., Munoz J., Diaz P., Domingo P., Gurgui M., Clodet B.** 2003. Leishmaniasis in HIV infections. *J. Postgrad. Med.* **49**:39-49
17. **Manage A., Nishida N., Milhavet O., McMahon H.E.M., Casanova D., Lehman S.** 2000. Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures. *J. Virol.* **74**: 3135-3140
18. **Hatabu T., Takada T., Taguchi N., Suzuki N., Sato K., Kano S.** 2005. Potent plasmodicidal activity of a heat-induced reformulation of deoxycholate-amphotericin B (Fungizone) against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 493-496
19. **Brajtburg J., Bolard J.** 1996. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin Microbiol. Rev.* **9**: 512-531
20. **Gallis H.A., Drew R.H., Pickard W.W.** 1990. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev. Infect. Dis.* **12**:308-329
21. **Bolard J., Harsel S.** 1996. Amphotericin B: new life for an old drug. *TiPS* **17**: 445-449
22. **Lemke A., Kiderlen A.F., Kayser O.** 2005. Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**:151-162
23. **Zotchev S.B.** 2003. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Curr. Med. Chem.* **10**: 211-223
24. **Legrand P., Cheron M., Leroy L., Bolard J.** 1997. Release of amphotericin B from delivery systems and its action against fungal and mammalian cells. *J. Drug Targeting* **4**:311-319
25. **Bekersky I., Fielding R.M., Buell D., Lawrence I.** 1999. Lipid – based amphotericin B formulations: from animals to man. *PSTT* **2**(6): 230-236
26. **Barwicz J., Christian S., Gruda I.** 1992. Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**(10): 2310-2315
27. **Wong-Beringer A., Jacobs R.A., Guglialmo B.J.** 1998. Lipid formulations of amphotericin B: Clinical efficacy and toxicities. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 603-619
28. **Otsubo T., Maesaki S., Hossain M.A.** 1999. *In vitro* and *in vivo* activities of NS-718, a new nanosphere incorporating amphotericin B, against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:471-475

29. Espuelas M.S., Lagrand P., Campanero M.A. 2003. Polymeric carriers for amphotericin B: *In vitro* activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**: 419-427
30. Kayser O., Olbrich C., Yardley V., Kiderlen A.Q.F., Croft S.L. 2003. Formulation of amphotericin B as a nanosuspension for oral administration. *Int. J. Pharm.* **254**:73-75
31. Müller R.H., Jacobs C., Kayser O. 2001. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**:3-19
32. Zarif L., Graybill J., Perlin D., Mannino R. 2000. Cochelates: new lipid-based drug delivery system. *J. Liposomes Res.* **10**(4):523-538
33. Zarif L., Graybill J.R., Perlin D., Najvar L., Bocanegra R., Mannico R.J. 2000. Antifungal activity of amphotericin B cochelates against *Candida albicans* infection in mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**(6):1463-1439
34. Santangelo R., Paderu P., Delmas G, Chen Z.W., Mannico R., Zafir L. Perlin D.S. 2000. Efficacy of oral cochelate-amphotericin B in mouse model of systemic candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2356-2360
35. Falk R., Domb A.J., Polacheck I. 1999. A novel injectable water-soluble amphotericin B-arabinogalactan conjugate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1975-1981
36. Ehrenfreund-Kleinman T., Azzam T., Falk R., Polacheck I., Golenser J. Domb A.J. 2002. Synthesis and characterization of novel water soluble amphotericin B-arabinogalactan conjugates. *Biomaterials* **23**:1327-1335
37. Ehrenfreund-Kleinman T., Golenser J., Domb A.J. 2004. Conjugation of amino-containing drugs to polysaccharides by tosylation: amphotericin B arabinogalactan conjugates. *Biomaterials* **25**:3049-3057
38. Mazerski J., Grzybowska J., Borowski E. 1990. Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media. *Eur. Biophys. J.* **18**:159-164
39. Grzybowska J., Sowiński P., Gumieniak J., Zieniawa T., Borowski E. 1997. N-Methyl-N-D-fructopyranosylamphotericin B methyl ester, new amphotericin B derivative of low toxicity. *J. Antibiot.* **50**: 709-711
40. Borowski E., Grzybowska J., Bontemps-Gracz M., Ślisz M., Zieniawa T. Zawadzone przestrzenie, amfoteryczne, N-aminoacylowe pochodne amfoterycyny B, sposób ich otrzymywania i zastosowanie do zwalczania drobnoustrojów grzybowych. Zgłoszenie patentowe P 379979, 2006.06.19
41. Cybulska B., Gadomska I., Mazerski J., J. Grzybowska, E. Borowski, M. Cheron, Bolard J. 2000. N-methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester (MFAME), a novel antifungal agent of low toxicity: monomer/micelle control over selective toxicity. *Acta Biochim. Polon.* **47**:121-131
42. Szlinder-Richert J., Mazerski J., Cybulska B., Grzybowska J., Borowski E. 2001. MF-AME, N-methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester, a new amphotericin B derivative of low toxicity: relationship between self-association and effects on red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1528**:15-24
43. Szlinder-Richert J., Cybulska B., Bontemps-Gracz M.M., Grzybowska J., Borowski E. 2001. The interaction of amphotericin B (AmB) and its derivative of low toxicity, N-Methyl-N-D-fructosyl amphotericin B with cell membranes studied by the energy transfer method. 8th International Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy, Gdansk, Poland 5-9.09. Abstract Book. Abstr. No. 99, p. 169
44. Szlinder-Richert J., Mazerski J., Cybulska B., Grzybowska J., Borowski E. 2004. Interaction of amphotericin B and its low toxic derivative, N-methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester, with fungal, and mammalian cells measured by the energy transfer method. *Il Farmaco* **59**:289-296
45. Sanglard D., Ischer F., Mond M., Bille J. 1996. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2300-2305
46. Szlinder-Richert J., Cybulska B., Grzybowska J., Prasad R., Borowski E. 2000. Comparative studies on cell stimulatory, permeabilizing and toxic effects induced in sensitive and multidrug resistant fungal strains by amphotericin B (AMB) and N-methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester (MF-AME). *Acta Biochim. Polon.* **47**:133-140
47. Gottlieb D., Carter H.E., Slonecker J.H., Amann A. 1958. Protection of fungi against polyene antibiotics by sterols. *Science* **128**:361
48. Hamilton-Miller J.M. 1973. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. *Bacteriol. Rev.* **37**:166-196

49. **Hamilton-Miller J.M.** 1974. Fungal sterols and the mode of action of the polyene antibiotics. *Adv. Appl. Microbiol.* **17**:109-134
50. **Bolard J.** 1986. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties. *Biochim. Biophys. Acta* **864**: 257-304
51. **Brajtburg J., Medoff G., Kobayashi G., Elberg S.** 1980. Influence of extracellular K^+ or Mg^{+2} on the stages of the antifungal effects of amphotericin B and filipin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**: 593-597
52. **Borowski E., Cybulska B.** 1967. Potassium-less death of *Saccharomyces cerevisiae* cells treated with N-succinyl permicin and the reversal fungicidal action of the antibiotic by potassium ions. *Nature* **213**:1034
53. **Malewicz B., Borowski E.** 1979. Energy alterations by polyene macrolide antibiotics in *Chlorella vulgaris*. *Nature* **281**:80-82
54. **Malewicz B., Jenkin J.H., Borowski E.** 1981. Repair membrane alternation induced in baby hamster kidney cells by polyene antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**:238-247
55. **Brajtburg J., Elberg S., Medoff J., Kobayashi G.** 1981. Increase in colony forming units of *C. albicans* after treatment with polyene antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**:199-200
56. **Brajtburg J., Elberg S., Medoff J., Kobayashi G., Schlessinger D., Medoff G.** 1984. Stimulatory, permeabilizing, and toxic effect of amphotericin B on L cells. *Antimicrob. Agent Chemother.* **26**:892-897
57. **Bagiński M., Cybulska B., Gruszecki W.I.** Interaction of polyene macrolide antibiotics with lipid model membranes. In: *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*, I ed.; Leitmannova-Liu A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2006; pp 269-329
58. **Brajtburg J., Elberg S., Schwartz D. R., Vertut-Croquin A., Schlessinger D., Kobayashi G.S., Medoff G.** 1985. Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**(2): 172-176
59. **Surait R., Shepard M.G.** 1987. The effects of azole and polyene antifungals on the plasma membrane enzymes of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **25**:403-409
60. **Vertut-Doi A., Hannert P., Bolard J.** 1988. The polyene antibiotic amphotericin B inhibits the Na^+/K^+ pump of human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**:692-697
61. **Legrand P., Vertut-Doi A., Bolard J.** 1996. Comparative internalization and recycling of different amphotericin B formulations by macrophage-like cell line. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:519-533
62. **Vertut-Doi A., Ohnishi S., Bolard J.** 1994. The endocytic process in CHO cells, a toxic pathway of the polyene antibiotic amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2373-2379
63. **Brajtburg J., Elberg S., Bolard J., Kobayashi G.S., Levy R.A., Ostlund R.E., Schlessinger D., Medoff G.** 1984. Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B. *J. Infect. Dis.* **149**(6):986-997
64. **Bolard J., Vertut-Doi A.** Internalization of amphotericin B and other polyene antifungals: a possible origin of their toxicity. In *Drug transport in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*; Georgopadakou, N.H., Ed.; Marcel Dekker, New York, 1995; pp 307-326
65. **Koldin M.H., Kobayashi G.S., Brajtburg J., Medoff G.** 1985. Effects of evaluation of serum cholesterol and administration of amphotericin B complexed to lipoproteins on amphotericin B-induced toxicity in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**(1):1440-145
66. **Wasan K.M., Rosenblum M.G., Cheung L., Lopez-Berestein G.** 1994. Influence of lipoproteins on renal cytotoxicity and antifungal activity of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**(9):223-227
67. **Barwicz J., Gruda I., Tancrede P.** 2000. A kinetic study of the oxidation effects of amphotericin B on human low-density lipoproteins. *FEBS Lett.* **465**(1):83-86
68. **Ridente Y., Aubard J., Bolard J.** 1999. Absence in amphotericin B-spiked human plasma of the free monomeric drug, as detected by SERS. *FEBS Lett.* **446**:283-286
69. **Armawit P., Yu B.G., Lavasanifar A., Samuel J., Kwon G.S.** 2000. The effect of serum albumin on the aggregation state and toxicity of amphotericin B. *J. Pharm. Sci.* **89**:1589-1593
70. **Brezis M., Heyman S.N., Sugar A.M.** 1993. Reduced amphotericin B toxicity in an albumin vehicle. *J. Drug Target* **1**:185-189
71. **Hartsel S.C., Bauer E., Kwong E., Wasan K.M.** 2001. The effect of serum albumin on amphotericin B aggregate structure and activity. *Pharm. Res.* **18**(9):1305-1309
72. **De Kruijff B., Demel R.A.** 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complex. *Biochim. Biophys. Acta* **339**: 57-70

73. **Cohen B.E.** 1992. A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition. *Biochim. Biophys. Acta* **1108**: 49-58
74. **Cohen B.E.** 1998. Amphotericin B: toxicity and lethality. *Int. J. Pharmaceut.* **162**:95-106
75. **Hartsel S.C., Benz S.K., Peterson P.R., Whyte S.B.** 1991. Potassium selective amphotericin B channels are predominant in vesicles regardless of sidedness. *Biochemistry* **30**: 77-82
76. **Bolard J., Legrand P., Heitz F., Cybulska B.** 1991. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry* **30**: 5707-5715
77. **Kleinberg M.E., Finkelstein A.** 1984. Single-length and double-length channels formed by nystatin in lipid bilayers membranes. *J. Membrane Biol.* **80**:257-269
78. **Andreoli T.E.** 1973. On the anatomy of amphotericin cholesterol pores in lipid bilayer membranes. *Kidney Int.* **4**:337-345
79. **Marty A., Filkenstein A.** 1975. Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin. Differences in its one-sided and two-sided action. *J. Gen. Physiol.* **65**:515-526
80. **Borisova M.P., Brutyan R.A., Ermishkin L.N.** 1986. Mechanism of anion-cation selectivity of amphotericin B channels. *J. Membrane Biol.* **90**:13-20
81. **Hartsel S.C., Benz S.K., Ayenew W., Bolard J.** 1994. Na⁺, K⁺ and Cl⁻ selectivity of the permeability pathways induced through sterol-containing membrane vesicles by amphotericin B and other polyene antibiotics. *Eur. Biophys. J.* **23**:125-132
82. **Bagiński M., Resat H., Borowski E.** 2002. Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1567**:63-78
83. **Bagiński M., Resat H., McCammon J.A.** 1997. Molecular properties of amphotericin B membrane channel: A molecular dynamics simulations. *Mol. Pharmacol.* **52**:560-570
84. **Sternal K., Czub J., Bagiński M.** 2004. Molecular aspects of the drug interaction between amphotericin B and a phospholipid bilayer: molecular dynamics studies. *J. Mol. Model.* **10**: 223-232
85. **Saint Pierre Chazalet M., Thomas C., Dupeyrat M., Gary-Bobo C.M.** 1988. Amphotericin B-sterol complex formation and competition with egg phosphatidylcholine: a monolayer study. *Biochim. Biophys. Acta* **944**:477-486
86. **Seoane J.R., Vila Romeu N., Minnoes J., Conde O., Dynarowicz-Łątka P., Casas M.** 1997. The behavior of amphotericin B monolayers at the air/water interface. *Prog. Coll. Polym. Sci.* **105**:173-179
87. **Minnoes J., Carrera C., Dynarowicz-Łątka P., Conde O., Seoane R., Patino J.M.R.** 2001. Orientational changes of amphotericin B in Langmuir monolayers observed by Brewster angle microscopy. *Langmuir* **17**:1477-1482
88. **Gruszecki W.I., Gagoś M., Kernen P.** 2002. Polyene antibiotic amphotericin B in monomolecular layers: spectrophotometric and scanning force microscopic analysis. *FEBS Lett.* **524**:92-96
89. **Milhaud J., Ponsinet V., Takashi M., Michels B.** 2002. Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight, into them role of ergosterol. *Biochim. Biophys. Acta* **1558**:95-108
90. **Dufroc E.J., Smith J.C.P., Jarell H.D.** 1984. Amphotericin B and model membranes. The effect of amphotericin B on cholesterol-containing systems as viewed by ²H-NMR. *Biochim. Biophys. Acta* **776**:317-329
91. **Langlet J., Berges J., Caillet J., Demaret J.P.** 1994. Theoretical study of the complexation of amphotericin B with sterols. *Bioch. Biophys. Acta* **1191**:79-93
92. **Herve M., Debouzy J. C., Borowski E., Cybulska B., Gary-Bobo C.M.** 1989. The role of the carboxyl and amino groups of polyene macrolides in their interactions with sterols and their selective toxicity. A ³¹P-NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* **980**: 261-272
93. **Bagiński M., Tempczyk A., Borowski E.** 1989. Comparative conformational analysis of cholesterol and ergosterol by molecular mechanistics. *Eur. Biophys. J.* **17**:159-166
94. **Baran M., Mazerski J.** 2002. Molecular modeling of amphotericin B-ergosterol primary complex in water. *Biophys. Chem.* **95**(2):125-133
95. **Mazerski J., Borowski E.** 1998. Molecular modeling in the rational design of some antitumor and antifungal agents. *Task Quarterly* **2**: 511-550
96. **Hąc-Wydro K., Dynarowicz-Łątka P., Grzybowska J., Borowski E.** 2005. *N*-(1-piperidylpropionyl)amphotericin B methyl ester (PAME) - a new derivative of the antifungal antibiotic amphotericin B: Searching for the mechanism of its reduced toxicity. *J. Colloid. Interface Sci.* **287**: 476-484

97. **Hąc-Wydro K., Dynarowicz-Łątka P., Grzybowska J., Borowski E.** 2005. How does the *N*-acylation and esterification of amphotericin B molecule affect its interactions with cellular membrane components-the Langmuir monolayer study. *Colloid Surf. B* **46**:7-19
98. **Rinnert H., Thirion C., Dupont G., Lematre J.** 1997. Structural studies on aqueous and hydroalcoholic solutions of polyene antibiotic: amphotericin B. *Biopolymers* **16**: 2419-2427
99. **Bolard J., Seigneurt M., Boudet G.** 1980. Interaction between phospholipid bilayer membranes and the polyene antibiotic amphotericin B. *Biochim. Biophys. Acta* **599**:280-29
100. **Mazerski J., Bolard J., Borowski E.** 1982. Self-association of some polyene macrolide antibiotics in aqueous media. *Biochim. Biophys. Acta* **719**:11-17
101. **Legrand P., Romero E.A., Cohen B.E., Bolard J.** 1992. Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2518-2522
102. **Ernst C., Grange J., Rinnert H., Dupont G., Lematre J.** 1981. Structure of amphotericin B aggregates as revealed by UV and CD spectroscopies. *Biopolymers* **20**:1575-1588
103. **Strauss G., Kral F.** 1982. Borate complexes of amphotericin B: polymeric species and aggregates in aqueous solutions. *Biopolymers* **21**: 459-470
104. **Hemenger R.P., Kaplan T., Gray L.J.** 1983. Structure of amphotericin B aggregates based on calculations of optical spectra. *Biopolymers* **22**:911-918
105. **Mazerski J., Borowski E.** 1995. Molecular dynamics of amphotericin B. I. Single molecule in vacuum and water. *Biophys. Chem.* **54**:49-60
106. **Mazerski J., Borowski E.** 1996. Molecular dynamics of amphotericin B. II. Dimer in water. *Biochim. Biophys. Chem.* **57**:205-217
107. **Barwicz J., Gruszecki W.I., Gruda I.** 1993. Spontaneous organization of amphotericin B in aqueous medium. *J. Coll. Inter. Sci.* **158**:71-76
108. **Matsumori N., Yamji N., Matsuoka S., Oishi T., Murata T.M.** 2002. Amphotericin B covalent dimers forming sterol-dependent ion-permeable membrane channels. *J. Am. Chem. Soc.* **124** (16): 4180-4181
109. **Matsumori N., Masuda R., Murata M.** 2004. Amphotericin B covalent dimers bearing tartarate linkage. *Chem. Biodiver.* **1**: 346-352
110. **Grijalba M.T., Cheron M., Borowski E., Bolard J., Schreier S.** 2006. Modulation of polyene antibiotics self-association by ions from the Hofmeister series. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**: 973-979
111. **Collins K.D., Washabaugh M.W.** 1985. The Hofmeister effect and the behaviour of water interfaces. *Q. Rev. Biophys.* **18**: 323-422
112. **Cacace M.G., Landau E.M., Ramsden J.J.** 1997. Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q. Rev. Biophys.* **30**: 241-277
113. **Bostrom M., Williams D.R.M., Stewart P.R., Ninham B.W.** 2003. Hofmeister effects in membrane biology: the role of ionic dispersion potentials. *Phys Rev E* **68** Art. No. 041902
114. **Gurau M.C., Lim S., Castellana E.T., Albertorio F., S. Kataoka, Cremer P.S.** 2004. On the mechanism of the Hofmeister effect. *J. Am. Chem. Soc.* **126**:105222-10523
115. **Barwicz J., Tancrede P.** 1997. The effects of aggregation state of amphotericin B on its interaction with cholesterol- or ergosterol-containing phosphatidylcholine monolayers. *Chem. Phys. Lipids* **85**:145-155
116. **Yamashita K., Janout V., Bernard E., Armstrong D., Regan S.L.** 1995. Micelle/monomer control over the membrane-disrupting properties of amphiphilic antibiotic. *J. Am Chem. Soc.* **117**:6249-6253
117. **Mazerski J., Borowski E., Bolard J.** 1995. Effect of the modifications of ionizable groups of amphotericin B on its ability to form complexes with sterols in hydroalcoholic media. *Biochim. Biophys. Acta* **1236**:170-176
118. **Gruszecki W.I., Gagoś M., Herec M.** 2003. Dimers of polyene antibiotic amphotericin B detected by means of fluorescence spectroscopy: molecular organization in solution and in lipid membranes. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **69**: 49-57
119. **Gruszecki W.I., Herec M.** 2003. Dimers of polyene antibiotic amphotericin B. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **72**: 103-105
120. **Gruszecki W.I., Gagoś M., Herec M., Kern P.** 2003. Organization of antibiotic amphotericin B in lipid membranes. A mini review, *Cell. Mol. Biol. Lett.* **8**:161-170
121. **Bagiński M., Gariboldi P., Borowski E.** 1994. The role of amphotericin B group basicity in its antifungal action. A theoretical approach. *Biophys. Chem.* **49**(3):241-250.
122. **Cheron M., Cybulska B., Mazerski J., Grzybowska J., Czerwiński A., Borowski E.** 1988. Quantitative structure-activity relationships of amphotericin B derivatives. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 827-836

123. Falkowski L., Grzybowska J., Jarzębski A., Stefańska B., Bylec E., Borowski E. 1980. The synthesis of amide of polyene macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* **33**:103-104
124. Jarzębski A., Falkowski L., Borowski E. 1982. Synthesis and structure - activity relationships of amides of amphotericin B. *J. Antibiot.* **35**:220-229
125. Czerwiński A., Grzybowska J., Borowski E. 1986. N-dimethylaminoacyl derivatives of polyene macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* **39**(7):1025-1027
126. Grzybowska J., Czerwiński A., Borowski E. 1987. Patent Polski Nr 138831
127. Borowski E., Grzybowska J., Sowiński P., Gumieniak J., Czerwiński A. 2000. Patent Polski Nr 180253
128. Wright J.J.K., Albarella J.A., Krepski L.R., Loeberberg D. 1982. N-aminoacyl derivatives of polyene macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* **35**:911-914
129. Massa T., Sinha D.P., Frantz J.D., Filipek M.E., Weglein R.C., Steinberg S.A., McGrath J.T., Murphy B.F., Szot R.J., Black H.E. 1985. Subchronic toxicity studies of N-ornithyl amphotericin B methyl ester in dogs and rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **5**(4):737-753
130. Hoepflich P.D. 1992. Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique and fact. *Clin. Infect. Dis.* **14**:114-119
131. Ślisz M., Cybulska B., Mazerski J., Grzybowska J., Borowski E. 2004. Studies of the effects of antifungal cationic derivatives of amphotericin B on human erythrocytes. *J. Antibiot.* **57**(10): 669-678
132. Czub J., Borowski E., Bagiński M. 2007. Interactions of amphotericin B derivatives with lipid membranes - a molecular dynamics study. *pub przyjęta do druku w Biochim. Biophys. Acta*
133. Czub J., Bagiński M. 2006. Comparative molecular dynamics study of lipid membranes containing cholesterol and ergosterol. *Biophys. J.* **90**:2368-2382
134. Matsumori N., Sawada Y., Murata M. 2005. Mycosamine orientation of amphotericin B controlling interaction with ergosterol: sterol-dependent activity of conformation restricted derivatives with amino-carbonyl bridge. *J. Chem. Soc.* **127**:10667-10675
135. Paquet V., Zumbuehl A., Carreira E.M. 2006. Biologically active amphotericin B-calix[4]arene conjugates. *Bioconjugate Chem.* **17**:1460-1463
136. Matsumori N., Masuda R., Murata M. 2004. Amphotericin B covalent dimers bearing a tartarate linkage. *Chem. Biodiver.* **1**:346-352
137. Yamaji N., Matsumori N., Matsuoka S., Oishi T., Murata M. 2002. Amphotericin B dimers with bisamide linkage bearing powerful membrane-permeabilizing activity. *Org. Lett.* **4**(12):2087-2089
138. Umegawa Y., Nobuaki M., Oishi T., Murata M. 2007. Amphotericin B covalent dimers with carbonyl-amino linkage: a new probe for investigating ion channel assemblies. *Tetrahedron Lett.* **48**:3393-3396
139. Paquet V., Carreira E.M. 2006. Significant improvement of antifungal activity of polyene macrolides by bisalkylation of the mycosamine. *Org. Lett.* **8**(9):1807-1809
140. Ghannoum M. 1999. Antifungal Agents: Mode of action, mechanism of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**(4):501-517
141. Balkis M.M., Leidich S.D., Mukherjee P.K., Ghannoum M. 2002. Mechanisms of fungal resistance. *Drugs* **62**(7):1025-1040
142. Ellis D. 2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, Suppl. S1, 7-10
143. Joseph-Horne T., Hollomon D., Loeffler T., Kelly S.L. 1995. Cross-resistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1526-1529
144. Kelly S.L., Lamb D.C., Taylor M., Corran A.J., Baldwin B.C., Powderly W.G. 1994. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol delta 8-->7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from AIDS patient. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**: 39-42
145. Kelly S.L., Lamb D.C., Kelly D.E., Manning N.J., Loeffler J., Hebart H., Schumacher U., Einsele H. 1997. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol $\Delta^{5,6}$ - desaturation. *FEBS Lett* **400**: 80-82
146. Nolte F.S., Parkinson T., Falconer D.J., Dix S., Williams J., Gilmore C., Geller R., Wingard J.R. 1997. Isolation and characterization of fluconazole and amphotericin B resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:196-199
147. Henry K. W., Nickels J., Edlind T.D. 2000. Upregulation of *Erg* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**(10):2963-2700
148. Mukhopadhyay K., Prasad T., Saini P., Pucadyil T.J., Chattopadhyay A., Prasad R. 2004. Membrane sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1778-1787

149. **Pesti M., Campbell J.M., Peberdy J.F.** 1981. Alternation of ergosterol content and chitin synthase activity in *Candida albicans*. *Curr. Microbiol.* **5**:187-190
150. **Pesti M., Paku S., Novak E.K.** 1982. Some characteristics of nystatin resistant sterol mutants of *Candida albicans*. *Acta Microbiol. Hung.* **29**:55-66
151. **Pesti M., Horvath L., Vigh L., Farakas T.** 1985. Lipid content and ESR determination of plasma membrane order parameter in *Candida albicans* sterol mutants. *Acta Microbiol. Hung.* **32**:305-313
152. **Mishra P., Bolard J., Prasad R.** 1992. Emerging role of lipids of *Candida albicans*, a pathogenic dimorphic yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **1127**:1-14
153. **Gale E.F.** 1986. Nature and development of phenotypic resistance to amphotericin B in *Candida albicans*. *Adv. Microb. Physiol.* **27**:277-320
154. **Seo K., Akiyoshi H., Ohnishi Y.** 1999. Alteration of cell wall composition leads to amphotericin B resistance in *Aspergillus flavus*. *Microbiol. Immunol.* **43**:1017-1025
155. **Bahmed K., Bonaly R., Coulon J.** 2003. Relation between cell wall chitin content and susceptibility to amphotericin B in *Kluyveromyces*, *Candida* and *Schizosaccharomyces species*. *Res. Microbiol.* **154**:215-222
156. **Prasad T., Saini P., Gaur N.A., Vishwakarma R.A., Khan L.A., Haq Q.M.** 2005. Functional analysis of CalPT1, a sphingolipid biosynthetic gene involved in multidrug resistance and morphogenesis in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3442-3452
157. **Higgins C.F.** 1992. ABC-transporters: from microorganism to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**:67-113
158. **Decottignies A., Grant A., M., Nichols J., W., De Wet H., Mc.Intosh, D.B., Goffeau A.** 1998. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yorp. *J. Biol. Chem.* **273**:12612-12622
159. **Łącka I., Wakieć R., Milewski S.** 2007. Modulatory oporności wielolekowej. *Postępy Biochemii (w przygotowaniu do druku)*
160. **Prasad R., Worgifosse P. D., Goffeau A., Balzi E.** 1995. Molecular cloning and characterization of novel gene of *C. albicans* *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr. Genet.* **27**:320-329
161. **Ambudukar S. V., Dey S., Hrycyna C.A., Ramachandran M., Pastan I., Gottesman M. M.** 1999. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**:361-398
162. **Dogra S., Krishnamurthy S., Gupta V., Dixit B. L., Sanglard D., Prasad R.** 1999. Asymmetric distribution of phosphatidylethanolamine in *C. albicans*: possible mediation by *CDR1*, a multidrug transporter belonging to ATP binding cassette (ABC) superfamily. *Yeast.* **15**:111-121
163. **Smriti, Krishnamurthy S., Dixit B.L., Gupta C.M., Milewski S., Prasad R.** 2002. ABC transporters Cdr1p, Cdr2p, Cdr3p of human pathogen *Candida albicans* are general phospholipid translocators. *Yeast* **19**: 303-318
164. **Jungwirth H., Kuchler H.K.** 2006. Yeast ABC transporters – A tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett.* **580**:1131-1138
165. **Prasad R., Panwar S.** 2004. Physiological functions of multidrug transporters in yeast. *Cur. Scien.* **86**: 62-73
166. **Saier M.H.J., Reizer J.** 1991. Families and super families of transport proteins common to prokaryotes and eukaryotes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**:362-368
167. **Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**:575-608
168. **Fling M.E., Kopf J., Tamarkin A., Gorman J.A., Smith H.A., Koltin Y.** 1991. Analysis of *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. *Mol. Gen Genet.* **227**:318-329
169. **Gupta V., Kohli A., Krishnamurthy S., Puri N., Prasad R.** 1998. Identification of polymorphic mutant alleles of *CaMDR1*, a major facilitator of *Candida albicans* which confers multidrug resistance, and its *in vitro* transcriptional activation. *Curr. Genet.* **34**:192-199
170. **Goldway M., Teff D., Schmidt R., Oppenheim A.B., Koltin Y.** 1995. Multidrug resistance in *Candida albicans*: disruption of the BEN^r gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:422-426
171. **Ben-Yaacov R., Knoller S., Caldwell A., Becker J.M., Koltin Y.** 1994. The *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. *Antimicrob. Agents Chmother.* **38**: 648-652
172. **Calabrese DC., Bille J., Sanglard D.** Characterization of FLU1, a novel multidrug efflux transporter gene from *C. albicans*. *ASM conference on Candida and Candidiasis* 1999;C56:63
173. **Bolhuis H., van Veen H.W., Pollman B., Driessen A.J., Konings W.N.** 1997. Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**(1): 55-84

174. Pajeva I.K., Globisch C., Weise M. 2004. Structure-function relationships of multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Med. Chem.* **47**:2523-2533
175. Golin J., Ambudkar S.V., Gottesman M.M., Habib A., Szczepanski J., Ziccardi W., May L. 2003. Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux. *J. Biol. Chem.* **278**: 5963-5969
176. Nakamura K., Niimi M., Niimi K.K., Holmes A.R., Yates J.E., Decottignies A., Monk B.C., Goffeau A., Cannon R.D. 2001. Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump CDR1p in *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3366-3374
177. Krishnamurthy S., Gupta V., Panwar S.L., Prasad R. 1998. Expression of *CDR1*, a multidrug resistance gene of *Candida albicans*: transcriptional activation by heat shock, drugs and human steroid hormones. *FEMS Microb. Lett.* **160**:191-197
178. Helmerhorst E.J., Reijnders I.M., van't Hoff W., Simoons-Smit I., Veerman E.C., Amerongen A.V. 1999. Amphotericin B and fluconazole resistant *Candida spp.*, *Aspergillus fumigatus*, and other newly emerging pathogenic fungi are susceptible to basic antifungal peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:702-704
179. Subik J., Ulaszewski S., Goffeau A. 1986. Genetic mapping of nuclear mucidin resistance mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **10**:665-670
180. Shukla S., Saini P., Smriti S.J., Ambudkar S.V., Prasad R. 2003. Functional characterization of *Candida albicans* ABC transporter Cdr1p. *Eukaryot. Cell* **2**:1361-1375
181. Falkowski L., Grzybowska J., Jarzębski A., Stefańska B., Bylec E., Borowski E. 1980. The synthesis of amide of polyene macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* **33**:103-104
182. Bolard J., Garcia C.H., Seksek O., Borowski E., Grzybowska J. 1999. **Polish Pat. Appl.** Pochodne makrolidu polienowego, zastosowanie do wektorowania cząsteczek. (Polyene macrolide derivatives, use for vectoring molecules). Nr P-343365
183. Ansari S., Gupta P., Mahanty S.K., Prasad R. 1993. The uptake of amino acids by *erg* mutants of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **3**:377-386
184. Franz, R., Ruhnke M., Morschhauser J. 1999. Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Mycoses* **42**:453-458
185. Leppert, G., Mc Devitt, R., Falco, S.C. 1990. Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance. *Genetics.* **125**:13-20
186. Kohli A., Gupta V., Krishnamurthy S., Hasnain S.E., Prasad R. 2001. Specificity of drug transport mediated by *CaMDR1*: a major facilitator of *Candida albicans*. *J. Biosci.* **26**:333-339
187. Panwar S.N., Krishnamurthy S., Gupta V., Alarco A.M., Raymond M., Sanglard D., Prasad R. 2001. *CaALK8*, an alkane assimilating cytochrome P450 confers multidrug resistance when expressed in hypersensitive strain of *Candida albicans*. *Yeast* **18**:1117-1129
188. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeast: proposed standards. Document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
189. Cuenca-Estrella M., Diaz-Guerra T.M., Mellado E., Rodriguez-Tudella J.L. 2001. Detection of resistance to amphotericin B in *Candida* Isolates by using iso-sensitest broth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**(7):2070-2074
190. Cuenca-Estrella M., Diaz-Guerra, Mellado, Rodriguez-Tudella J.L. 2001. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida spp.* *J. Clin. Microbiol.* **39**:525-532
191. Haynes M. P. Chong P.L. Buckley H. R., Pieringer R. A. 1996. Fluorescence studies on the molecular action of amphotericin B on susceptible and resistant fungal cells. *Biochemistry* **30**: 7983-7992
192. Maesaki S., Marichal P., Bossche H.V., Sanglard D., Kohno S. 1999. Rhodamine 6G efflux for detection of *CDR1*-overexpressing azole-resistant *Candida albicans* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:27-31
193. Szoka F., Paphadjopoulos D. 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**:4194-4198
194. Steward J.C.M. 1980. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrioxalate. *Anal. Biochem.* **104**(1):10-14
195. Sharaf M.A., Illman D.L., Kowalski B.R. *Chemometrics.* John Wiley&Sons, New York, 1986
196. Mazerski J. Miękkie modele chemometryczne w spektroskopii. Materiały zjazdowe. XLVII Zjazd PTChem i SITPChem. Wrocław, 12-17 września 2004, t.2 Sekcja Informatyka Chemiczna, W001, s.861

197. Ślisz M., Mazerski J. Agregacja amfoterycyny B i wybranych pochodnych – chemometryczna analiza widm UV-VIS. Systemy Informacyjne w Chemii, Rzeszów, Oficyna Wydaw. Politechniki Rzeszowskiej, 2006; t. 3, s. 179-184
198. Ojeda C.B., Rojas F.S. 2004. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta* **518**:1-24
199. Kramer R. Chemometric Techniques for Quantitative Analysis. Marcel Dekker, New York, 1998
200. Lee J.S., Paull K., Alvarez M., Hose C., Monks A., Grever M. *et al.* 1994. Rhodamine efflux patterns predict P-glycoprotein substrates in the National Cancer Institute drug screen. *Mol. Pharmacol.* **46**:627-38
201. Sowiński P., Kołodziejczyk P., Borowski E. 1985. The structure of amphotericin A. I. Mass spectrometric analysis of dodecahydroamphotericin A. *J. Antibiot.* **38**(2):169-174
202. Ganis P., Avitabile G., Mechlini W., Schaffner C.P. 1971. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **93**(18):4560-4564
203. Mechlini W., Schaffner C.P., Ganis P., Avitabile G. 1970. Structure and absolute configuration of the polyene macrolide antibiotic amphotericin B. *Tetrahedron Lett.* **44**:3873-3876
204. Sowiński P., Pawlak J.K., Borowski E., Iwashita T. 1985. The structure of amphotericin A. II. The complete structure of the antibiotic. *J. Antibiot.* **38**(2):175-180.
205. Sowiński P., Bieszczad T., Pawlak J., Borowski E. 1996. Stereostructure of amphotericin A. *49*(12):1232-1235
206. Schaffner C., Kientzler D. Process for the production of amphotericin B inhibiting production of amphotericin A. U.S. Pat. 6, 132, 993 dated Oct. 17, 2000
207. de Juan A., Casassas E., Tauler R. Soft modelling of analytical data. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications. New York, Wiley & Sons, 2000
208. Tauler R., Smilde A. K., Kowalski B.R. 1995. Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *J. Chemom* **9**:31-58
209. Tauler R. 1995. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **30**:133-146
210. Romanini D., Mulle G., Pico G. 2002. Use of amphotericin B as optical probe to study conformational changes and thermodynamic stability in human serum albumin. *J. Protein Chem.* **21**(8):505-514
211. Barwicz J., Gareau R., Audet A., Morisset A., Villiard J., Gruda I. 1991. Inhibition of the interaction between lipoproteins and amphotericin B by some delivery systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**(2):722-728
212. Armawit P., Gnu Yu B., Lavasanifar A., Samuel J., Kwon G.S. 2000. The effect of serum albumin on the aggregation state and toxicity of amphotericin B. *J. Pharm. Sci.* **89**:1589-1593
213. Ridente Y., Aubard J., Bolard J. 1999. Absence in amphotericin B-spiked human plasma of the free monomeric drug, as detected by SERS. *FEBS Lett.* **446**:283-286
214. Klimov A.N., Nikiforova A.A. 1973. Interaction of polyene antibiotics and serum lipoproteins. *Experientia* **29**:663-663
215. Klimov A.N., Nikiforova A.A., Tchistiakova A.M. 1975. Inhibition of cholesterol esterification by polyene antibiotics in blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta* **380**:76-80
216. Kunemund A., Hofer M. 1983. Passive fluxes of K⁺ and H⁺ in wild strain and nystatin-resistant mutant of *Rhodotorula gracilis* (ATCC 26194). *Biochim. Biophys. Acta.* **735**: 203-210
217. Hauer R., Uhleman G., Neuman J., Hofer M. 1981. Proton pumps of the plasmalemma of the yeast *Rhodotorula gracilis*. Their coupling to fluxes of potassium and other ions. *Biochim. Biophys. Acta.* **649**: 680-690
218. Ślisz M., Cybulska B., Grzybowska J., Prasad R., Borowski E. 2007. Susceptibilities of ergosterol-deficient mutants to AmB and its derivatives of varied selective toxicity. *Acta Biochim. Polon.* (wysłana do druku)
219. Tolume H., Seman M., Bolard J. 1989. Interaction of amphotericin B and its N-fructosyl derivative with murine thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **982**: 245-252
220. Joly V., Bolard J., Yeni P. 1992. *In vitro* models for studying toxicity of antifungal agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **36**: 1799-1804
221. Szponarski W., Wietzerbin J., Borowski E., Gary-Bobo C.M. 1988. Interaction of ¹⁴C-labelled amphotericin B with human erythrocytes: relation between binding and K⁺ leak. *Biochim. Biophys. Acta* **938**:97-106
222. O'Keefe J., Kavangh K. 2004. Adriamycin alters the expression of drug efflux pumps and confers amphotericin B tolerance in *Candida albicans*. *Anticancer Research* **24**:405-408

223. Ślisz M., Cybulska B., Grzybowska J., Czub J., Prasad R., Borowski E. 2007. The mechanism of overcoming multidrug resistance (MDR) of fungi by amphotericin B and its derivatives. *J. Antibiot.* **60**(7):436-447
224. Herve M., Cybulska B., Gary-Bobo C.M. 1985. Cation permeability induced by valinomycin, gramicidin and amphotericin B in large lipidic unilamellar vesicles studied by ^{31}P -NMR. *Eur. Biophys. J.* **12**:121-128
225. Bolard J., Seigneuret M., Boudet G. 1980. Interaction between phospholipid bilayer membranes and the polyene antibiotic amphotericin B: lipid state and cholesterol content dependence. *Biochim. Biophys. Acta* **599**:280-293
226. Boduet G., Bolard J. 1979. Interaction of the polyene amphotericin B with phospholipid bilayer membranes: a circular dichroism study. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **88**(3):98-1002
227. Brezis M., Heyman S.N., Sugar A.M. 1993. Reduced amphotericin B toxicity in an albumin vehicle. *J. Drug Target* **1**:185-189
228. Wasan K., Brazeau G.A., Keyhani A., Hayman A.C., Lopez-Berestein G. 1993. Roles of liposome composition and temperature in distribution of amphotericin B in serum lipoproteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:246-250
229. Tanford C. 1980. In: *The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes*. New York; John Wiley & Sons
230. Bhmara R., Saad A., Bolesak L.E., Janoff A.S., Swenson C.H. 1997. Behaviour of amphotericin B lipid complex *in vitro* and in circulation of rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:886-892
231. Sawaya B.P., Weihprecht H., Campbell W.R., Lorenz J.N., Webb R.C., Briggs J.P., Schnermann J. 1991. Direct vasoconstriction as a possible cause for amphotericin B-induced nephrotoxicity in rats. *J. Clin. Invest.* **87**:2097-2107

Wyniki przedstawionych w niniejszej rozprawie badań zostały wykorzystane w:

publikacjach:

- **Ślisz M.**, Cybulska B., Mazerski J., Grzybowska J., Borowski E. 2004. Studies of the effects of antifungal cationic derivatives of amphotericin B on human erythrocytes. *J. Antibiot.* 57(10):669-678
- **Ślisz M.**, Cybulska B., Grzybowska J., Czub J., Prasad R., Borowski E. 2007. The mechanism of overcoming multidrug resistance (MDR) of fungi by amphotericin B and its derivatives. *J. Antibiot.* 60(7):436-447
- **Ślisz M.**, Cybulska B., Grzybowska J., Prasad R., Borowski E. 2007. Susceptibilities of ergosterol-deficient mutants to AmB and its derivatives of varied selective toxicity. *Acta Biochim. Polon.* (wysłana do druku)

doniesieniach kongresowych:

- **Ślisz M.**, Cybulska B., Grzybowska J., Mazerski J., Prasad R., Borowski E.: Amphotericin B derivatives: novel strategy for the development of nontoxic, broad spectrum, fungicidal and overcoming multidrug resistance antifungal drugs. 10th Congress of the European Confederation of Medicinal Mycology, Wrocław, 17-20 June, 2004, Abstracts book p. 45
- **Ślisz M.**, Cybulska B., Grzybowska J., Mazerski J., Prasad R., Borowski E.: Amphotericin B and its derivatives: action on fungal strains containing multidrug transporters. 23rd Small Meeting On Yeast Transport&Energetics (SMYTE), New Delhi, 23-26 September 2005, Abstracts book p. 27
- **Ślisz M.**, Mazerski J.: Self-association of amphotericin B and its derivatives studied by chemometrics analysis of UV-Vis spectra. III Conference on Information Systems in Chemistry SIC'2005, Rzeszów, 20-22 October 2005, Abstracts book p. 35
- **Ślisz M.**, Mazerski J.: Chemometrics analysis of UV-Vis spectra of associated forms of amphotericin B and its derivatives. III Conference "Chemometrics - methods and applications", Zakopane, 19-22 October 2006, Abstracts book p. 61
- **Ślisz M.**, Cybulska B., Grzybowska J., Czub J., Prasad R., Borowski E.: Amphotericin B and its nontoxic derivative - MFAME overcome MDR of fungi by not being substrates of efflux pumps. 6th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, Istanbul, 8-11 July, 2007, Abstracts book p. 116

monografiach pokonferencyjnych:

- **Ślisz M.**, Mazerski J.: Agregacja AmB i wybranych pochodnych – chemometryczna analiza widm UV-Vis. 3 Systemy Informacyjne w Chemii, Rzeszów 2006, 180-184
- **Ślisz M.**, Mazerski J.: Chemometrics analysis of UV-Vis spectra of associated forms of amphotericin B and its derivatives. Chemometrics - Methods and Applications, Kraków 2006, 307-312

zgłoszeniu patentowym:

- Borowski E., Grzybowska J., Bontemps-Gracz M., **Ślisz M.**, Zieniawa T. Zawadzone przestrzenie, amfoteryczne, *N*-aminoacylowe pochodne amfoterycyny B, sposób ich otrzymywania i zastosowanie do zwalczania drobnoustrojów grzybowych. Zgłoszenie patentowe P 379979, 2006

projekcie badawczym promotorskim KBN :

- **Ślisz M.**, Mazerski J. Wpływ modyfikacji chemicznych antybiotyku przeciwgrzybowego amfoterycyny B na stopień agregacji i strukturę powstających agregatów. N 204 103 32/2987, 2007

