

Imię i nazwisko autora rozprawy: Dorota Martynow

Dyscyplina naukowa: Nauki chemiczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Aktywność biologiczna koniugatów nanonośników molekularnych z inhibitorami enzymatycznymi

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Biological activity of molecular nanocarrier conjugates with enzymatic inhibitors

Promotor	Drugi promotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski	
Promotor pomocniczy	Kopromotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>

Gdańsk, rok 2020



OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: Dorota Martynow

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę/nie wyrażam zgody* na bezpłatne korzystanie z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

Aktywność biologiczna koniugatów nanoosiłników molekularnych z inhibitorami enzymatycznymi do celów naukowych lub dydaktycznych.¹

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

Świadomy(a) odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. z 2006 r., nr 90, poz. 631) i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2012 r., poz. 572 z późn. zm.),² a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem prof. dr hab. inż. Sławomirem Milewskim.

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami zgodnie z art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych.

Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę/nie wyrażam zgody* na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej, Pomorskiej Bibliotece Cyfrowej oraz poddawania jej procesom weryfikacji i ochrony przed przywłaszczeniem jej autorstwa.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

*) niepotrzebne skreślić

¹ Zarządzenie Rektora Politechniki Gdańskiej nr 34/2009 z 9 listopada 2009 r., załącznik nr 8 do instrukcji archiwalnej PG.

² Ustawa z dnia 27 lipca 2005 r. Prawo o szkolnictwie wyższym: Rozdział 7 Odpowiedzialność dyscyplinarna doktorantów, Art. 226.





OPIS ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Autor rozprawy doktorskiej: Dorota Martynow

Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim: Aktywność biologiczna koniugatów nanonośników molekularnych z inhibitorami enzymatycznymi

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Biological activity of molecular nanocarrier conjugates with enzymatic inhibitors

Język rozprawy doktorskiej: polski

Promotor rozprawy doktorskiej: prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski

Data obrony:

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim: nośniki leków, parasole molekularne, peptydy penetrujące, inhibitory enzymatyczne, ciprofloksacyna

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim: drug carriers, molecular umbrellas, cell penetrating peptides, enzymatic inhibitors, ciprofloxacin

Streszczenie rozprawy w języku polskim:

Przedmiotem badań były cztery grupy koniugatów nanonośników molekularnych z inhibitorami enzymatycznymi o potencjalnym działaniu przeciwgrzybowym. Pierwszą z tych grup tworzyły koniugaty peptydów penetrujących z inhibitorem gyrazy ciprofloksacyną lub z cząsteczką kwasu N³-(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (FMDP), inhibitorem syntazy GlcN-6-P. W dwóch kolejnych grupach, cząsteczki FMDP oraz cispentacyny, inhibitora syntetazy Ile-tRNA^{lle} połączone były z nanonośnikami lipidowymi lub tzw. parasolami molekularnymi. W niektórych z tych koniugatów występował „jako dodatkowy składnik mający zapewnić efektywne uwalnianie inhibitora, tzw. „trimethyl lock”. Ponadto, zbadano także wpływ skoniugowania parasoli molekularnych z antybiotykami przeciwgrzybowymi z grupy makrolidów polienowych na ich selektywną toksyczność *in vitro* w układzie komórki grzybowe: komórki ssacze.

Wykonano szereg badań dotyczących nośników związków aktywnych o działaniu przeciwgrzybowym. Wykazano, że ich modyfikacja za pomocą nośników może doprowadzić do polepszenia aktywności przeciwgrzybowej, polepszenia zdolności transportowych oraz zmniejszenia właściwości hemolitycznych i cytotoksycznych. Wykonane badania mogą służyć jako silne podstawy do zaprojektowania skutecznego i nietoksycznego układu nośnik-lek o działaniu przeciwgrzybowym.

Streszczenie rozprawy w języku angielskim:

The purpose of this thesis is to describe research of four groups of molecular nanocarrier conjugates with enzymatic inhibitors with potential anti-fungal activity. The first group of compounds was penetrating peptides (CPPs) conjugates with a gyrase inhibitor known as ciprofloxacin or with a N³-(4-methoxyfumaryl)-L-2,3 diaminopropanoic acid (FMDP) molecules, which is GlcN-6-P synthase inhibitor. In two other groups, FMDP molecules and cispentacin, Ile-tRNA^{lle} synthase inhibitor were connected to lipid nanocarriers or molecular umbrellas. In some of these conjugates, there was “trimethyl lock”, which ensured effective release of the inhibitor from the conjugate. Furthermore, the effect of conjugation of molecular umbrellas with polyene macrolide antibiotics on their selective *in vitro* toxicity in the fungal cells: mammalian cells system was also investigated.





In summary, a number of studies were carried out on carriers of anti-fungal compounds. It has been shown that their modification with the attached carrier can lead to the improvement of anti-fungal activity, the improvement of transporting capacity as well as the decrease of hemolytic and cytotoxic properties. The performed experiments can serve as a strong basis for designing an effective and non-toxic anti-fungal carrier-drug system.

*) niepotrzebne skreślić.

Dziękuję Promotorowi

Profesorowi dr hab. inż. Sławomirowi Milewskiemu

*Za wsparcie merytoryczne, poświęcony czas
oraz cenne rady.*

*Chciałabym z całego serca podziękować mojej Rodzinie,
szczególnie mężowi i mamie, którzy nieugięcie wspierali
mnie w trudnych chwilach, mobilizowali do dalszej pracy
oraz byli cierpliwi i wyrozumiali.*

STRESZCZENIE

W związku z narastającym problemem oporności patogennych drobnoustrojów na istniejące antybiotyki i leki syntetyczne poszukuje się nowych związków przeciwgrzybowych i przeciwbakteryjnych, które byłyby jednocześnie skuteczne i nie powodowałyby niepożądanych skutków ubocznych. Jednym z rozwiązań może być zastosowanie koniugatów inhibitorów enzymatycznych z nanonośnikami molekularnymi. Zadaniem nanonośników jest przetransportowanie inhibitora enzymatycznego do wnętrza komórki drobnoustroju. Wewnątrz komórki, taki koniugat powinien ulegać rozkładowi, z uwolnieniem inhibitora, który w wyniku oddziaływania z wewnątrzkomórkowym celem molekularnym powoduje zahamowanie wzrostu lub zabicie komórek drobnoustrojowych.

Przedmiotem badań, których wyniki opisano w niniejszej rozprawie, były cztery grupy koniugatów nanonośników molekularnych z inhibitorami enzymatycznymi o potencjalnym działaniu przeciwgrzybowym. Pierwszą z tych grup tworzyły koniugaty peptydów penetrujących z inhibitorem gyrazy ciprofloksacyną lub z cząsteczką kwasu N³-(4-metoksyfumaroylo)-L-2,3-diaminopropanowego (FMDP), inhibitorem syntazy GlcN-6-P. W dwóch kolejnych grupach, cząsteczki FMDP oraz cispentacyny, inhibitora syntetazy Ile-tRNA^{lle}, połączone były z nanonośnikami lipidowymi lub tzw. parasolami molekularnymi. W niektórych z tych koniugatów występował, jako dodatkowy składnik mający zapewnić efektywne uwalnianie inhibitora, tzw. „trimethyl lock”. Ponadto, zbadano także wpływ skoniugowania parasoli molekularnych z antybiotykami przeciwgrzybowymi z grupy makrolidów polienowych na ich selektywną toksyczność *in vitro* w układzie komórki grzybowe: komórki ssacze.

Badania dotyczące koniugatów pierwszej z powyżej wymienionych grup miały za zadanie sprawdzenie, czy dołączenie peptydu penetrującego TP10 do znanego chemoterapeutyku przeciwbakteryjnego – ciprofloksacyny (CIP) lub FMDP, spowoduje istotne zwiększenie aktywności przeciwgrzybowej. Wyniki tych badań wykazały, że aktywność przeciwgrzybowa *in vitro* koniugatów CIP:TP10 jest znacząco wyższa niż aktywność CIP. Koniugat CIP:TP10 wnika do wnętrza komórek grzybowych dużo efektywniej niż sama CIP. Dodatkowo, okazało się, że zarówno TP10 jak i jego koniugaty są w stanie blokować relaksację DNA za pośrednictwem topoiomerazy II w komórkach grzybowych. Tym niemniej, zarówno TP10 jak i jego koniugaty z CIP powodują niepożądany efekt cytotoksyczny wobec trzech linii komórek ssaczych.

W przypadku koniugatów z FMDP wykazano, że dołączenie do cząsteczki inhibitora peptydu penetrującego TP10 znacząco zwiększa jego aktywność przeciwgrzybową.

Drugą grupą badanych związków były koniugaty parasoli molekularnych z dołączonym FMDP lub cispentacyną. W tym przypadku celem było dostarczenie cząsteczki aktywnej do wnętrza komórki grzybowej. Przeprowadzone badania wykazały, że jedynie niektóre ze zbadanych koniugatów przejawiają aktywność przeciwgrzybową, natomiast zdecydowana większość okazała się nieaktywna. Z obserwacji mikroskopowych można było wywnioskować, że badane związki nie wnikają efektywnie do wnętrza komórek grzybowych. Analiza przy pomocy HPLC oraz spektrometrii mas wykazała, że niektóre z koniugatów, głównie te, które w swojej strukturze zawierają łącznik typu TML, ulegają

hydrolizie enzymatycznej zarówno pod wpływem modelowego enzymu esterazy jak i w ekstrakcie bezkomórkowym *Candida albicans*. Tym niemniej, wyniki badań nad wpływem dodatku N-acetylo-D-glukozaminy na aktywność przeciwgrzybową koniugatów parasoli z FMDP wskazują, że aktywność ta może nie być konsekwencją obecności FMDP w tym koniugacie.

Trzecią grupą związków badanych w tej pracy były koniugaty o charakterze lipidowym, które zawierały w swojej strukturze FMDP lub cispentacynę dołączone poprzez TML. Obserwacje mikroskopowe działania fluorogennych koniugatów tego typu na komórki grzybowe potwierdziły ich wnikanie do tych komórek, jednakże z możliwością akumulacji w błonie cytoplazmatycznej. Niektóre z przebadanych koniugatów wykazują właściwości przeciwgrzybowe oraz są hydrolizowane przez enzymy obecne w ekstrakcie bezkomórkowym z *Candida albicans*, jednakże nie jest pewne, czy ich działanie wynika z obecności FMDP lub cis-pentacyny.

Wykonano także badania dotyczące koniugatów parasoli molekularnych oraz makrolidowych antybiotyków polienowych – amfoterycyny B lub nystatyny, połączonych za pośrednictwem łączników o różnej długości. W tym przypadku skoniugowanie z parasolem molekularnym miało na celu zapobiegnięcie agregacji cząsteczek antybiotyków, co potencjalnie mogło mieć wpływ na ich cytotoksyczność względem komórek ssaczych. Zbadano aktywność przeciwgrzybową koniugatów, określono krytyczne stężenie agregacji wybranych koniugatów, powinowactwo do ergosterolu oraz właściwości hemolityczne i cytotoksyczne względem trzech linii komórkowych. Okazało się, że część koniugatów wykazuje właściwości przeciwgrzybowe podobne do natywnych antybiotyków, a ich krytyczne stężenie agregacyjne jest wyższe od takich stężeń dla amfoterycyny B i nystatyny. Skoniugowanie z parasolem molekularnym miało pozytywny wpływ na selektywną toksyczność amfoterycyny B, natomiast koniugaty parasoli z nystatyną wykazywały zdecydowanie gorszą selektywną toksyczność od natywnego antybiotyku.

Podsumowując, wykonano szereg badań dotyczących nośników związków aktywnych o działaniu przeciwgrzybowym. Wykazano, że ich modyfikacja za pomocą nośników może doprowadzić do polepszenia aktywności przeciwgrzybowej, polepszenia zdolności transportowych oraz zmniejszenia właściwości hemolitycznych i cytotoksycznych. Wykonane badania mogą służyć jako silne podstawy do zaprojektowania skutecznego i nietoksycznego układu nośnik-lek o działaniu przeciwgrzybowym.

Słowa kluczowe: nośniki leków, parasole molekularne, peptydy penetrujące, inhibitory enzymatyczne, ciprofloksacyna

Dziedzina nauki i techniki, zgodnie z wymogami OECD: Nauki ścisłe i przyrodnicze – nauki chemiczne

ABSTRACT

Due to the growing problem of resistance of pathogenic microorganisms to existing antibiotics and synthetic drugs, new anti-fungal and anti-bacterial compounds are being sought, which would be both effective and would not cause undesirable side effects. One of the solutions for this issue may be the use of conjugates of enzymatic inhibitors with molecular nanocarriers. The role of nanocarriers is to transport the enzyme inhibitor into the microbial cell. Inside the cell, the conjugate should degrade, releasing an inhibitor that inhibits the growth or killing of microbial cells as a result of interaction with the intracellular molecular target.

The purpose of this thesis is to describe research of four groups of molecular nanocarrier conjugates with enzymatic inhibitors with potential anti-fungal activity. The first group of compounds was penetrating peptides (CPPs) conjugates with a gyrase inhibitor known as ciprofloxacin or with N³-(4-methoxyfumaryl)-L-2,3 diaminopropanoic acid (FMDP) molecules, which is GlcN-6-P synthase inhibitor. In two other groups, FMDP molecules and cispentacin, Ile-tRNA^{Ile} synthase inhibitor were connected to lipid nanocarriers or molecular umbrellas. In some of these conjugates, there was "trimethyl lock", which ensured effective release of the inhibitor from the conjugate. Furthermore, the effect of conjugation of molecular umbrellas with polyene macrolide antibiotics on their selective *in vitro* toxicity in the fungal cells: mammalian cells system was also investigated.

Studies on penetrating peptides with ciprofloxacin and FMDP were conducted to find out whether the attachment of the TP10 penetrating peptide to the known antibacterial antibiotic – ciprofloxacin or FMDP, would cause the increase of antifungal activity of the drug. The results of these studies revealed that the *in vitro* antifungal activity of CIP:TP10 conjugates is significantly higher than native CIP activity. The CIP-TP10 conjugate penetrates inside the fungal cells much more effectively than CIP alone. In addition, both TP10 and its conjugates have been shown to be able to block DNA relaxation mediated by topoisomerase II in fungal cells. Nevertheless, both TP10 and its CIP conjugates cause an undesirable cytotoxic effect on three mammalian cell lines. In the case of conjugates with FMDP it was revealed that conjugation of FMDP to TP10 significantly increases antifungal activity of this compound.

The second group of compounds was molecular umbrella conjugates with attached FMDP or cispentacin. In this case, the goal was to deliver the active molecule inside the fungal cell. The results showed that some of the tested conjugates showed anti-fungal activity, while the majority turned out to be inactive. According to microscopic observations, it could be concluded that the compounds do not penetrate effectively the fungal cells membrane. Analysis of high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS) showed that some of the conjugates, mainly those which contain a TML linker in their structure, undergo enzymatic hydrolysis under the influence of the model esterase or cell-free *Candida albicans* extract. However, the results of studies on the effect of the addition of N-acetyl-D-glucosamine on the antifungal activity of umbrella conjugates with FMDP indicate that this activity may not be a consequence of the presence of FMDP in these conjugates.

The third group of compounds studied in this work were lipid conjugates, which contained in their structure FMDP or cispentacin attached through TML. Microscopic observations of the

fluorogenic conjugates of this type on fungal cells confirmed their penetration into yeast cells, however, with the possibility of accumulation in the cytoplasmic membrane. Some of the tested conjugates have anti-fungal properties and are hydrolyzed by enzymes present in the cell-free extract of *Candida albicans*. However it is uncertain whether their action is caused by the presence of FMDP or cis-pentacin.

Studies have also been carried out on conjugates of molecular umbrellas with polyene macrolide antibiotics - amphotericin B or nystatin, connected via linkers of various lengths. In this case, the purpose of conjugation with the molecular umbrellas was to prevent from aggregation of antibiotic molecules, which could potentially affect their cytotoxicity to mammalian cells. Antifungal activity of conjugates was tested, the critical aggregation concentration of selected conjugates, affinity for ergosterol, and hemolytic and cytotoxic properties of three cell lines were determined. Several conjugates have been shown to exhibit antifungal properties very similar to native antibiotics, and their critical aggregation concentration was higher than that of amphotericin B and nystatin. The conjugation with the molecular umbrella had a positive effect on the selective toxicity of amphotericin B, while the conjugates with nystatin showed significantly worse selective toxicity than the native antibiotic.

In summary, a number of studies were carried out on carriers of anti-fungal compounds. It has been shown that their modification with the attached carrier can lead to the improvement of anti-fungal activity, the improvement of transporting capacity as well as the decrease of hemolytic and cytotoxic properties. The performed experiments can serve as a strong basis for designing an effective and non-toxic anti-fungal carrier-drug system.

Keywords: drug carriers, molecular umbrellas, cell penetrating peptides, enzymatic inhibitors, ciprofloxacin

SPIS TREŚCI

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ I SKRÓTÓW	12
1. WSTĘP I CEL PRACY.....	13
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	16
2.1. Idea i mechanizm działania nanonośników	16
1.1.1. Łączniki.....	16
1.1.2. Strategia konia trojańskiego	20
2.2. Nośniki leków.....	21
2.2.1. Peptydy penetrujące.....	21
2.2.2. Parasole molekularne.....	26
2.2.3. Związki o charakterze lipidowym	30
2.3. Mechanizmy działania inhibitorów enzymatycznych, składników koniugatów będących przedmiotem badań.....	34
2.3.1. Mechanizm działania kwasu N ³ -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego	34
2.3.2. Mechanizm działania cispentacyny	37
2.3.3. Mechanizm działania chemoterapeutyków chinolonowych.....	37
2.4. Mechanizm działania innych związków użytych w badaniach	40
2.4.1. Mechanizm działania makrolidowych antybiotyków polienowych	40
3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	43
3.1. Materiały	43
3.1.1. Drobnoustroje i linie komórek ssaczych wykorzystywane w badaniach	43
3.1.2. Podłoża stosowane w hodowlach drobnoustrojów i komórek ssaczych	44
3.1.3. Inne odczynniki.....	45
3.1.4. Sprzęt	46
3.2. Badane związki.....	46
3.2.1. Koniugaty ciprofloksacyny, lewofloksacyny lub FMDP z peptydem penetrującym TP10 ...	46
3.2.2. Koniugaty parasoli molekularnych z FMDP lub cispentacyną.....	48
3.2.3. Koniugaty o charakterze lipidowym z FMDP i cispentacyną.....	51
3.2.4. Koniugaty parasoli molekularnych z makrolidowymi antybiotykami polienowymi.....	53
3.3. Metody badawcze.....	54
3.3.1. Oznaczenie aktywności przeciwgrzybowej i przeciwbakteryjnej in vitro	54
3.3.2. Wyznaczenie krytycznego stężenia agregacji koniugatów parasoli molekularnych z amfoterycyną B.....	55
3.3.3. Wyznaczenie krytycznego stężenia agregacji koniugatów parasoli molekularnych z nystatyną	56

3.3.4. Analiza rozkładu enzymatycznego koniugatów z wykorzystaniem RP-HPLC	56
3.3.5. Jakościowa ocena zdolności związków do wnikania do komórek grzybowych za pomocą mikroskopii konfokalnej	58
3.3.6. Inhibicja relaksacji DNA katalizowanej przez topoisomerazę II	59
3.3.7. Określenie powinowactwa związków do ergosterolu	59
3.3.8. Określenie właściwości hemolitycznych wybranych związków	60
3.3.9. Określenie cytotoksyczności badanych związków	60
3.4. Omówienie i dyskusja wyników	61
3.4.1. Działanie biologiczne koniugatów ciprofloksacyny, lewofloksacyny i FMDP z peptydem penetrującym TP10	61
3.4.2. Działanie biologiczne koniugatów parasoli molekularnych z FMDP lub cispentacyną	81
3.4.3. Działanie biologiczne koniugatów FMDP i cispentacyny z nanośnikami lipidowymi.....	102
3.4.4. Działanie biologiczne koniugatów parasoli molekularnych z makrolidowymi antybiotykami polienowymi	113
4. PODSUMOWANIE	123
WYKAZ LITERATURY	128

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ I SKRÓTÓW

AIDS - zespół nabytego niedoboru odporności, ang. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*

AmB – amfoterycyna B

AMP - adenozy-5'-monofosforan

ATP - adenozy-5'-trifosforan

Cac – krytyczne stężenie agregacji, ang. *critical aggregation concentration*

CLSI – Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych, ang. *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CPPs – peptydy penetrujące, ang. *Cell Penetrating Peptides*

EH_x – dawka efektywna, przy której następuje dany proces w x%

FMDP – kwas N³-(4-metoksyfumarilo)-L-2,3-diaminopropanowy

GlcN-6-P – glukozamino-6–fosforan

HEK293 T - linia komórek pochodzących z nerki płodu ludzkiego

HIV-1 – ludzki wirus niedoboru odporności typu 1, ang. *human immunodeficiency virus type 1*

HPLC - wysokosprawną chromatografię cieczową, ang. *high-performance liquid chromatography*

IC_x – stężenie hamujące proces w x%

LD_x - dawka śmiertelna wywołująca śmierć x% populacji

MAP – modelowy peptyd amfipatyczny, ang. *model amphipathic peptide*

MFC - minimalne stężenie grzybobójcze, ang. *minimum fungicidal concentration*

MIC - minimalne stężenie hamujące, ang. *minimum inhibitory concentration*

MS - spektrometria mas, ang. *mass spectrometry*

NLS – fragment peptydu umożliwiający dostarczenie ładunku do jądra komórkowego ang. *nuclear localization signal*

Nys - nystatyna

PBS - buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PEG – poli(tlenek etylenu), ang. *polyethylene glycol*

TAT – peptyd penetrujący z HIV-1, GRKKRRQRRRPQ

TML – łącznik ulegający hydrolizie pod wpływem esterazy, ang. *trimethyl lock*

TP10 – transportan 10, AGYLLGKINLKALAALAKKIL

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia ang. *World Health Organisation*

1. WSTĘP I CEL PRACY

W obecnych czasach choroby związane z osłabieniem układu odpornościowego są poważnym problemem medycznym. Właśnie z powodu osłabienia funkcji immunologicznych obserwuje się wzrost liczby zakażeń grzybami drożdżopodobnymi. W grupie zakażeń grzybami drożdżopodobnymi znajdują się układowe infekcje grzybowe, które są wyjątkowo groźne dla osób na nie podatnych. Grupą chorych, która jest szczególnie narażona na tego typu zachorowania są osoby cierpiące na zespół nabytego niedoboru odporności oraz osoby cierpiące na choroby nowotworowe, które są poddawane chemio- i radioterapii. Jest to również często spotykana dolegliwość u chorych na cukrzycę, mających problemy endokrynologiczne lub pobierających leki immunosupresyjne, antybiotyki i steroidy. Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2017 roku na świecie żyje prawie 37 milionów chorych na AIDS [1]. Biorąc pod uwagę liczbę osób chorych na inne, wymienione dolegliwości, grupa osób narażonych na zakażenia grzybicze może być bardzo znacząca.

Dodatkowym problemem związanym z infekcjami grzybiczymi jest nabywanie oporności drobnoustrojów na stosowane leki. Jest to najczęściej spowodowane nadużywaniem antybiotykoterapii. W dzisiejszych czasach lekarze chętnie przepisują antybiotyki o szerokim spektrum działania nawet w przypadku drobnych infekcji. Takie zjawisko powoduje nabywanie oporności drobnoustrojów na tradycyjne leki przeciwdrobnoustrojowe.

Aby ominąć komplikacje związane z chemioterapią przeciwdrobnoustrojową, opracowuje się różne sposoby pozwalające na wyeliminowanie problemów związanych ze standardową chemioterapią. Jednym z nich jest modyfikacja chemiczna znanych związków o działaniu przeciwgrzybowym, w wyniku której następuje polepszenie ich właściwości biologicznych, takich jak np. aktywność przeciwgrzybowa, czy też selektywna toksyczność.

Amfoterycyna B to jeden z najbardziej znanych makrolidowych antybiotyków polienowych. Wykazuje wysoką skuteczność w leczeniu układowych infekcji grzybowych. Jednakże cechuje się tak silną toksycznością wobec komórek ssaczy, że jest stosowana tylko w wyjątkowych przypadkach. Jej mechanizm działania polega na łączeniu się z ergosterolem występującym w błonie komórkowej komórek grzybowych, dzięki czemu tworzy kanały, które powodują wypływ jonów i substancji odżywczych z wnętrza komórek drobnoustroju. Uważa się, że toksyczność amfoterycyny B jest związana z tworzeniem agregatów tworzących kompleksy z cholesterolem w błonie komórek ssaczy. W konsekwencji, toksyczność wobec komórek ssaczy pochodnych amfoterycyny B nie tworzących agregatów mogłaby być niższa niż macierzystego antybiotyku. Stąd poszukuje się rozwiązań, które zapobiegą agregacji antybiotyków polienowych w środowiskach wodnych.

Jednym ze sposobów modyfikacji chemicznej chemoterapeutyku może być przyłączenie grupy funkcyjnej o charakterze nanonośnika molekularnego. W zależności od swojej struktury, ułatwiają one dotarcie chemoterapeutyku do wybranego celu w komórce i uwalniają go w odpowiednim momencie i miejscu, ale mogą również zmieniać jego właściwości fizyko-chemiczne na przykład takie, jak

zdolność do agregacji w konkretnych środowiskach czy hydrofilowość. Działanie takiego nośnika wiąże się z ograniczeniem negatywnych efektów chemioterapii przeciwgrzybowej, podniesieniem skuteczności działania leków i ograniczeniem możliwości generowania szczepów opornych. Należy pamiętać, że nośnik powinien być co najmniej nietoksyczny względem komórek gospodarza i nie powinien odkładać się w organizmie.

Rozważając związki o potencjalnej aktywności przeciwgrzybowej, warto zwrócić uwagę na inhibitory enzymatyczne. Przykładem takiego inhibitora jest analog glutaminy - kwas N³-(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowy (dalej nazywany FMDP), który jest inhibitorem syntazy glukozamino-6-fosforanu (syntaza GlcN-6-P). Produkt reakcji katalizowanej przez ten enzym jest substratem do dalszej biosyntezy peptydoglikanu u bakterii i chityny u grzybów, czyli składników ścian komórkowych tych drobnoustrojów [2]. Zahamowanie aktywności syntazy GlcN-6-P powoduje zmiany morfologiczne, aglutynację i lizę komórek bakteryjnych lub grzybowych. Co istotne, syntaza GlcN-6-P występuje także u ludzi, ale jej zahamowanie nie powoduje szkodliwych efektów ze względu na dłuższy czas życia komórek ssaczy [3,4]. We wcześniejszych badaniach dotyczących działania FMDP udowodniono, że jest on silnym i selektywnym inhibitorem, ale nie jest w stanie pokonać bariery błony komórkowej i dostać się do wnętrza komórki grzybowej [5,6]. W związku z tym zaproponowano, aby do FMDP dołączyć nośnik, który miałby za zadanie dostarczenie związku do wnętrza komórki grzybowej.

Drugim, ciekawym związkiem o aktywności przeciwgrzybowej jest kwas (1R,2S)-2-aminocyklopentanowy (znany pod nazwą cispentacyna). Cispentacyna jest cyklicznym β-aminokwasem, analogiem L-proliny, który pierwszy raz wyizolowano z *Bacillus cereus* i *Streptomyces setonii* [7]. Udowodniono, że wykazuje właściwości przeciwgrzybowe w układach *in vitro* i *in vivo*. Mechanizm jej działania przeciwgrzybowego polega na inhibicji syntetazy izoleucylo-tRNA i syntetazy prolylo-tRNA, co powoduje zaburzenie syntezy białek w komórkach grzybowych.

Ostatnią grupą związków aktywnych, którymi zajmowano się w niniejszej pracy są chinolony, a szczególnie ciprofloksacyna. Chinolony to pochodne kwasu chinolinokarboksyłowego. Ich aktywność polega na inhibicji gyrazy DNA (bakteryjna topoizomeraza II), która ma za zadanie przyłączenie się do helisy DNA podczas replikacji i zmianę orientacji przestrzennej nici, co ułatwia kopiowanie materiału genetycznego. Poza gyrą DNA, chinolony blokują również topoizomerazę IV, która ma za zadanie uwolnienie potomnych chromosomów oraz ich rozluźnienie i pełne ukształtowanie. Współcześnie najczęściej stosuje się fluorochinolony II i III generacji. Fluorochinolony II generacji takie jak ciprofloksacyna, są aktywne wobec bakterii G(-). Fluorochinolony III generacji (np. lewofloksacyna) są aktywne wobec bakterii G(+), ale kosztem aktywności wobec bakterii G(-). Dość powszechnym zjawiskiem jest nabywanie oporności przez drobnoustroje na działanie tych chemoterapeutyków. W przypadku nabycia oporności względem działania jednego fluorochinolonu, występuje oporność na resztę związków z danej grupy [8 - 11]. Ze względu na doniesienia o niepożądanych skutkach ubocznych głównie związanych z układem mięśniowym, zaleca się stosowanie fluorochinolonów jedynie w skrajnych przypadkach [12].

W niniejszej pracy badano możliwość wykorzystania trzech rodzajów nośników. Pierwszą grupą są parasole molekularne. Są to cząsteczki, które potencjalnie mogą pełnić rolę nośników substancji aktywnych, zaproponowane przez Regena i współpracowników [13]. Ze względu na swoje wyjątkowe właściwości wybrano je jako nośniki leków przeciwgrzybowych. W zależności od zastosowania taki nośnik ma za zadanie zapobieganie agregacji związków lub ich transport do wnętrza komórek grzybowych. Drugą grupą nośników są związki lipidowe z tzw. "trimethyl-lockiem" (TML). Taki związek ma za zadanie dostarczenie do wnętrza komórki grzybowej inhibitora enzymatycznego i uwolnienie go. Łącznik TML jest hydrolizowany enzymatycznie i pozwala na uwolnienie leku w określonym środowisku. Trzecią grupą nośników były peptydy penetrujące (CPP). Peptydy penetrujące składają się z od 8 do 30 reszt aminokwasowych. Jak sama nazwa wskazuje, służą one do transportu różnych związków do wnętrza komórki. CPPs charakteryzują się niską toksycznością, łatwą przyswajalnością dla różnych linii komórkowych i szczepów, efektywnością zależną od dawki oraz tym, że rodzaj i rozmiar transportowanej cząsteczki nie ma znaczącego wpływu na efektywność transportu [14].

Przedmiotem badań opisanych w niniejszej pracy było działanie koniugatów nanonośników molekularnych ze związkami o potencjalnym działaniu przeciwgrzybowym, w tym inhibitorami enzymatycznymi. Badania dotyczyły czterech grup koniugatów: koniugaty peptydu penetrującego TP10 z ciprofloksacyną lub FMDP, koniugaty parasoli molekularnych z FMDP lub cispentacyną, koniugaty związków o charakterze lipidowym z FMDP lub cispentacyną oraz koniugaty parasoli molekularnych z makrolidowymi antybiotykami polienowymi.

Głównym celem badań było stwierdzenie, w jaki sposób skoniugowanie inhibitora lub antybiotyku polienowego z nanonośnikiem molekularnym wpłynie na właściwości biologiczne, odpowiednio: aktywność przeciwgrzybową *in vitro* lub selektywną toksyczność w układzie komórka grzybowa: komórka ssacza.

Zakres badań dotyczących koniugatów nanonośników z inhibitorami enzymatycznymi obejmował: zbadanie aktywności przeciwgrzybowej i przeciwbakteryjnej, zbadanie zdolności fluorogennych pochodnych związków do wnikania do wnętrza komórek grzybowych, sprawdzenie mechanizmu działania koniugatów przy pomocy badań enzymatycznych oraz określenie cytotoxyczności wobec komórek ssaczych.

W przypadku koniugatów parasoli molekularnych z makrolidowymi antybiotykami polienowymi – amfoterycyną B i nystatyną zbadano aktywność przeciwgrzybową koniugatów, określono ich krytyczne stężenie agregacji w roztworach wodnych, powinowactwo do ergosterolu, właściwości hemolityczne i cytotoxyczne.

2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1. Idea i mechanizm działania nanonośników

Idealne chemoterapeutyki powinny być m.in. skuteczne, nietoksyczne względem zdrowych komórek organizmu pacjenta oraz dobrze rozpuszczalne w wodzie, z drugiej strony, muszą być odpowiednio hydrofobowe, aby móc przeniknąć przez błony komórkowe do wnętrza komórki. Pogodzenie wszystkich tych cech bywa trudne, dlatego wśród naukowców pojawiła się idea nanonośników leków. Nośniki leków są to związki chemiczne, które mają za zadanie dostarczyć cząsteczkę aktywną do wybranego celu molekularnego w komórce. Proces selektywnego dostarczenia leku do celu molekularnego można podzielić na trzy etapy. Pierwszym z etapów, mającym miejsce w układach *in vivo*, jest dostarczenie koniugatu nośnika i leku do wybranego miejsca w organizmie pacjenta. W kolejnym etapie następuje przenikanie błony komórkowej, a co za tym idzie, wniknięcie układu nośnik - lek do wnętrza komórki. Ostatnim etapem jest uwolnienie cząsteczki aktywnej (leku) wewnątrz komórki, co jest możliwe dzięki odpowiedniej strukturze koniugatu, a szczególnie łącznikowi nośnik – lek. Ogólny schemat budowy takich układów przedstawiono na rysunku 1 poniżej.



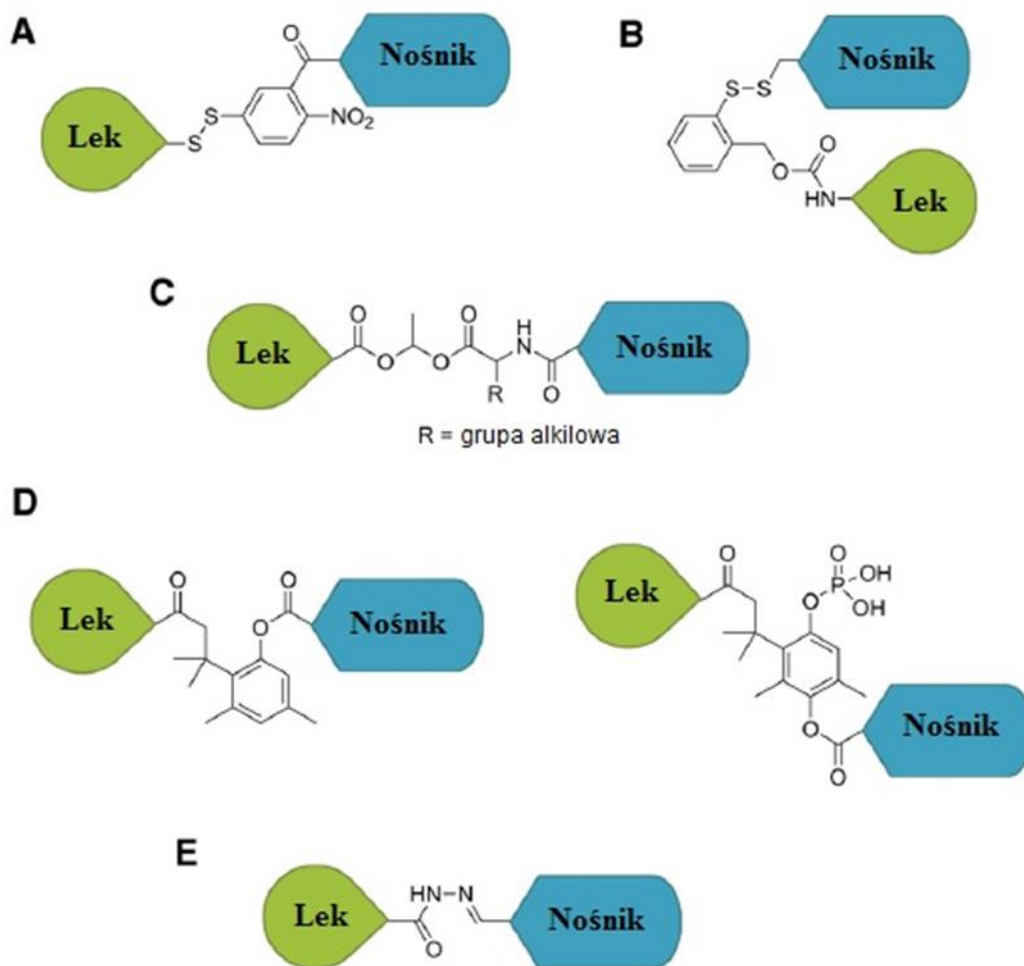
Rys.1. Ogólna idea budowy układów typu nośnik – lek [15]. Każdy z takich układów składa się z cząsteczki aktywnej, nośnika oraz odpowiedniego łącznika.

Tak skonstruowany układ może poprawić właściwości leku takie, jak rozpuszczalność, stabilność w organizmie, selektywna toksyczność względem komórek patogenów, zdolność przenikania przez błony komórkowe.

2.1.1. Łączniki

Łącznik może mieć charakter stabilnego wiązania kowalencyjnego lub łączyć lek i nośnik za pomocą niekowalencyjnych oddziaływań. Popularnym w literaturze podejściem jest strategia hydrolizy łącznika pod wpływem określonych warunków środowiskowych, co skutkuje uwolnieniem leku. Takie rozwiązanie jest stosowane w przypadku, kiedy efekt terapeutyczny jest możliwy tylko w momencie dotarcia cząsteczki aktywnej do celu molekularnego. Uwolnienie leku wewnątrz komórki jest możliwe dzięki warunkom lub procesom tam zachodzącym, takim jak: działanie wewnątrzkomórkowych

hydrolaz, środowisko redukcyjne dzięki obecności glutationu lub środowisko o niskim pH, które występuje w endosomach. Przykłady układów nośnik - lek, których komponenty połączone są różnego rodzaju łącznikami, przedstawiono na rysunku 2.

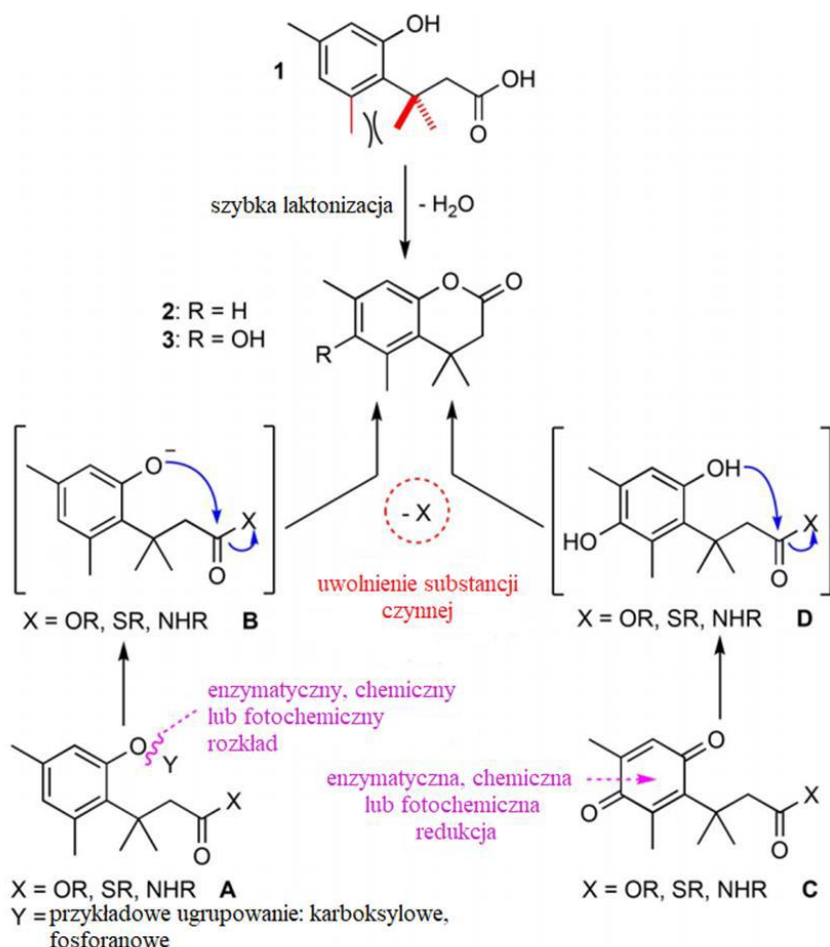


Rys.2. Przykłady łączników używanych w układach nośnik – lek [15].

Łącznik w postaci mostka disiarczkowego obecnego w 5-tio-(2-nitrobenzoilu) (A) i w karbaminianie o-ditiobenzylu (B) jest stabilny w ludzkiej surowicy. Działa na zasadzie wymiany w reakcji z glutationem w cytozolu. Estry (acyloksy)alkilowe (C) i „trimethyl lock” (D) są hydrolizowane przez wewnątrzkomórkowe esterazy lub fosfatazy, co powoduje uwolnienie cząsteczki leku. Wiązanie hydrazone (E) jest stabilne w pH 7, ale ulega rozpadowi w środowisku o niskim pH.

Trimethyl lock (TML) jest pochodną kwasu o-hydroksy-di-hydro-cynamonowego, która ulega reakcji laktonizacji do di-hydro-kumaryny w warunkach fizjologicznych. Nazwa tego ugrupowania pochodzi od trzech grup metylowych, które mają kluczowe znaczenie w działaniu ugrupowania. Pierwszym naukowcem, który badał zastosowanie TML w prolekach był Ronald Borchardt (asystent Louisa A. Cohena, który jako pierwszy przebadął mechanizm działania TML oraz określił jego

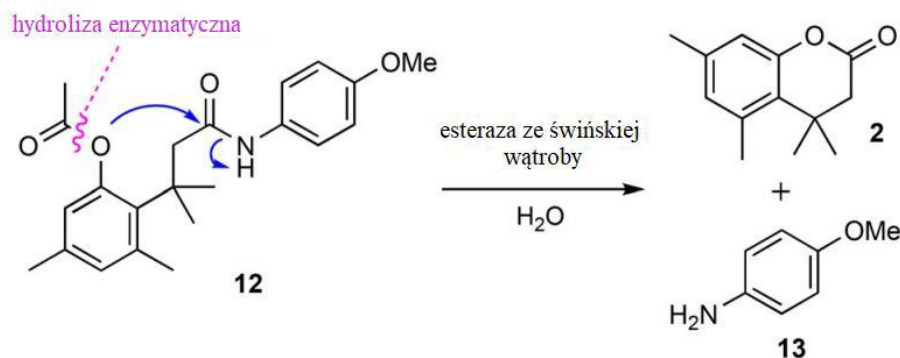
kinetykę) [16]. Ogólne działanie tego ugrupowania polega na uwolnieniu cząsteczki aktywnej (na rys. 3 oznaczonej jak X) pod wpływem redukującego czynnika.



Rys.3. Ogólna zasada działania TML. Cząsteczka aktywna (X) zostaje uwolniona z układu pod wpływem utworzenia pierścienia laktonowego [17].

Mechanizm działania TML polega na szybkiej laktonizacji kwasu o-hydroksy-di-hydro-cynamonowego (rys. 3., 1) do dihydokumaryny (rys. 3., 2). Oddziaływania steryczne pomiędzy trzema grupami metylowymi skutkują taką konformacją, przy której reakcja zachodzi bardzo szybko.

Szczególnym rodzajem mechanizmu działania TML jest hydroliza enzymatyczna pod wpływem esterazy. W jego przypadku laktonizacja jest wyzwalana przez działanie esterazy, co powoduje uwolnienie związków przyłączonych do reszty kwasu karboksylowego. Pomimo, że esterazy są wszechobecne w organizmie ludzkim, uważa się, że hydroliza enzymatyczna zachodzi dopiero po akumulacji związków w tkance docelowej, ponieważ estry fenylove TML są bardziej stabilne ze względu na zawadę przestrzenną [17]. Mechanizm działania hydrolizy enzymatycznej związków TML przy pomocy esterazy przedstawiono na rysunku 4.



Rys.4. Mechanizm działania hydrolizy enzymatycznej TML pod wpływem esterazy [18]. Wskutek działania esterazy następuje reakcja laktonizacji estru acetylowego TML (12), co wiąże się z uwolnieniem p-metoksyaniliny (13) z układu.

TML znalazł zastosowanie w konstrukcji proleków, sond i znaczników fluorescencyjnych oraz jako przełącznik biologiczny [16, 17].

Pierwszymi przykładami zastosowania TML w nośnikach leków były prace przedstawione przez Borchardta i współpracowników [18, 19, 20]. Z ich badań wynika, że ester acetylowy TML (rys. 4, 12) mający okres półtrwania $t_{1/2} = 4039$ min w buforze PBS ulega rozkładowi do p-metoksyaniliny po dodaniu do układu esterazy. Czas rozkładu wynosi kilka minut. Naukowcy wykonali również badania w osoczu krwi ludzkiej. W tym przypadku okres półtrwania wyniósł $t_{1/2} = 54$ min. Dodatkowo badacze wykazali, że dodanie fluorofosforanu diizopropylu, który jest inhibitorem esterazy, zwiększa czas półtrwania do $t_{1/2} = 475$ min.

Innym przykładem proleków z TML jest praca Dilona i współpracowników, którzy opracowali pochodną gancyklowiru, który ma działanie przeciwwirusowe [20]. Dołączenie gancyklowiru do TML spowodowało polepszenie biodostępności po podaniu doustnym z 3,6% do 15,5%.

Łączniki TML zostały użyte również w prolekach PEGyloowanych. TML łączy lek z rozpuszczalnym w wodzie politlenkiem etylenu (PEG). Przykładem takiego układu jest praca Greenwalda i współpracowników, gdzie przedstawili wyniki dotyczące PEGylowanej daunorubicyny [21]. Naukowcy dołączyli do grupy cukrowej daunorubicyny łącznik TML a dalej połączyli taką strukturę do łańcucha PEG. Otrzymany związek miał czas półtrwania $t_{1/2} = 1,9$ h w osoczu krwi szczurzej. Z ich pracy wynika, że układ jest efektywny względem nowotworów podskórnych oraz nowotworu sutka, prostaty i jajników.

Łączniki TML mają również zastosowanie w projektowaniu związków peptydowych. Są stosowane w celu zwiększenia stabilności i efektywności przenikania do komórek odpowiednich związków. W przypadku leków peptydowych problemem są peptydazy, które odpowiadają za degradację wiązań peptydowych. Zapobiegnięcie degradacji przez użycie ugrupowania TML zostało zbadane przez Borchardta i współpracowników [22]. Badacze zaprojektowali układ w ten sposób, że N-koniec peptydu został połączony z C-koncem przy pomocy TML. Taki układ uwalnia badany heksapeptyd pod

wpływem esterazy. Dodatkowo naukowcy wykazali, że takie rozwiązanie powoduje efektywniejsze niż w przypadku natywnego peptydu wnikanie do komórek Caco-2.

Ostatnim przytoczonym tu przykładem jest praca Millera i Ji, którzy przedstawili wyniki dotyczące koniugatu sideroforu i ciprofloksacyny z łącznikiem TML [23]. Siderofory są chelatami żelaza używanymi przez bakterie jako jego źródło, więc układ przedstawiony przez naukowców był przykładem strategii konia trojańskiego. Taki koniugat wykazał aktywność przeciwbakteryjną względem bakterii Gram-ujemnych *P. aeruginosa*. Ich dalsze prace również dotyczyły koniugatów TML z ciprofloksacyną. Jednym z kolejnych badań jakie opublikowali były wyniki dotyczące N-acylowanych pochodnych ciprofloksacyny z TML [24]. Z ich badań wynika, że koniugaty z ciprofloksacyną i TML wykazują aktywność względem bakterii Gram-dodatnich.

2.1.2. Strategia konia trojańskiego

W literaturze można spotkać wiele rodzajów nośników leków, w tym m.in.: peptydy penetrujące (CPP), polimery, nanocząstki metali i tlenków metali, dendrymery, liposomy, nanorurki, cyklodekstryny, siderofory i wiele innych [25]. W niniejszej pracy skupiono się na koniugatach z udziałem trzech nośników typu organicznego. Takie podejście nazywane jest w literaturze strategią konia trojańskiego. Polega ono na dołączeniu aktywnej cząsteczki do nośnika, który jest molekułą organiczną. W ten sposób układ imituje związki nieszkodliwe dla drobnoustroju, co ułatwia transport cząsteczki aktywnej do wnętrza komórki, a jednocześnie zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia cytotoksyczności względem komórek pacjenta ze względu na brak działania o charakterze błonowym. W kolejnych rozdziałach przedstawiono informacje dotyczące przebadanych przez autora nośników i związków aktywnych dołączonych do nich oraz zaprezentowano otrzymane wyniki.

2.2. Nośniki leków

2.2.1. Peptydy penetrujące

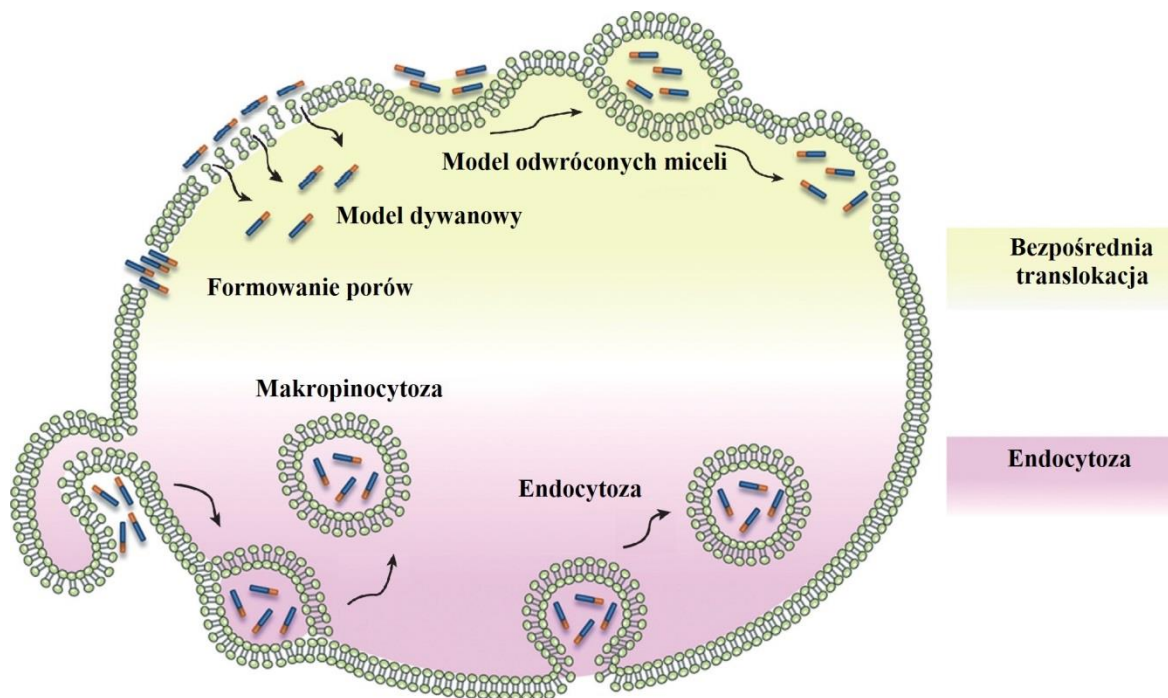
Peptydy penetrujące (dalej nazywane CPPs, ang. *cell-penetrating peptides*) są to krótkie peptydy składające się z nie więcej niż 30 reszt aminokwasowych. Ich podstawową cechą jest zdolność wnikania i transportowania różnych cząsteczek do wnętrza komórek bez konieczności interakcji z receptorami na powierzchni błon komórkowych. Mechanizm tego transportu może być zależny lub niezależny od energii. Peptydy penetrujące zostały odkryte równolegle przez dwie grupy badawcze w 1988 roku. Maurice Green i Paul Loewestein oraz Alan Frankel i Carl Pabo zaobserwowali, że białko TAT wirusa HIV-1, transaktywator transkrypcji jest w stanie efektywnie przeniknąć przez błony komórkowe i dostać się do wnętrza komórek ssaczych [26,27]. W dalszych badaniach nad zależnością pomiędzy strukturą białka TAT a jego efektywnością wnikania do komórek, Park i współpracownicy wykazali, że kluczowy w procesie pokonywania błon komórkowych jest fragment TAT₄₉₋₅₇ [28]. Innym przykładem peptydu penetrującego jest wyizolowany z *Drosophila melanogaster* w 1991 roku fragment białka antenapedia, który również był w stanie przeniknąć do wnętrza komórek [29]. Peptydy penetrujące są w stanie transportować cząsteczki takie, jak białka, inne peptydy, DNA, siRNA oraz związki terapeutyczne [30]. Charakteryzują się niską toksycznością, łatwą przyswajalnością dla różnych linii komórkowych i szczepów, efektywnością zależną od dawki oraz tym, że rodzaj i rozmiar transportowanej cząsteczki nie ma znaczącego wpływu na efektywność transportu [31]. Najefektywniejsze peptydy zawierają sekwencje dodatnio naładowanych aminokwasów, w tym szczególnie argininy [31]. Ze względu na właściwości CPPs można podzielić na trzy główne grupy – peptydy kationowe, amfipatyczne oraz hydrofobowe. Krótką charakterystykę każdej z grup oraz przykłady związków, które wchodzi w ich skład przedstawiono w tabeli 1.

Tab.1. Klasyfikacja peptydów penetrujących ze względu na cechy fizyko-chemiczne wraz z przykładami związków każdej z klas.

Klasa peptydów	Cechy	Przykład
Kationowe	<ul style="list-style-type: none">– wykazują dodatni ładunek wypadkowy– zawierają w strukturze argininę i lizynę	TAT49-57, penetratyna, poliargininy, Vectocell® [32,33]
Amfipatyczne	<ul style="list-style-type: none">– składają się z regionów polarnych i niepolarnych– poza argininą i lizyną mogą zawierać aminokwasy hydrofobowe takie, jak walina, leucyna, izoleucyna czy alanina– dzielą się na peptydy pierwszorzędowe, drugorzędowe i te zawierające prolinę– mogą zawierać fragmenty umożliwiające	MPG, Pep-1, TP10, p14, pVEC, MAP, p28 [34 – 37]

	<p>dostarczenie ładunku do jądra komórkowego (NLS, ang. <i>nuclear localization signal</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> – mogą mieć strukturę α-helisy z fragmentami hydrofobowymi i hydrofilowymi umieszczonymi po przeciwnych stronach helisy lub β-kartki, które ułatwiają pokonanie błony komórkowej 	
Hydrofobowe	<ul style="list-style-type: none"> – zawierają głównie domeny niepolarne (ujemny ładunek wypadkowy), co sprzyja pokonywaniu błony komórkowej – ich wnikanie do komórek jest prawdopodobnie niezależne od energii 	C105Y, Pep-7 [38, 39]

Pomimo, że w literaturze jest wiele materiałów dotyczących peptydów penetrujących, ich mechanizm wnikania do wnętrza komórek nadal nie jest w pełni zbadany. Wynika to z faktu, że na mechanizm wnikania ma wpływ wiele zmiennych – struktura peptydów, wielkość, ich właściwości fizyczne i chemiczne jak również stężenie i rodzaj transportowanej cząsteczki. Obecnie wiadomo, że peptydy penetrujące mogą wnikać do komórek na kilka różnych sposobów. Dwa główne mechanizmy wnikania, to zależna od energii endocytoza i niezależna energetycznie bezpośrednia translokacja. Na rysunku 5 przedstawiono schematycznie oba procesy.



Rys.5. Schemat proponowanych mechanizmów wnikania peptydów penetrujących do wnętrza komórek. Sposoby przechodzenia peptydu przez błonę komórkową mogą być podzielone na dwie grupy – bezpośrednią translokację oraz endocytozę [40].

Bezpośrednia translokacja polega na przedostaniu się peptydów penetrujących do wnętrza komórki dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym pomiędzy dodatnio naładowanym peptydem i błoną komórkową o ujemnym ładunku. Dla wytłumaczenia jej mechanizmu sformułowano trzy modele: model tworzenia porów, model dywanowy oraz model odwróconych miceli. Formowanie porów nazywane inaczej modelem klepek beczki lub modelem porów toroidalnych, polega na tworzeniu kanałów w dwuwarstwie lipidowej. Badania wskazują na udział w tym procesie grup guanidynowych, kwasów tłuszczowych oraz pH błony komórkowej. Jedną z obserwacji takich zależności były badania Herce'a i współpracowników, którzy stwierdzili, że przy wysokim pH kwasy tłuszczowe wiążą grupy guanidynowe CPP będące poza komórką, co inicjuje powstawanie toroidalnych kanałów [41]. Kontakt z cytozolem powoduje uwolnienie peptydu i tym samym zamknięcie kanału. Zjawisko zachodzi nawet w niskich temperaturach i w obecności inhibitorów endocytozy. Model dywanowy polega na układaniu się cząsteczek CPP poziomo na powierzchni, co wpływa na jej przepuszczalność i płynność. W tym przypadku, oddziaływania peptyd – błona mają również charakter elektrostatyczny. Miejscowy wzrost stężenia peptydów powoduje ich translokację do wnętrza komórki. W modelu odwróconych miceli, w pierwszym etapie błona komórkowa oddziałuje elektrostatycznie z peptydami, przez co zostaje wygięta. Powoduje to utworzenie odwróconej miceli. Następnie peptydy są uwalniane z miceli pod wpływem zmian właściwości fizycznych zachodzących w ich wnętrzu.

W dalszych badaniach nad mechanizmem wnikania peptydów penetrujących do komórek, stwierdzono, że niektóre z nich mogą wnikać do komórek na drodze endocytozy [42]. Endocytoza jest to zależny od energii proces zachodzący w każdej żywej komórce. Polega na transportowaniu do wnętrza komórki substancji chemicznych w pęcherzykach lipidowych. Endocytozę można podzielić na fagocytozę, makropinocytozę, endocytozę zależną od kaweoliny, endocytozę zależną od klatryny, endocytozę niezależną od kaweoliny i klatryny. Jedną z wątpliwości związanych z endocytozą peptydów penetrujących jest ich obecność lub możliwość wydostania się z pęcherzyków endosomalnych. Dokładny mechanizm opuszczenia przez peptydy pęcherzyków endosomalnych nie jest znany, ale na podstawie wyników eksperymentów zaproponowano kilka hipotetycznych modeli. Pierwszy z nich mówi o tym, że właściwości fizyczne pęcherzyków endosomalnych mogą ulegać zmianie pod wpływem oddziaływań elektrostatycznych z peptydami, przez co błona pęcherzyka staje się sztywniejsza. Na skutek tego błona pęka i wypuszcza peptydy do wnętrza komórki [43]. Innym z czynników może być pH, które ma wpływ na oddziaływanie peptyd – błona oraz wielkość i ładunek przenoszonej substancji. Zatrzymanie ładunku transportowanego przez peptydy penetrujące jest znaczącym problemem w projektowaniu terapii opartych na nośnikach peptydowych, dlatego w literaturze można znaleźć materiały dotyczące rozwiązania tego problemu. Jednym z rozwiązań jest wprowadzenie do peptydu domen wrażliwych na kwasowe pH pęcherzyków endosomalnych [44]. Innym zaproponowanym rozwiązaniem jest użycie w podobny sposób jak poprzednio fragmentów histydynowych, które adsorbują protony przy niskim pH, co powoduje wzrost ciśnienia osmotycznego i przerwanie błony [45]. Ciekawym rozwiązaniem również w kontekście tej pracy jest propozycja Ulo Langela i współpracowników, którzy wykorzystali PepFects (PFs), czyli peptydy pochodzące pierwotnie z TP10, który został opisany i zbadany w dalszej części tej pracy. Stearylacja na N-końcu polepszyła właściwości badanych peptydów związane z wydostaniem się z pęcherzyka

endosomalnego. W ten sposób powstał rdzeń, na którym bazowały inne peptydy z tej grupy – PF6 czy PF15 [46].

W literaturze można znaleźć wiele przykładów prac dotyczących koniugatów peptydów ze związkami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Przykładem takiej pracy może być publikacja Ferreiry i współpracowników [47]. Przedstawiają oni badania dotyczące koniugatu peptydu przeciwdrobnoustrojowego ubikwicydyny z kumaryną. Taki koniugat wykazywał działanie przeciwgrzybowe względem *C.gatti* oraz *C.neoformas* (MIC 0,04 – 0,18 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) bardzo zbliżone do flukonazolu (MIC 0,003 – 0,15 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$). Ponadto, koniugat efektywnie działał na szczep *C.gatti* oporny na flukonazol (oznaczony w pracy jako L27/01F) oraz nie wykazywał właściwości cytotoksycznych względem linii prawidłowych komórek płuc CCD-Lu ATCC CCL-210 w badanym zakresie stężeń.

Innym przykładem może być praca Brezden i współautorów dotycząca koniugatów peptydu penetrującego i przeciwdrobnoustrojowego P14LRR oraz kanamycyny [48]. Otrzymany związek z założenia miał wykazywać synergistyczne działanie przeciwbakteryjne, ponieważ zarówno nośnik w postaci peptydu jak i związek aktywny wykazywały właściwości przeciwbakteryjne. Zaproponowany koniugat rzeczywiście wykazywał właściwości przeciwbakteryjne względem szeregu szczepów w tym: *E.coli*, *S.aureus*, *M.tuberculosis*, *S.epidermidis* w zakresie stężeń MIC 0,12 – 2 μM . Ponadto zaprezentowany koniugat wnikał do komórek ssaczych, gdzie był w stanie zwalczać patogeny z grupy *Salmonella*, *Brucella*, *Shigella* and *Mycobacterium*. Naukowcy potwierdzili również jego właściwości przeciwbakteryjne *in vivo* na modelu *C.elegans*.

Ciekawym przypadkiem pracy nad peptydami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym jest praca Arnuscha i współpracowników [49]. Zaproponowali oni koniugat ultrakrótkich peptydów oraz witaminy E, cholesterolu oraz biotyny. Okazało się, że koniugaty z witaminą E wykazują właściwości przeciwgrzybowe (VitE-KkKK, *C. albicans*, MIC₅₀ = 3,12 μM), ale nie wykazują właściwości przeciwbakteryjnych. Dalsze badania *in vivo* na modelu mysim wykazały, że koniugaty z witaminą E nie są toksyczne w badanym zakresie stężeń. Związki podawano w dawce 9 mg/kg ciała cztery razy przez 11 dni.

Jednym z najlepiej poznanych peptydów penetrujących jest transportan 10 (TP10). Peptyd TP10 należy do grupy amfipatycznych peptydów penetrujących. Peptydy tej grupy wykazują podobieństwo do peptydów przeciwdrobnoustrojowych, mają właściwości cytolityczne i cytotoksyczne [50]. TP10 jest zbudowany z 21 reszt aminokwasowych, gdzie fragment 14 reszt aminokwasowych pochodzi z mastoparanu – jadu osy *Vesputula lewisii*, a fragment 6 reszt aminokwasowych z galaniny, która jest neuropeptydem występującym w układzie nerwowym, przewodzie pokarmowym i trzustce. Te dwa fragmenty połączone resztą lizyny tworzą TP10 (AGYLLGKINLKALAALAKKIL - NH₂).

Mechanizm działania TP10 związany jest z jego strukturą. Peptyd ten zawiera dodatnio naładowane aminokwasy, co skutkuje dodatnim ładunkiem peptydu + 5 w neutralnym pH. Głównym źródłem dodatniego ładunku są reszty lizyny, które często występują w strukturach peptydów amfipatycznych czy przeciwdrobnoustrojowych. TP10 nie zawiera w swojej strukturze reszt argininy,

które są cechą charakterystyczną kationowych peptydów penetrujących. Yandek i współpracownicy zbadali oddziaływania pomiędzy TP10 a sztuczną błoną lipidową [51]. Z ich badań wynika, że peptydy wiążą się z zewnętrzną powierzchnią pęcherzyka. Skutkuje to naciskiem na ściany pęcherzyka. W dalszym etapie TP10 przenika do wnętrza błony. Kiedy stężenie po dwóch stronach błony wyrównuje się, następuje zatrzymanie transportu. Okazuje się, że istotną cechą w transporcie układów z TP10 jest ładunek powierzchniowy błony komórkowej. Yandek i współpracownicy stwierdzili, że uzyskane przez nich wyniki można najlepiej zinterpretować na podstawie modelu dywanowego. Cząsteczki TP10 mają tendencję do równoległego ułożenia względem błony pęcherzyków. Na podstawie danych otrzymanych z symulacji komputerowych, analizy termodynamicznej i badań eksperymentalnych, zespół zaproponował model, który polega na prostej translokacji peptydów do wnętrza pęcherzyków lipidowych.

Istotnym elementem komórek grzybowych, który ma wpływ na wnikanie i aktywność koniugatów TP10 jest ściana komórkowa. Ściana komórkowa jest zbudowana z chityny, glukanów, mannanów i glikoprotein, co jest dodatkową przeszkodą dla peptydów penetrujących. Kolejnym ważnym aspektem jest obecność wakuoli, które biorą udział w szeregu procesów biologicznych w tym w endocytozie czy zapewnieniu odpowiedniej równowagi pH i soli. Zifan Gong i Amy J. Karlsson zbadali szereg peptydów penetrujących i ich zdolność do wnikania do komórek grzybowych [52]. Okazuje się, że peptyd TP10 wnika zarówno do komórek bakteryjnych, grzybowych jak i ssaczych. Potwierdzili, że czym większy ładunek peptydu tym efektywniejsza translokacja do wnętrza komórek. Jest to zgodne z przewidywaniami, ponieważ reszty fosforanowe lipidów posiadają ładunek ujemny, więc większy ładunek dodatni powoduje silniejsze oddziaływanie elektrostatyczne między błoną a peptydem. Po wniknięciu do komórek peptydy umiejscowione są w wakuolach lub cytozolu. Okazuje się, że umiejscowienie peptydów może być związane z ich stężeniem. Przy niższych stężeniach peptydy są w wakuolach. W wyższych stężeniach sygnał fluorescencyjny zaobserwowano w cytozolu. Na podstawie lokalizacji wakuol, braku destabilizacji błony oraz inhibicji wnikania w obecności azydku sodu oraz w niskiej temperaturze naukowcy stwierdzili, że TP10 wnika do komórek grzybowych poprzez endocytozę. Badania naukowców wskazują również, że TP10 ma negatywny wpływ na żywotność komórek ssaczych.

Natalia Nekhotiaeva oraz współpracownicy również badali zachowanie TP10 względem komórek *C. albicans* [53]. Wykazali, że peptyd jest w stanie wnikać zarówno do komórek bakteryjnych jak i grzybowych. Ponadto TP10 wykazuje aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybową względem *S. aureus* i *C. albicans*. W obu przypadkach MIC był równy 4 μM . Naukowcy wykazali również, że TP10 ma znikome właściwości hemolityczne w zakresie stężeń przy których wykazano jego działanie.

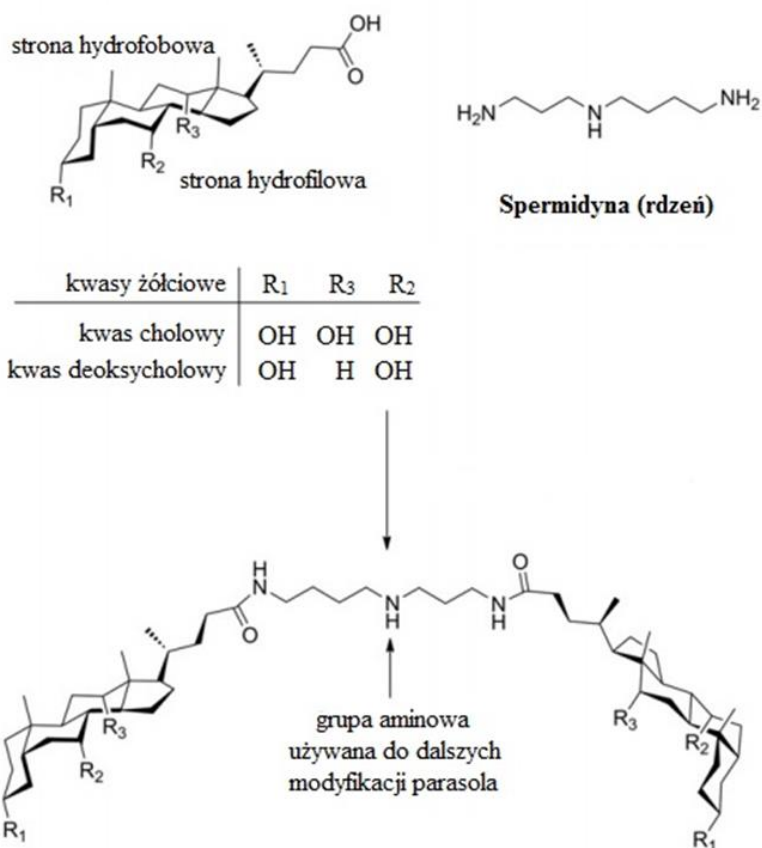
Julie Parenteau wraz z zespołem zbadła 20 peptydów penetrujących [54]. Badania zostały przeprowadzone zarówno na komórkach grzybowych jak i ssaczych. Okazało się, że jednym z peptydów, które są w stanie efektywnie pokonać ścianę komórkową grzybów, jest peptyd TP10. Dodatkowo, naukowcy wskazują, że TP10 jest równomiernie rozdyspergowane we wnętrzu komórek grzybowych (zarówno w cytozolu jak i jądrze).

Eriksson i współpracownicy zbadali peptyd TP10 i peptyd MAP pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej oraz właściwości hemolitycznych i cytotoksycznych względem komórek ssaczy [55]. Z ich pracy wynika, że peptyd TP10 nie wykazuje właściwości hemolitycznych w zakresie stężeń hamujących wzrost komórek bakteryjnych oraz nie wpływa na żywotność komórek ssaczy.

Ostatnim przykładem badań nad mechanizmem wnikania, aktywnością biologiczną i cytotoksycznością TP10 jest praca Junqiu Xie i współpracowników [56]. Przedmiotem badań zespołu była aktywność biologiczna TP10 wobec szczepów bakteryjnych cechujących się opornością wielolekową. Badania tego zespołu wskazują, że TP10 ma właściwości przeciwbakteryjne. Co ciekawe, naukowcy wykazali, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa TP10 wynika nie tylko z przzerwania ciągłości błony komórkowej bakterii, ale również z powodu wiązania się TP10 do bakteryjnego DNA.

2.2.2. *Parasole molekularne*

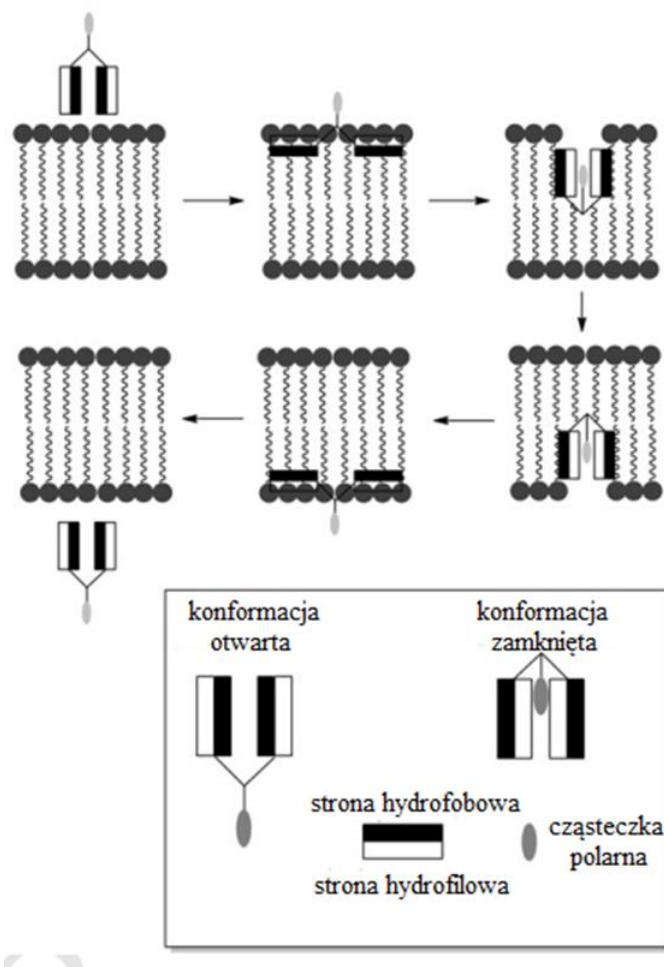
Parasole molekularne to cząsteczki, które potencjalnie mogą pełnić rolę nośników substancji aktywnych. Zostały zaproponowane przez Vaclava Janout, Marion Lanier i Stevena L. Regena w 1996 roku [57]. Zaprojektowanie ich struktury i tym samym działania bazowało na zasadzie działania parasola. Cząsteczka aktywna przymocowana do parasola jest izolowana od środowiska przez ramiona parasola. Zakłada się, że parasol może „pokrywać” hydrofilowe związki i transportować je przez hydrofobowe błony do wnętrza komórek. Ogólną strukturę parasoli molekularnych przedstawiono na rysunku 6.



Rys.6. Schemat budowy najczęściej spotykanych w literaturze parasoli molekularnych [15]. Taka cząsteczka składa się z dwóch ramion zbudowanych z kwasów żółciowych oraz spermidyny pełniącej rolę rdzenia. Grupa aminowa spermidyny służy do dołączenia cząsteczki aktywnej do łącznika.

Parasole molekularne składają się z rdzenia i co najmniej dwóch cząsteczek amfifilowych, które pełnią rolę ścian. Cząsteczkami pełniącymi taką rolę mogą być kwasy żółciowe (np. kwas cholowy i deoksycholowy). Najczęściej spotykane są struktury dwuścienne, ale można spotkać struktury wyższych rzędów np. czterościenne [58]. Struktury wielościenne powstają przy użyciu L-lizyny, która tworzy nowe rozgałęzienia dla kwasów żółciowych. Wykorzystanie ugrupowań sulfonowych pozwala na otrzymanie struktur, które są rozpuszczalne w środowisku wodnym. Strukturę rdzenia tworzą poliaminy takie, jak spermina i spermidyna. Do rdzenia parasola można przyłączać różne cząsteczki aktywne przy pomocy łącznika. Przypomina to rodzaj „rączki” parasola. Łącznik umożliwi uwolnienie cząsteczki aktywnej w określonych warunkach środowiskowych.

Vaclav Janout wraz z zespołem zaproponowali potencjalny mechanizm wnikania otrzymanych parasoli molekularnych do wnętrza komórek. Został on przedstawiony na rysunku 7.



Rys. 7. Mechanizm przenikania parasoli molekularnych przez błony komórkowe [59]. Polega on na zmianie konformacji parasola z otwartej na zamkniętą i odwrotnie w zależności od otaczającego środowiska tak, aby sprawnie przetransportować cząsteczkę polarną na drugą stronę błony komórkowej.

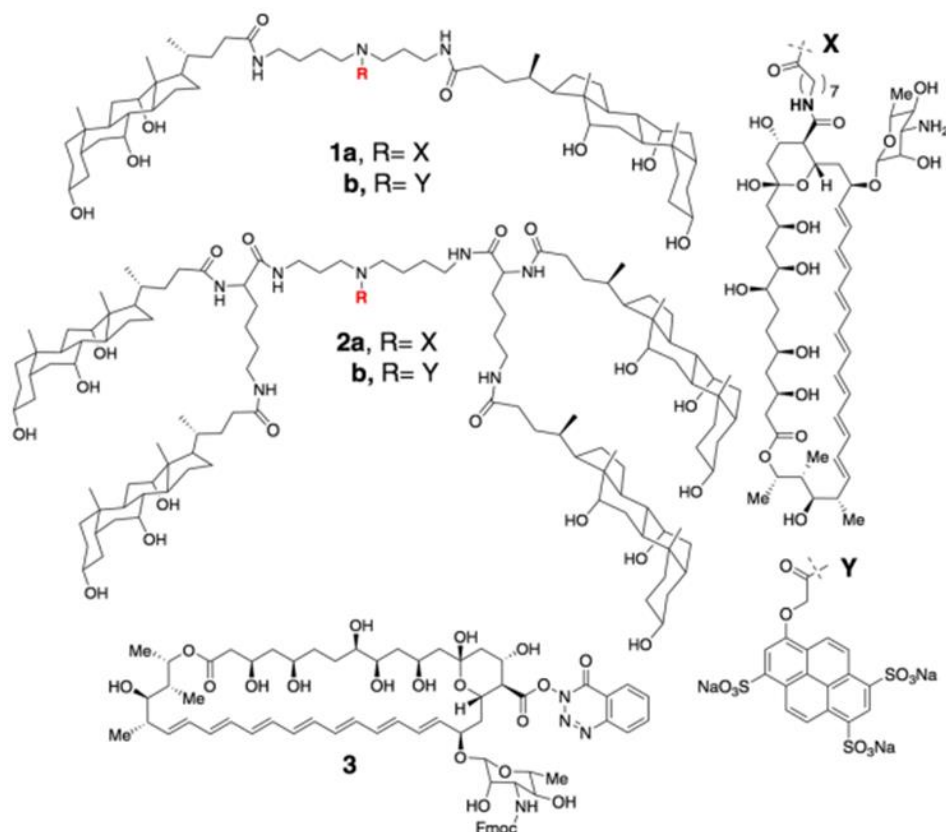
Zaproponowany mechanizm polega na zmianie konformacji parasola w zależności od otaczającego go środowiska [59]. W momencie, kiedy parasol znajduje się w środowisku polarnym, hydrofilowa strona parasola zostaje wyeksponowana, a transportowana cząsteczkę polarna nie jest odizolowana od środowiska. Jeśli parasol znajdzie się w środowisku niepolarnym, zmienia się konformacja i tym razem hydrofobowa część parasola zostaje wyeksponowana, a transportowana cząsteczkę polarna zostaje odizolowana od niesprzyjającego środowiska. Zdaniem autorów, pozwala to na transport polarnych cząsteczek przez niepolarne błony komórkowe.

Vaclav Janout ze współpracownikami wykonali szereg badań mających na celu sprawdzenie, czy parasole molekularne mają zdolność do przenikania przez sztuczne błony lipidowe [60, 61, 62]. Zespół zbadał zarówno parasole dwuścienne jak i czterościenne z dołączonym glutationem. Naukowcy dołączyli do parasoli ATP i AMP [63, 64]. W obu przypadkach, cząsteczki dołączone do parasoli pełniły rolę sondy, dzięki której można było ocenić efektywność wnikania parasoli do wnętrza sztucznych pęcherzyków. Na podstawie przeprowadzonych badań, badacze stwierdzili, że oba rodzaje parasoli są w stanie pokonać sztuczne błony fosfolipidowe poprzez mechanizm dyfuzji

pasywnej. Potwierdzili to również w późniejszych badaniach transportu oligonukleotydów przez błony fosfolipidowe bogate w cholesterol [65].

Kolejnym etapem badań parasoli molekularnych było sprawdzenie, czy są one w stanie przeniknąć przez błonę komórkową. Mohamed Mehiri i współpracownicy zsyntezowali ośmiościenne parasole molekularne znakowane kumaryną 343, a następnie wykonali szereg obserwacji mikroskopowych komórek z linii HeLa oraz Ca Ski [66]. Ich badania wykazały, że parasole molekularne są w stanie przejść przez błonę komórkową żywych komórek ssaczych. Określili również, że mechanizm, który zachodzi w trakcie transportu to transport pasywny. Wyniki badań tej grupy badawczej mogą oznaczać, że parasole molekularne mogą być potencjalnymi nośnikami leków, ponieważ są w stanie wnikać do wnętrza żywych komórek.

Ze względu na temat niniejszej rozprawy, warto wspomnieć o badaniach Vaclava Janouta i współpracowników, które dotyczyły koniugatów makrolidowych antybiotyków polienowych i parasoli molekularnych [67]. Grupa badaczy przedstawiła wyniki dotyczące właściwości fizyko-chemicznych, aktywności przeciwgrzybowej, właściwości hemolitycznych oraz cytotoksyczności koniugatów parasoli molekularnych z amfoterycyną B lub nystatyną. Uważa się, że toksyczność amfoterycyny B względem komórek ssaczych wynika z jej agregacji w środowisku wodnym [68]. Dlatego naukowcy zaproponowali zastosowanie parasoli molekularnych w celu zapobiegnięcia agregacji makrolidów polienowych i tym samym obniżeniu ich cytotoksyczności. Ze względu na błonowy charakter działania makrolidów polienowych, zaproponowane parasole miały pozostawać w lub na powierzchni błony i nie uwalniać cząsteczki aktywnej ani nie trafiać do wnętrza komórek grzybowych. Opisane cząsteczki przedstawiono na rysunku 8.



Rys.8. Koniugaty parasoli molekularnych i amfoterycyny B [67]. 1 – parasol dwuścienny, 2 – parasol czterościenny, 3 – Fmoc – karbaminian amfoterycyny B, X – Cascade Blue

Z badań Vaclava Janouta i współpracowników wynika, że koniugaty dwuściennych parasoli molekularnych z amfoterycyną B wykazują porównywalną z samą amfoterycyną B aktywność przeciwgrzybową względem szczepów *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans* i *C. gatti*. Także krytyczne stężenie agregacji koniugatów w roztworze wodnym jest zbliżone do krytycznego stężenia agregacji amfoterycyny B. Co ciekawe, pomimo podobnych stężeń agregacji, okazało się, że parasol molekularny z amfoterycyną B ma dużo słabsze właściwości hemolityczne niż natywna amfoterycyna ($EH_{50} = 375 \mu\text{M}$ wobec $EH_{50} = 4 \mu\text{M}$). Koniugaty te wykazywały także dużo niższą od amfoterycyny B cytotoksyczność względem linii komórkowej HEK293 T.

2.2.3. Związki o charakterze lipidowym

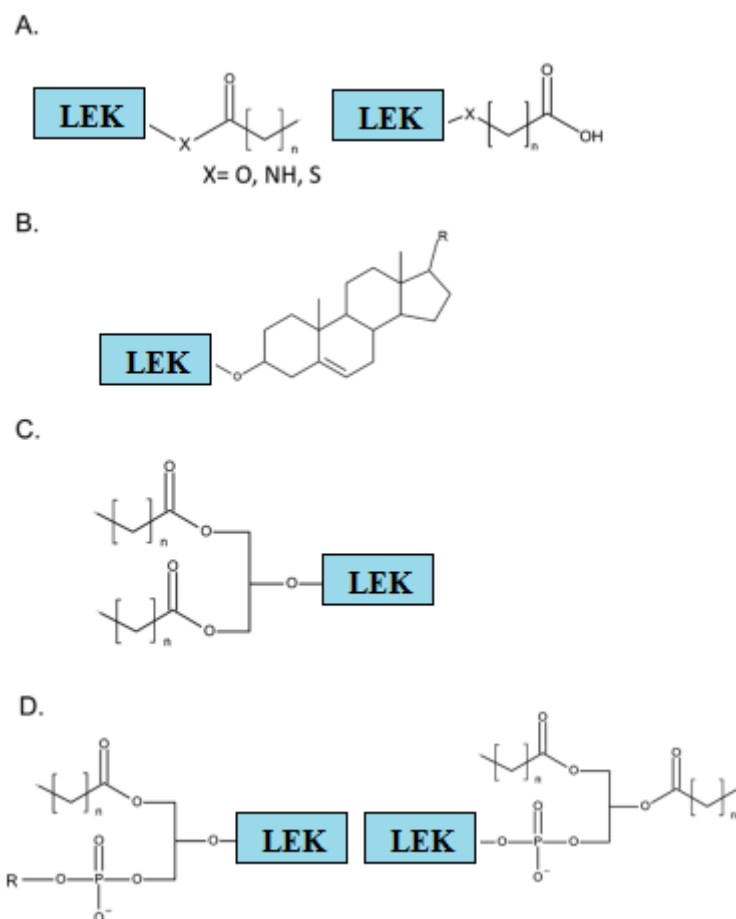
Ostatnią grupą nośników są związki o charakterze lipidowym. Koniugaty lipidowe służą do transportu hydrofilowych leków. Ich właściwości pozwalają na zwiększenie efektywności transportu związku aktywnego przez błonę komórkową. Koniugaty o charakterze lipidowym składają się ze związku aktywnego kowalencyjnie lub niekowalencyjnie dołączonego do łańcucha węglowodorowego lub innego ugrupowania hydrofobowego w sposób bezpośredni lub pośredni przy pomocy łącznika. Taki prolek jest substancją nieaktywną farmakologicznie do momentu, aż ulegnie w organizmie reakcji

enzymatycznej, wskutek której cząsteczka aktywna ulegnie uwolnieniu. Ogólną strukturę takiego koniugatu przedstawiono na rysunku 9.



Rys.9. Ogólna struktura koniugatu o charakterze lipidowym. Taki układ składa się ze związku aktywnego, łącznika i ugrupowania lipofilowego np. łańcucha węglowodorowego.

Głównym zadaniem takiego koniugatu jest transport związku aktywnego do wnętrza komórki, co polepsza biodostępność i docelowo poprawia efekt terapeutyczny dostarczanego leku. Dzięki takiej strategii hydrofilowy związek aktywny na czas transportu zamieniany jest w nierozpuszczalną w wodzie formę lipidową. W ten sposób zmniejsza się jego rozpuszczalność w wodzie, a zwiększa rozpuszczalność w tłuszczach. Dołączenie lipofilowego ugrupowania do hydrofilowego leku skutkuje otrzymaniem amfifilowej cząsteczki. Takie cząsteczki efektywniej przenikają przez błony komórkowe niż związki hydrofilowe, ponieważ błony komórkowe zbudowane są z dwuwarstwy lipidowej, która właściwościami przypomina koniugat lipidowy. Przykładem modyfikacji prowadzącej do otrzymania koniugatu lipofilowego może być dołączenie hydrofilowego leku do kwasów tłuszczowych, steroidów, glicerydów czy ugrupowań fosfolipidowych [69], których schematy zostały przedstawione na rysunku 10.



Rys.10. Przykładowe struktury koniugatów lipidowych. A. Koniugaty z kwasami tłuszczowymi. B. Koniugaty ze steroidami. C. Koniugaty z glicerydami. D. Koniugaty z fosfolipidami [70].

Lipidowe koniugaty hydrofilowych leków, ze względu na swoje właściwości, mogą ulegać procesom samoorganizacji. Samoorganizacja w środowisku wodnym polega na spontanicznym tworzeniu agregatów, miceli czy liposomów pod wpływem oddziaływań hydrofobowych. Molekuły starają się odizolować od siebie cząsteczki wody. Przykładem struktur, które ulegają takiemu zjawisku mogą być koniugaty ze skwalenem. Pod wpływem środowiska polarnego takie koniugaty tworzą samoistnie nanocząstki i większe struktury. Koniugat skwalen – gemcytabina samoorganizuje się w struktury, w których gemcytabina znajduje się wewnątrz, a skwalen tworzy ochronną powłokę dookoła leku [69]. Dodatkowo koniugat wykazuje właściwości przeciwnowotworowe.

Jak się okazuje, niektóre z koniugatów typu A (rys.10) zostały zaakceptowane przez FDA (Agencja Żywności i Leków, ang. *Food and Drug Administration*). Takimi przykładami są dekanian haloperydolu czy dekanian flufenazyny będące lekami przeciwpsychotycznymi [71].

Przykładem kolejnego koniugatu lipidowego jest praca Olbrich i współpracowników [72, 73]. Koniugat miał za zadanie dostarczyć lek na śpiączkę afrykańską spowodowaną ugryzieniem much Tse-Tse a dokładniej wiciowcami *Trypanosoma brucei*. Takie ugryzienie skutkuje infekcją centralnego układu nerwowego, więc zadaniem koniugatu było przekroczenie bariery krew-mózg. Koniugat zawierał w swojej strukturze diminazen, który jest lekiem pierwotniakobójczym. Naukowcy z sukcesem

otrzymali zaprojektowane koniugaty oraz uzyskali wyniki świadczące o pomyślnym transporcie koniugatu przez barierę krew-mózg.

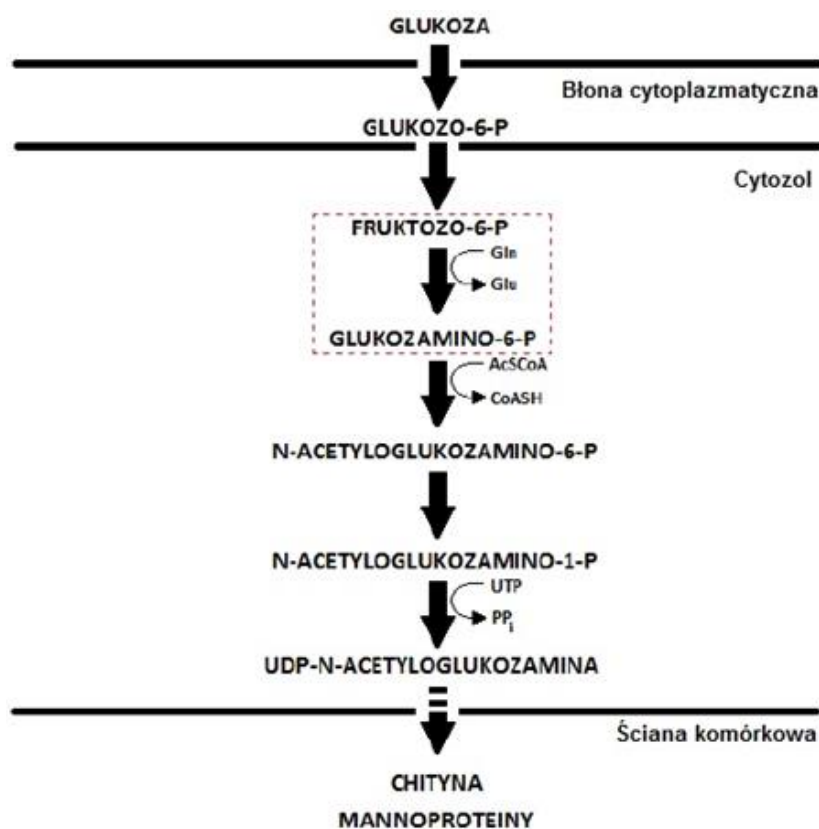
Innym przykładem jest praca Bery i współpracowników [74]. Ich badania dotyczyły lipidowych koniugatów antybiotyków glikozydowych o działaniu przeciwbakteryjnym. Taki koniugat składał się z aminoglikozydu o dodatnim ładunku oraz dołączonego ugrupowania o charakterze hydrofobowym. Do badania wybrano neomycynę oraz ugrupowania, które były pochodnymi kwasów tłuszczowych, cholesterolu oraz pirenu. Takie koniugaty zwiększały efektywność transportu leku do wnętrza komórek bakteryjnych. Okazało się, że związki są bardziej skuteczne w przypadku bakterii Gram-dodatnich. Naukowcy stwierdzili, że zewnętrzna błona bakterii Gram-ujemnych stanowi barierę ochronną przed lipidami polikationowymi, ale ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich może adsorbować i przepuszczać lipidy kationowe do błony wewnętrznej. Krótsza długość łańcucha węglowodorowego lub zastosowanie aromatycznych lub opartych na cholesterolu ugrupowań zwykle powoduje słabsze działanie względem bakterii Gram-dodatnich.

Powyższe wnioski mogą być potwierdzeniem dokonań naukowców badających w przeszłości przeciwdrobnoustrojowe właściwości kwasów tłuszczowych (które w niniejszej pracy pełnią rolę nośników). Pierwszym naukowcem, który zaprezentował pracę sugerującą przeciwdrobnoustrojowe działanie kwasów tłuszczowych był Burtenshaw [75]. Dalsze badania wykazały, że kwasy tłuszczowe o długich łańcuchach węglowodorowych (16-20 atomów węgla) rzeczywiście mogą wykazywać właściwości przeciwdrobnoustrojowe [76-80]. Dodatkowo Drake i współpracownicy przedstawili wyniki świadczące o tym, że sfinozyna będąca aminoalkoholem o osiemnastu węglach wykazuje właściwości przeciwgrzybowe (MIC względem *C.albicans* 6-10 µg/ml) [81].

2.3. Mechanizmy działania inhibitorów enzymatycznych, składników koniugatów będących przedmiotem badań

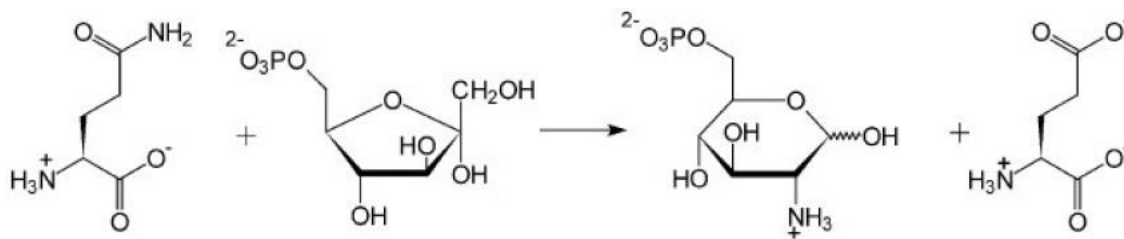
2.3.1. Mechanizm działania kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego

W terapiach przeciwgrzybowych często głównym problemem jest toksyczność związana z brakiem selektywności działania leku względem komórek gospodarza. Dlatego ważne jest, aby znaleźć odpowiednie różnice między komórkami atakującego mikroorganizmu a komórkami pacjenta. Syntaza glukozamino-6-fosforanu jest enzymem biorącym udział w syntezie aminocukrów, będącymi składnikami ważnych polisacharydów ściany komórkowej czyli chityny i mannoprotein. Enzym ten katalizuje pierwszy etap syntezy UDP-N-acetyloglukozaminy (dalej nazywanej UDP-GlcNAc). Glukozamino-6-fosforan jest przekształcany w kolejnych etapach w UDP-GlcNAc, który jest głównym substratem w biosyntezie polisacharydów ściany. Opiswany szlak przedstawiono na rysunku 11.



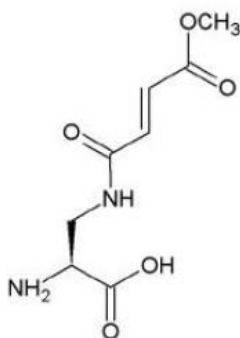
Rys.11. Szlak biosyntezy aminocukrów [82]. Czerwoną przerywaną linią zaznaczono etap przekształcenia fruktozo-6-fosforanu w glukozamino-6-fosforan.

Substratami syntazy glukozamino-6-fosforanu są D-fruktozo-6-fosforan i L-glutamina. Schemat katalizowanej reakcji przedstawiono na rysunku 12.



Rys.12. Reakcja katalizowana przez syntazę GlcN-6-P [83].

Enzym ten występuje zarówno w komórkach ludzkich jak i grzybowych, jednak jakościowo różne konsekwencje zahamowania jego aktywności stanowią podstawę selektywnej toksyczności inhibitorów tego enzymu. W przypadku inhibicji syntazy GlcN-6-P w komórkach grzybowych zachodzi zmiana morfologiczna, aglutynacja a następnie liza komórki. Dla ssaków ta inhibicja nie jest groźna ze względu na dłuższy cykl życiowy komórki i szybszą ekspresję genów kodujących enzym. Skutecznym inhibitorem syntazy GlcN-6-P jest otrzymany w Katedrze Technologii Leków i Biochemii analog L-glutaminy - kwas N³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowy (FMDP). Strukturę FMDP przedstawiono na rysunku 13.



Rys.13. Struktura FMDP

FMDP jest analogiem glutaminy i pełni rolę nieodwracalnego inhibitora blokującego N-końcową domenę enzymu przyłączającą w normalnych warunkach glutaminę. Inhibicja tego enzymu zachodzi poprzez kowalencyjną modyfikację jego grupy sulfhydrylowej w centrum aktywnym enzymu, co blokuje produkcję makrocząsteczek zawierających aminocukry. Dezaktywacja następuje poprzez wiązanie kowalencyjne z grupami sulfhydrylowymi cysteiny za pośrednictwem addycji Michaela [5]. Co ciekawe, FMDP wykazuje selektywność względem syntazy glukozamino-6-fosforanu i nie łączy się z innymi enzymami tej grupy (amidotransferazami). Jest to związane z różnicą geometrii pomiędzy pozostałymi enzymami a badaną syntazą GlcN-6-P [84]. Należy zauważyć, że FMDP skutecznie hamuje aktywność syntazy GlcN-6-P. Jednak jego wartość MIC wobec komórek *C. albicans* przekracza 200 µg/ml, co jest spowodowane utrudnionym transportem tego związku do wnętrza komórek grzybowych.

Znacznie wyższą od FMDP aktywność przeciwgrzybową wykazują di- i tripeptydy zawierające ten aminokwas, szczególnie Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP [85]. Pierwszy z tych związków bardzo silnie hamuje wzrost komórek *Candida albicans* wielolekoopornych z uwagi na nadekspresję genów *CDR1* i

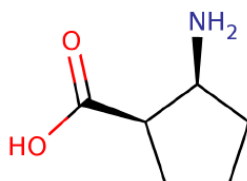
CDR2 [86]. FMDP-peptydy są transportowane do komórek przez permeazy oligopeptydowe, a wewnątrz hydrolizowane przez peptydazy z uwolnieniem FMDP. Istotną ich wadą jest indukowanie swoistej oporności komórek grzybowych [87]. Poprawę aktywności przeciwgrzybowej FMDP uzyskano także w wyniku przekształcenia tej cząsteczki w estry acetoksymetylowe [88].

Kolejnym przykładem zastosowania układu FMDP:nośnik były koniugaty opisane w pracy Pawlak i współpracowników [89]. Wyniki badań przedstawione w tej pracy dotyczą modyfikacji FMDP, które prowadzą do zwiększenia jego lipofilowości. Otrzymane struktury były estrowymi pochodnymi FMDP z grupą ketonową lub amidową. Otrzymane związki wykazywały właściwości przeciwgrzybowe względem szczepu *C. albicans ATCC 10231* i nie wykazywały lub wykazywały słabe właściwości przeciwbakteryjne. Najlepsze właściwości przeciwgrzybowe wykazywały estrowe pochodne FMDP z ugrupowaniem ketonowym (MIC_{50} względem *C.albicans* wynosił 0,25 – 0,5 $\mu\text{g/ml}$). Dodatkowo IC_{50} wspomnianych związków określone jako zdolność inhibitora do 50% inhibicji enzymu, było bardzo podobne do IC_{50} samodzielnego FMDP (odpowiednio ok. 5 μM i 4 μM). Zastosowanie w tym przypadku modyfikacji o charakterze estrowym miało taki sam cel i przesłankę jak zastosowanie modyfikacji o charakterze lipidowym opisane w poprzednim rozdziale.

Ostatnim przykładem zastosowania koniugacji FMDP z nanonośnikami jest podejście opisane w pracy Schielmann i współpracowników [90]. W tym przypadku otrzymano i zbadano koniugaty oligopeptydów pełniących rolę nośnika oraz FMDP jako inhibitora o potencjalnym działaniu przeciwgrzybowym. Oligopeptydy przyłączane do FMDP opisane w tej pracy były dotychczas uważane za tzw. "małe peptydy penetrujące". Koniugaty tych oligopeptydów z FMDP wykazały silne działanie przeciwgrzybowe, jednakże okazało się, że wnikają one do komórek grzybowych za pośrednictwem permeaz oligopeptydowych, zatem oligopeptydy wykorzystane jako nośniki, nie są klasycznymi CPP.

2.3.2. Mechanizm działania cispentacyny

Cispentacyna jest cyklicznym β -aminokwasem, który pierwszy raz wyizolowano z *B. cereus* i *S. setonii* [7]. Udowodniono, że wykazuje właściwości przeciwgrzybowe w układach *in vivo*. Mechanizm jej działania przeciwgrzybowego polega na inhibicji syntetazy izoleucylo-tRNA i syntetazy prolylo-tRNA, co powoduje zaburzenie syntezy białek w komórkach grzybowych. W ten sposób wzrost komórki zostaje zablokowany i następuje jej śmierć. Strukturę cząsteczki przedstawiono na rysunku 14.

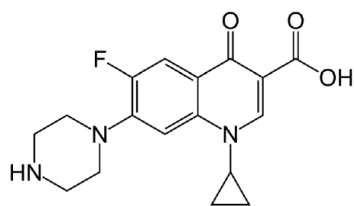


Rys.14. Struktura chemiczna cispentacyny.

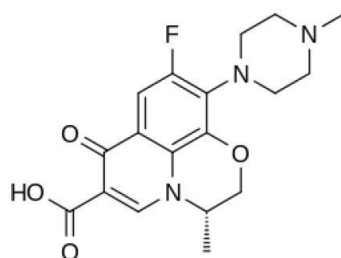
Transport cząsteczki cispentacyny do wnętrza komórki grzybowej następuje poprzez permeazy aminokwasowe, szczególnie permeazy prolinowe. Cispentacyna charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie oraz amfoterycznością. Jej IC_{50} i IC_{100} względem *C. albicans* obejmuje odpowiednio zakresy 6,3 - 12,5 oraz 6,3 - 50 $\mu\text{g/ml}$ [91].

2.3.3. Mechanizm działania chemoterapeutyków chinolonowych

Fluorochinolony łączą się specyficznie zarówno z gyrazą DNA i samym DNA oraz topoizomerazą IV. Wskutek takiej stabilizacji kompleksu gyraza-DNA przesunięcie widełek replikacyjnych zostaje zaburzone i następuje śmierć komórkowa. Związki chinolonowe to chemoterapeutyki, które są szeroko stosowane w infekcjach bakteryjnych. Działają na zasadzie inhibicji bakteryjnej topoizomerazy II i topoizomerazy IV. Współcześnie najczęściej stosuje się fluorochinolony II i III generacji. Fluorochinolony II generacji takie jak ciprofloksacyna, są aktywne wobec bakterii G(-). Fluorochinolony III generacji (np. lewofloksacyna) są aktywne wobec bakterii G(+), ale kosztem aktywności wobec bakterii G(-). Strukturę lewofloksacyny i ciprofloksacyny przedstawiono na rysunku 15 i 16.

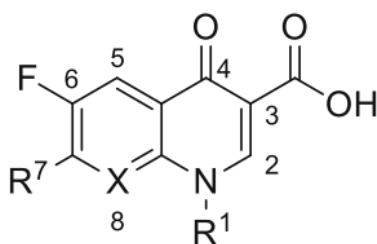


Rys.15. Struktura ciprofloksacyny.



Rys.16. Struktura lewofloksacyny.

Struktura chinolonów jest oparta na pierścieniu 4-chinolonu. Są to pochodne kwasu chinolinokarboksylowego, który w pozycji 4 bicyklicznego heteroaromatycznego pierścienia zawiera grupę karbonylową, a w pozycji 3 - karboksylową. Ich główne właściwości fizyko-chemiczne to lipofilowość, amfoteryczność i słaba rozpuszczalność w wodzie. Chinolony wykazują działanie przeciwbakteryjne. Ich aktywność polega na zmianie orientacji przestrzennej nici, co ułatwia kopiowanie materiału genetycznego. Poza gyrazą DNA, chinolony blokują również topoizomerazę IV, która ma za zadanie uwolnienie potomnych chromosomów oraz ich rozluźnienie i pełne ukształtowanie. Na rysunku 17 przedstawiono ogólną strukturę fluorochinolonów [92]. Uważa się, że pozycja 7 jest miejscem oddziaływania cząsteczki z gyrazą DNA [93, 94].



Rys.17. Ogólna struktura fluorochinolonów [92]. Uważa się, że pozycja 7 jest miejscem oddziaływania z gyrazą DNA [93, 94].

Chinolony są stężeniezależne, co oznacza, że stosuje się ich wysokie stężenia przez krótki czas. Dość powszechnym zjawiskiem jest nabywanie oporności przez drobnoustroje na działanie tych chemoterapeutyków. W przypadku nabycia oporności względem działania jednego fluorochinolonu,

występuje oporność na resztę związków z danej grupy. Ze względu na doniesienia o niepożądanych skutkach ubocznych głównie związanych z układem mięśniowym, zaleca się stosowanie fluorochinolonów jedynie w skrajnych przypadkach.

Poza wcześniej przytoczonymi przykładami zastosowania fluorochinolonów w leczeniu infekcji grzybowych lub bakteryjnych, można wskazać również inne prace na ten temat obecne w literaturze naukowej.

Przykładem ciekawej pracy mogą być badania Gu i współpracowników, którzy otrzymali koniugaty mikonazolu i ciprofloksacyny [95]. Taki rodzaj koniugatu miał za zadanie wykazać działanie synergistyczne. Otrzymane związki zbadano względem szczepów bakteryjnych i grzybowych. Okazało się, że jeden ze związków wykazał lepsze właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe niż odpowiednio ciprofloksacyna lub mikonazol.

Innym przykładem jest praca Xiao i współpracowników, która dotyczyła przeciwdrobnoustrojowego działania koniugatów ciprofloksacyny i naringeniny [96]. Naukowcy wykazali, że otrzymane przez nich związki wykazują aktywność zarówno przeciwbakteryjną jak i przeciwgrzybową. Zatem po raz kolejny okazało się, że odpowiednia modyfikacja ciprofloksacyny (w tym przypadku dołączenie jej do inhibitora pompy efluksowej) może prowadzić do uzyskania związku o świetnych właściwościach przeciwgrzybowych.

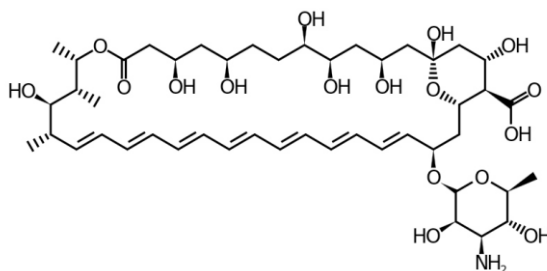
Zespół Juárez-Hernándeza zaproponował koniugat ciprofloksacyny z sideroforem, gdzie części koniugatu były ze sobą połączone ugrupowaniem maleimidowym [97]. Taki związek wykazywał właściwości przeciwbakteryjne m.in. względem *S. aureus* (MIC = 31,25µM). Innym przykładem koniugatów fluorochinolonów z sideroforami jest praca Ji i Millera [98]. W tym przypadku zastosowano łącznik typu „*trimethyl-lock*”. Okazało się, że koniugaty zawierające w swojej strukturze taki łącznik, który pod wpływem redukujących warunków środowiska miał za zadanie uwalniać cząsteczkę antybiotyku z układu, wykazywał bardzo dobre właściwości przeciwbakteryjne.

Przypuszcza się zatem, że chinolony mogą mieć również zastosowanie w infekcjach grzybiczych, stąd dwa z nich – ciprofloksacyna i lewofloksacyna – zostały przebadane przez autora w ramach niniejszego doktoratu [99].

2.4. Mechanizm działania innych związków użytych w badaniach

2.4.1. Mechanizm działania makrolidowych antybiotyków polienowych

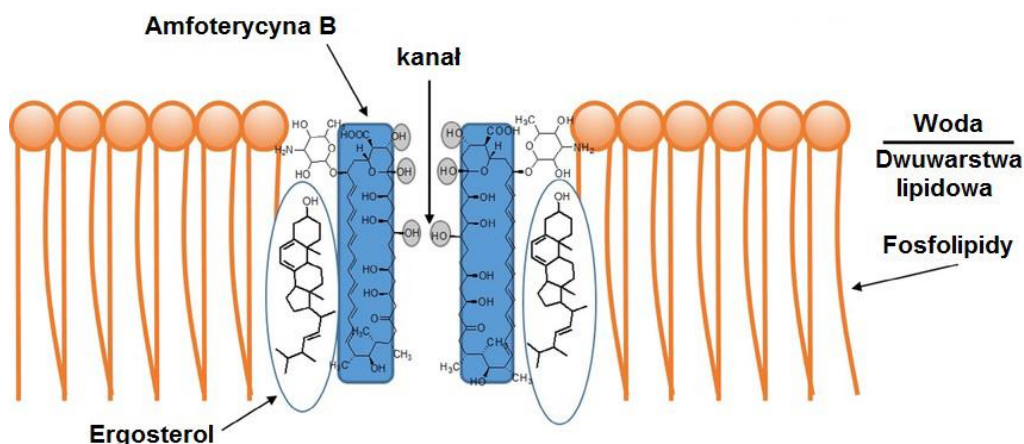
Makrolidowe antybiotyki polienowe to antybiotyki przeciwgrzybowe, które składają się z wielocłonowego pierścienia z chromoforowym fragmentem polienowym. Członami takiego pierścienia, poza sztywnymi fragmentami polienowymi, są elastyczne hydrofilowe fragmenty z grupami hydroksylowymi i ketonowymi. Opisywane człony są ułożone względem siebie w sposób naprzeciwległy. Większość polienów ma charakter amfoteryczny. Poniżej przedstawiono cząsteczkę amfoterycyny B, która jest sztandarowym przykładem antybiotyku polienowego.



Rys.18. Cząsteczka amfoterycyny B.

Obecność hydrofilowych i hydrofobowych fragmentów pozwala na wykorzystanie w terapiach przeciwgrzybowych związanych z nimi właściwości. Im pierścień występujący w cząsteczce antybiotyku jest większy i ma większy stopień nienasycenia, tym antybiotyk ma lepsze właściwości przeciwgrzybowe. Największą aktywność przeciwgrzybową wykazują związki z łańcuchem bocznym z aminą aromatyczną. Niestety z wysoką aktywnością przeciwgrzybową wiąże się większa toksyczność względem komórek ssaczy. Przykładowo amfoterycyna B powoduje hepatotoksyczne i nefrotoksyczne działania niepożądane. Antybiotyki polienowe najczęściej dzieli się ze względu na ilość podwójnych wiązań w cząsteczce. W ten sposób można wyróżnić: trieny, tetraeny, pentaeny, heksaeny i heptaeny. Występują również cząsteczki o dwóch lub ośmiu wiązaniach podwójnych odpowiednio: monorden i epirodyna. Najczęściej wykorzystywane są tetraeny i heptaeny.

Pod względem biologicznym makrolidowe antybiotyki polienowe wykazują aktywność w stosunku do znacznej części grzybów, drożdżaków i pierwotniaków. Przeciwgrzybowy mechanizm działania polienów polega na wiązaniu się ze steroidami będącymi w błonie komórkowej grzybów np. z ergosterolem. Prowadzi to do zwiększenia przepuszczalności błony względem jonów potasu i aminocukrów z wnętrza komórki. W konsekwencji powoduje to zaburzenie procesów metabolicznych i śmierć komórki. Oddziaływanie pomiędzy cząsteczką antybiotyku i sterolu polega na powstaniu kompleksu połączonego ugrupowaniem chromoforowym, które jest stabilizowane głównie przez siły hydrofobowe. Drugim mechanizmem działania jest tworzenie wiązania wodorowego pomiędzy polarną częścią pierścienia i grupą hydroksylową sterolu. Opisywaną sytuację przedstawia rysunek 19.



Rys.19. Schematyczny mechanizm działania amfoterycyny B. Cząsteczka łączy się z ergosterolem i tworzy kanał w błonie komórkowej, który powoduje wypływ jonów i substancji odżywczych [100].

Tworzenie kompleksu antybiotyków - sterol jest możliwe w stosunku 1 mol sterolu do 1 mola antybiotyku lub 2 mole sterolu do 1 mola antybiotyku. W konsekwencji tworzenie kompleksu powoduje zmianę położenia sterolu, a więc zaburzenie struktury i funkcjonowania błony komórkowej – wyciek istotnych składników cytozolu. Najpierw na zewnątrz komórki wydostają się jony potasu, a następnie jony o większej średnicy, cząsteczki obojętne i makrocząsteczki. Niestety w stosowaniu antybiotyków polienowych w przypadku zachorowań na grzybice układowe występują znaczące problemy. Należy zauważyć, że w komórkach ssaczych również występują steroidy (np. cholesterol). Stąd wynika toksyczność antybiotyków polienowych względem komórek ludzkich. Zatem pierwszym problemem jest bardzo niska selektywność względem komórek grzybowych (a nie ssaczych), co skutkuje znaczącą toksycznością względem komórek zainfekowanego organizmu. Drugim, mniej znaczącym problemem jest nierozpuszczalność makrolidów polienowych w wodzie. Jest to problem o tyle istotny, że toksyczność względem komórek ssaczych związana jest z tworzeniem agregatów tych cząsteczek w środowisku wodnym, dlatego te dwa problemy są kluczowe w pracach nad udoskonaleniem i ulepszeniem skuteczności terapii przeciwgrzybowych.

Dodatkowo można przytoczyć pracę Shu i współpracowników, którzy przedstawili wyniki dotyczące koniugatów hydrożeli z amfoterycyną B [101]. Otrzymane koniugaty wykazywały aktywność przeciwgrzybową względem komórek *C. albicans* porównywalną do amfoterycyny B. Dodatkowo wykazywały lepsze właściwości związane z biokompatybilnością i biodegradowalnością.

Innym przykładem zastosowania koniugatów makrolidowych antybiotyków polienowych może być praca Gurudevana i współpracowników dotycząca koniugatów amfoterycyny B i albuminy [102]. Z ich badań wynika, że tak otrzymany koniugat jest lepiej rozpuszczalny w wodzie niż natywny antybiotyk. Nie wykazywał również cytotoksyczności względem linii komórkowej HEK 293T w badanych zakresach stężeń (do ok. 30 µg/ml AmB) oraz nie wykazywał właściwości hemolitycznych (do ok. 12 µg/ml AmB). Co istotne, wykazywał również bardzo dobre właściwości przeciwgrzybowe względem szczepu *C. albicans* (MIC = 0,87 µg/ml, gdzie dla natywnej AmB uzyskuje wyniki MIC = 0,53 µg/ml).

Kolejnym przykładem jest praca Wu i współpracowników dotycząca koniugatów amfoterycyny B z nanorurkami węglowymi [103]. Naukowcy w swojej pracy przedstawili koniugaty AmB zarówno z jednościennymi jak i wielościennymi nanorurkami węglowymi. Takie koniugaty wykazują aktywność przeciwgrzybową na poziomie MIC = 6,4 µg/ml dla koniugatów z wielościennymi nanorurkami oraz MIC = 13,8 µg/ml dla koniugatów z jednościennymi nanorurkami.

Następnym, ciekawym przykładem jest koniugat amfoterycyny B i arabinogalaktanu. Badania dotyczące tego związku przedstawił Falk i współpracownicy [104]. Arabinogalaktan to biopolimer, który składa się z arabinozy i galaktozy. Dołączenie do niego amfoterycyny B może skutkować polepszeniem rozpuszczalności związku w rozpuszczalnikach wodnych, zwiększeniem okresu półtrwania leku oraz zwiększeniem aktywności i selektywności leku wobec wybranych komórek. Zaproponowany koniugat wykazywał właściwości przeciwgrzybowe względem szczepu *C. albicans* oraz *C. neoformans* na poziomie MIC = 0,12 – 0,25 µg/ml. Badanie właściwości hemolitycznych wykazało, że koniugaty wywołują hemolizę w zdecydowanie niższym stopniu niż natywny antybiotyk (EH >1 mg/ml dla koniugatów i EH = 0,008 mg/ml dla amfoterycyny B). Koniugat okazał się również mniej toksyczny niż natywna forma leku. Maksymalna tolerowana dawka (MTD) dla mysiego modelu *in vivo* wynosiła 50 mg/kg dla koniugatu w porównaniu do 4 mg/kg dla AmB.

Ostatnim przykładem jest praca Halperina i współpracowników [105]. Zaproponowali oni koniugat amfoterycyny B i politlenku etylenu (PEG). Taki związek wykazywał właściwości przeciwgrzybowe względem *C. albicans*, *C. krusei* oraz szczepów z rodzaju *Aspergillus* i *Rhizopus* podobne do natywnej amfoterycyny B. Przykładowo minimalne stężenie hamujące i minimalne stężenie grzybobójcze względem *C. albicans* badanego koniugatu wynosiło odpowiednio MIC = 2 µg/ml i MFC = 4 µg/ml. Ponadto, takie koniugaty wykazywały niższe właściwości hemolityczne niż amfoterycyna B oraz są ok. 40 razy mniej toksyczne niż amfoterycyna B (IC₅₀ = 280 µg/ml dla koniugatu i IC₅₀ = 6,6 µg/ml dla amfoterycyny B). Wykonano również badania na mysim modelu *in vivo* i dla amfoterycyny B, gdzie LD₅₀ wносиło 1,2 mg/kg masy ciała, a w przypadku koniugatów w badanym zakresie stężeń nie osiągnięto dawki LD₅₀.

Wskazane w tej części związki chemiczne zostały scharakteryzowane i zbadane, a wyniki ich dotyczące przedstawiono w kolejnej części pracy – części doświadczalnej.

3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3.1. Materiały

3.1.1. Drobnoustroje i linie komórek ssaczych wykorzystywane w badaniach

Tab.2. Drobnoustroje grzybowe.

Nazwa szczepu	Opis
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	szczep muzealny z kolekcji ATCC
<i>Candida albicans</i> SC 5314 (ATCC MYA-2876)	szczep muzealny z kolekcji ATCC
<i>Candida glabrata</i> DSM 11226	szczep muzealny z kolekcji DSM
<i>Candida krusei</i> DSM 6128	szczep muzealny z kolekcji DSM
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	szczep muzealny z kolekcji DSM
<i>Candida albicans opt1-opt5Δptr2Δptr22Δ</i>	mutant <i>C. albicans</i> SC 5314 pozbawiony permeaz peptydowych

Tab.3. Drobnoustroje bakteryjne.

Nazwa szczepu	Opis szczepu
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	indukowana ekspresja AmpC β-laktamazy
<i>E. coli</i> ATCC 25922	β-laktamazo-ujemny
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	koagulazo-ujemny; wrażliwy na wankomycynę
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	β-laktamazo-ujemny, mecA ujemny

Tab.4. Komórki ssacze.

Nazwa linii	Opis linii
Hep G2	ludzkie komórki nowotworu wątroby
LLC-PK1	komórki prawidłowe, nabłonkowe izolowane z nerki 3-4 tygodniowych samców świń
HEK-293T	ludzkie komórki embrionalne nerek wyhodowane w 1973
Erytrocyty ludzkie	Izolowane z krwi ludzkiej (Stacja krwiodawstwa)

3.1.2. Podłoża stosowane w hodowlach drobnoustrojów i komórek ssaczych

W badaniach wykorzystano podłoża płynne i stałe, których skład i sposób przygotowania zestawiono poniżej.

Podłoże Saboraud

- glukoza 20 g/L
- ekstrakt drożdżowy 10 g/L
- pepton 10 g/L

Składniki rozpuszczano w wodzie destylowanej, a następnie poddano sterylizacji w autoklawie w temperaturze 121 °C, pod ciśnieniem 1,5 atmosfery przez 30 minut. W celu otrzymania podłoża stałego dodawano agar mikrobiologiczny (20 g/L).

Podłoże YNB z siarczanem amonu (YNB-SA), pH 5,4± 0,2

- glukoza 20 g/L
- YNB bez aminokwasów, z siarczanem amonu 6,7 g/L

Wszystkie składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej, a następnie przefiltrowano do jałowego pojemnika.

Podłoże RPMI-1640 pH 7,0

- glukoza 18 g/L
- RPMI-1640 bez wodorowęglanu sodu, z L-glutaminą 10,4 g/L
- MOPS 34,5 g/L

Składniki rozpuszczano w wodzie destylowanej, w przypadku podłoża RPMI-1640 ustalano pH 7,0 za pomocą 10 mM roztworu NaOH, a następnie sterylnie przepuszczano przez filtr membranowy do jałowej butli.

Podłoże MHBII pH 7,3

- Ekstrakt wołowy 3 g/L
- Kwaśny hydrolizat kazeiny 17,5 g/L
- Skrobia 1,5 g/L

Podobnie jak w przypadku podłoża YNB wszystkie składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej, a następnie przefiltrowano do jałowego pojemnika.

Podłoże LB (Luria-Bertani) pH 7,5

- pepton 10 g/L
- ekstrakt drożdżowy 10 g/L
- NaCl 10g/L

Podobnie jak w przypadku podłoża YNB wszystkie składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej, a następnie przefiltrowano do jałowego pojemnika. W celu otrzymania podłoża stałego (dalej nazywanego podłożem LA) dodawano agar mikrobiologiczny (15 g/L). Wymagane pH podłoża ustalono za pomocą NaOH.

Do hodowli komórkowych wykorzystano podłoże nr 199 z dodatkiem 5% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), podłoże MEM Eagle z dodatkiem 10% FBS oraz podłoże DMEM również z dodatkiem 10% FBS.

3.1.3. *Inne odczynniki*

- antybiotyki: penicylina, streptomycyna, amfoterycyna B, nystatyna
- DMSO, metanol, kwas mrówkowy, chloroform, alkohol izoamylowy
- barwnik Hoechst 33324
- N-acetylo-glukozamina, L-izoleucyna
- bufor fosforanowy PBS, bufor boranowy TBE
- krew pełna pozyskana z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa
- płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*, FBS)
- sól tetrazolowa (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, MTT)
- esteraza z wątroby świni (Sigma-Aldrich, Merck)
- zestaw do relaksacji DNA topoizomerazy II (drożdże, Inspiralis)
- topoizomeraza II (drożdżowa)
- ceramiczne kulki (d=1,0 mm, $\rho = 5,0$ g/ml) w 2 ml próbkach firmy MP Biomedicals

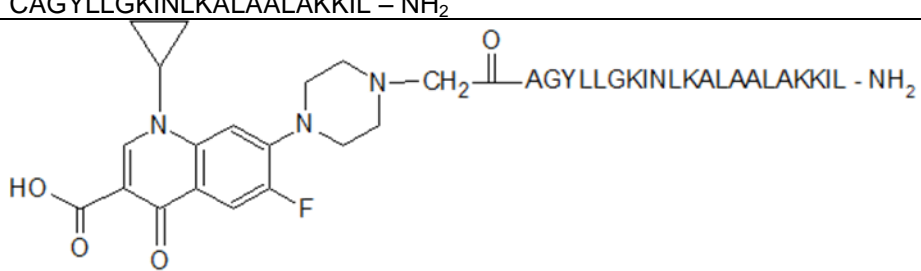
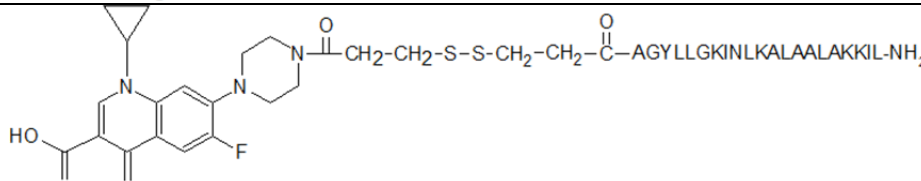
3.1.4. Sprzęt

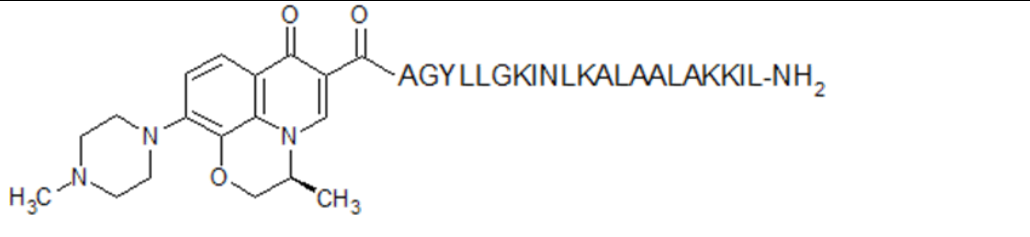
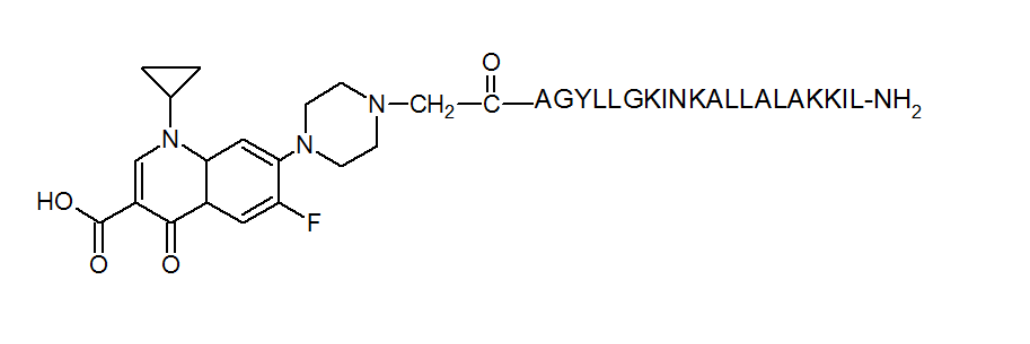
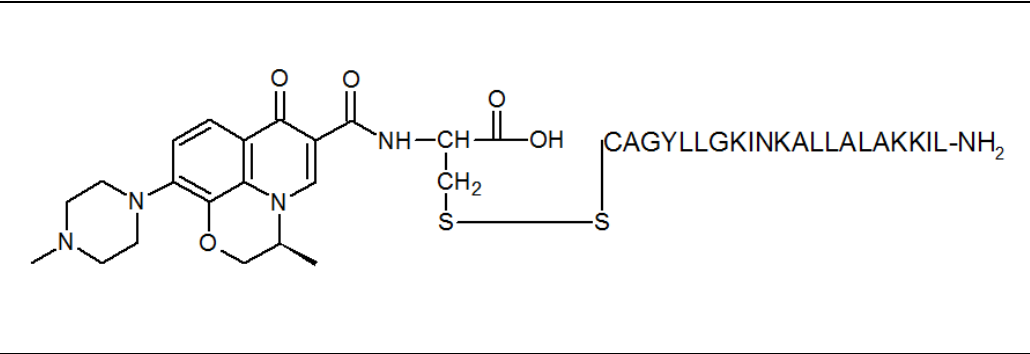
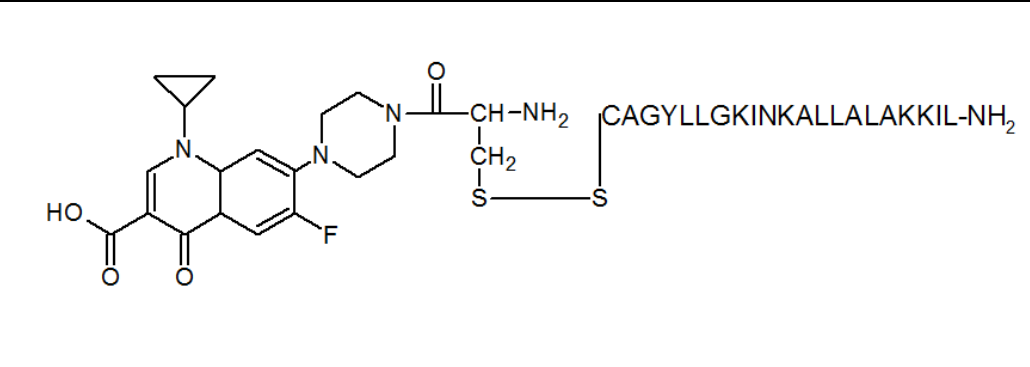
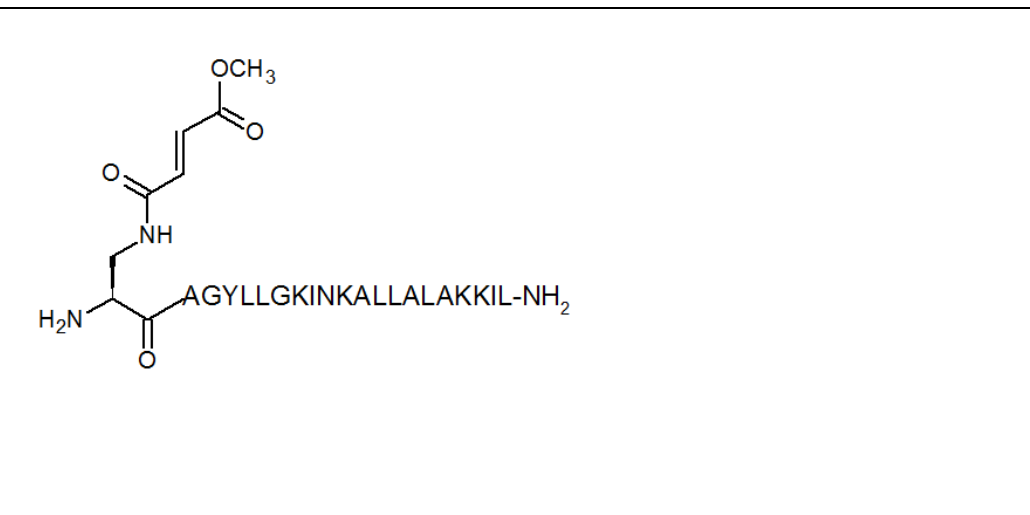
- czytnik płytek Victor³V, Perkin Elmer
- mikroskop fluorescencyjny Olympus BX60 U-DICT z kamerą DP50
- spektrofotometr ThermoSpectronic, Genesys 20
- spektrofotometr Perkin Elmer Lambda 20
- fluorymetr FluoroMax-Horriba-Yobin
- zestaw do wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) Agilent 1200 Series z detektorem MS (Centrum Doskonałości „ChemBioFarm”, zakup HPLC został sfinansowany z funduszy Unii Europejskiej, zakup detektora MS został sfinansowany ze środków Fundacji FOSTER)
- mikroskop konfokalny Carl Zeiss LSM 710 sfinansowany ze środków Fundacji FOSTER
- urządzenie do fotografowania żeli UVTEC Cambridge

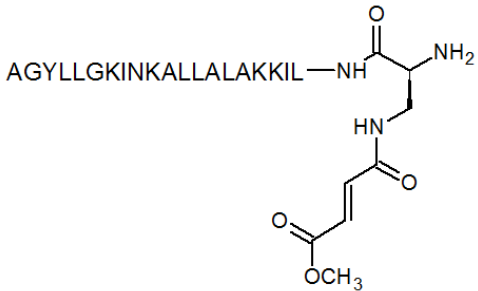
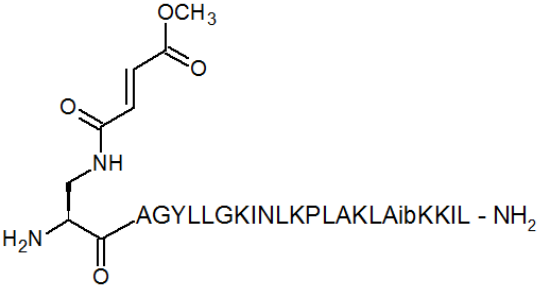
3.2. Badane związki

3.2.1. Koniugaty ciprofloksacyny, lewofloksacyny lub FMDP z peptydem penetrującym TP10

Tab.5. Koniugaty ciprofloksacyny, lewofloksacyny i FMDP z TP10-NH₂ lub TP10-7-NH₂.

Nazwa związku	Struktura związku
TP10-NH ₂	AGYLLGKINLKALAALAKKIL – NH ₂
TP10-7-NH ₂	AGYLLGKINLKPLAKLAibKKIL – NH ₂
CTP10-NH ₂	CAGYLLGKINLKALAALAKKIL – NH ₂
K-Pep-1	
K-Pep-2	

K-Pep-3	
K-Pep-4	
K-Pep-5	
K-Pep-6	
K-Pep-7	

K-Pep-8	
K-Pep-9	

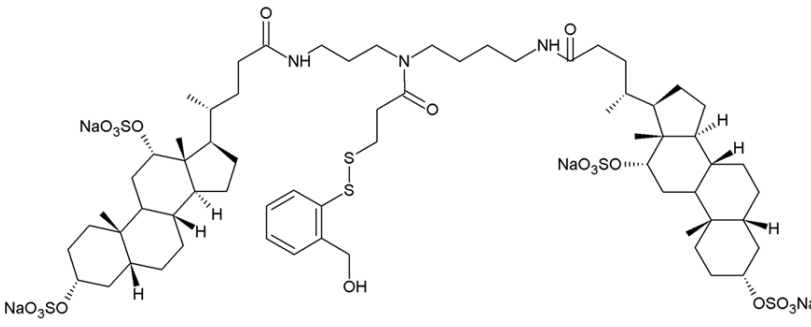
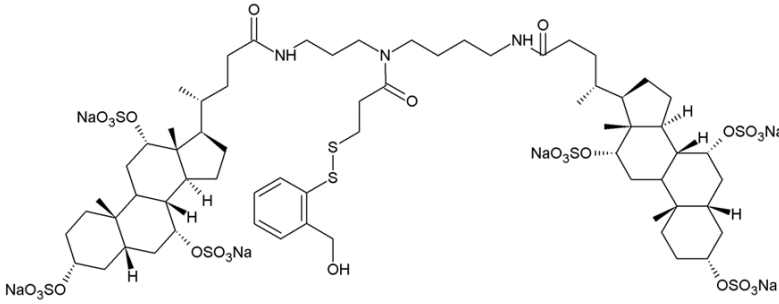
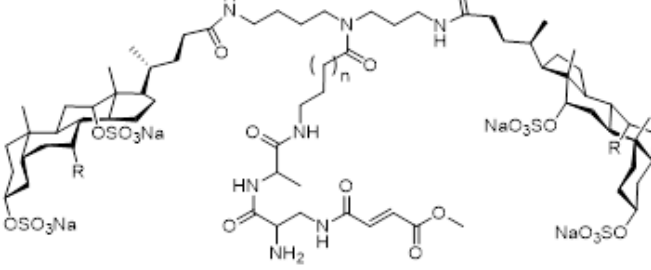
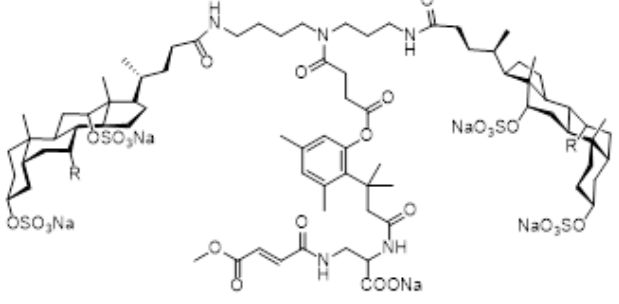
Dodatkowo w badaniu wykorzystano ciprofloksacynę i lewofloksacynę jako osobne związki oraz ciprofloksacynę, TP10 oraz ich koniugat (K-Pep-1) z dołączoną fluoresceiną.

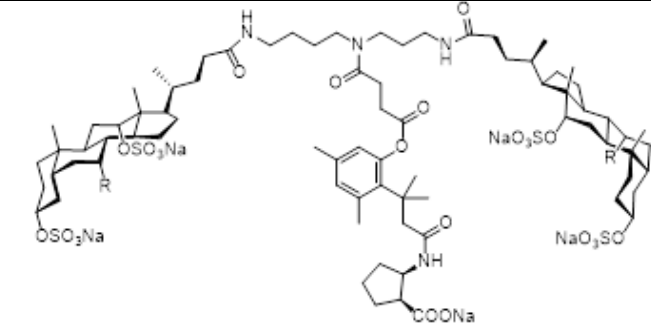
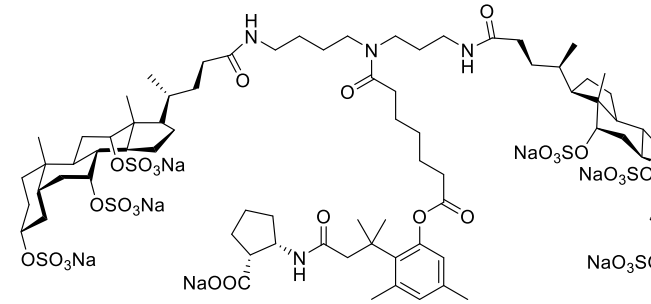
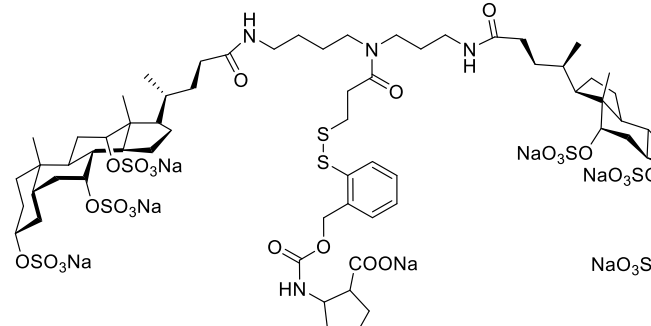
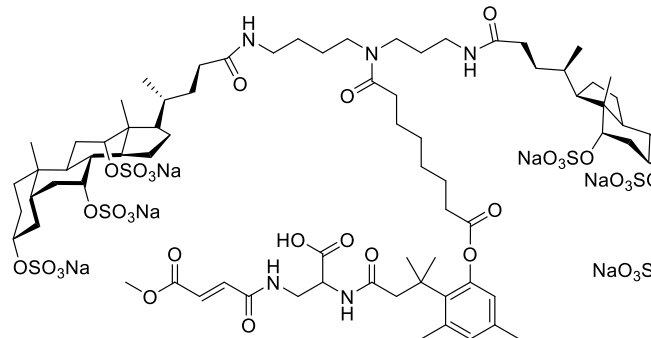
Koniugaty z peptydem TP10 zostały zsyntezowane przez mgr Katarzynę Olkiewicz pod opieką prof. dr hab. Krzysztofa Rolki z Pracowni Chemii Bioorganicznej, Katedry Biochemii Molekularnej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

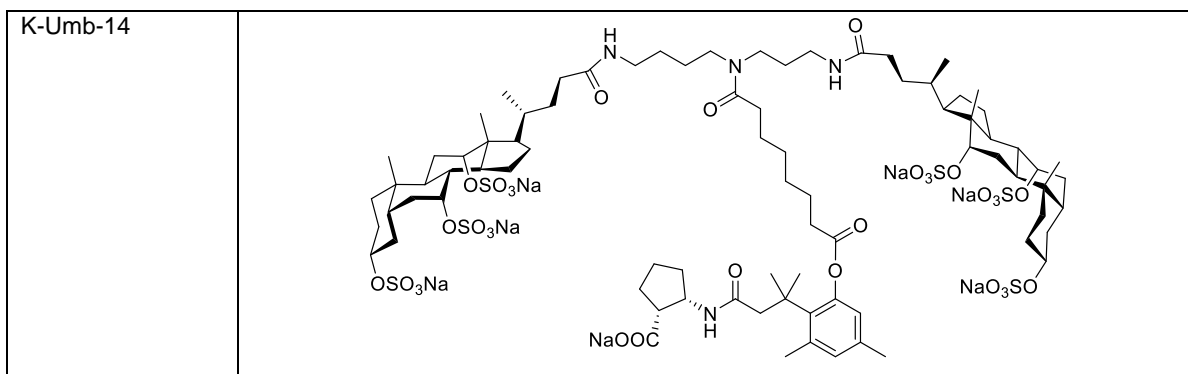
3.2.2. Koniugaty parasoli molekularnych z FMDP lub cispentacyną

Kolejną grupą związków były rozpuszczalne w wodzie koniugaty dwuściennych parasoli molekularnych z FMDP lub cispentacyną. Łącznikami pomiędzy parasolem a cząsteczką aktywną było wiązanie amidowe, wiązanie disiarczkowe lub TML. Struktury przedstawiono w tabeli poniżej (Tab.6. oraz Tab.7.).

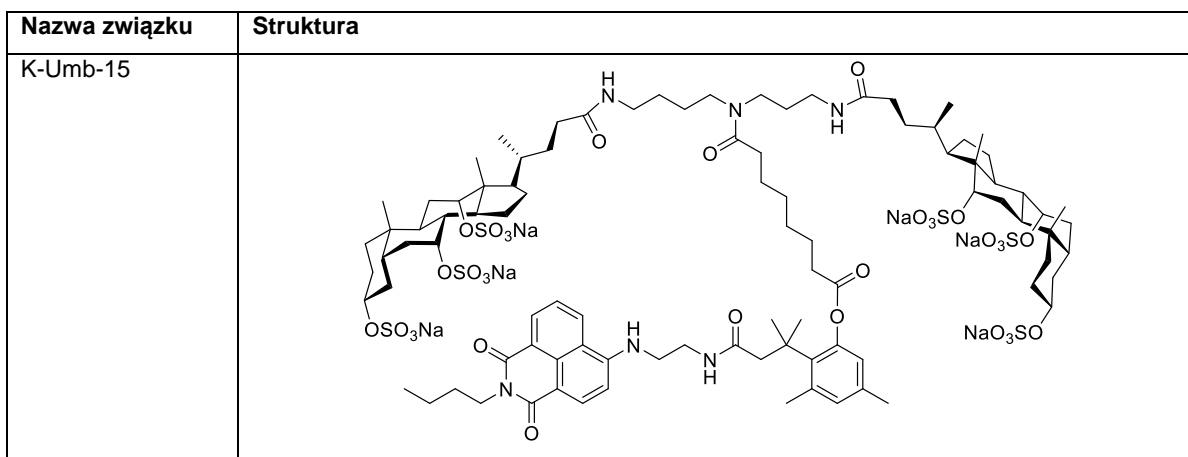
Tab.6. Struktury koniugatów parasoli molekularnych z FMDP lub cispentacyną.

Nazwa związku	Struktura
K-Umb-1	
K-Umb-2	
K-Umb-3 K-Umb-4 K-Umb-5 K-Umb-6	 <p data-bbox="606 1456 1173 1523"> K-Umb-4, R = H, n = 1 K-Umb-5, R = H, n = 5 K-Umb-3, R = H, n = 3 K-Umb-6, R = OSO₃Na, n = 5 </p>
K-Umb-7 K-Umb-8	 <p data-bbox="798 1904 1029 1960"> K-Umb-7, R = H K-Umb-8, R = OSO₃Na </p>

<p>K-Umb-9 K-Umb-10</p>	 <p>K-Umb-9, R = H K-Umb-10, R = OSO₃Na</p>
<p>K-Umb-11</p>	
<p>K-Umb-12</p>	
<p>K-Umb-13</p>	



Tab.7.Struktura koniugatu parasola molekularnego znakowanego fluorescencyjnie.

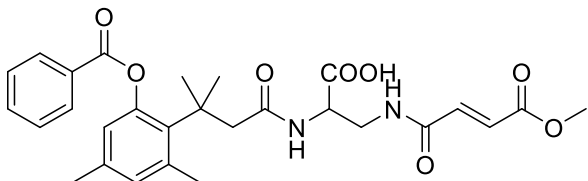
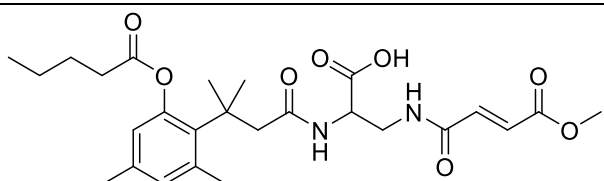
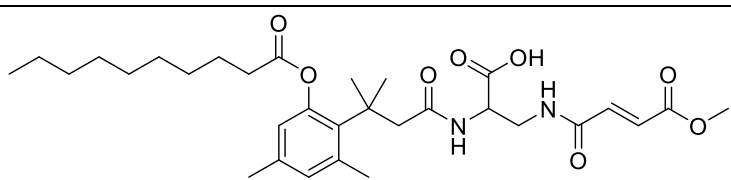
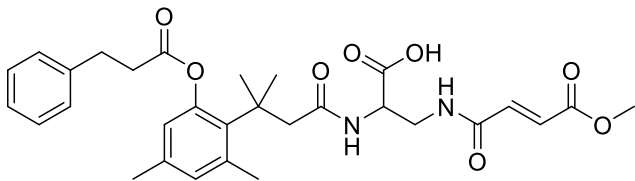
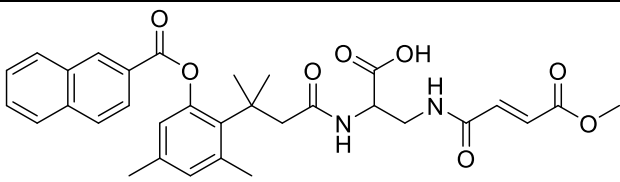
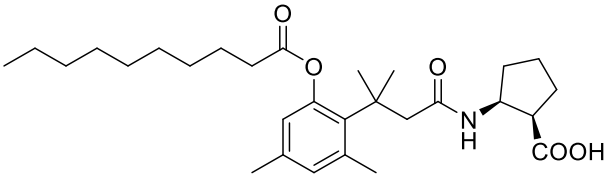


Przedstawione w powyższej tabeli (6., 7.) koniugaty zostały otrzymane przez dr inż. Andrzeja Skwareckiego z Katedry Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

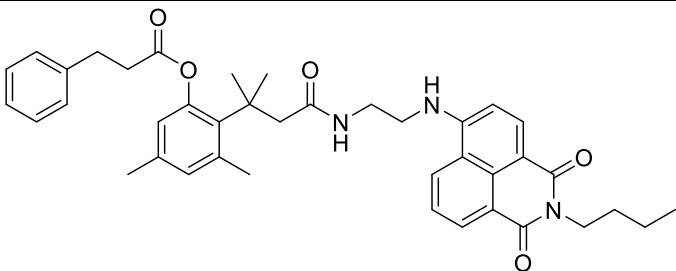
3.2.3. Koniugaty o charakterze lipidowym z FMDP i cispentacyną

Kolejną grupą związków badanych w niniejszej pracy były koniugaty o charakterze lipidowym zawierające w swojej strukturze FMDP lub cispentacynę. Łącznikiem pomiędzy ugrupowaniem lipidowym a częścią aktywną było ugrupowanie TML. Struktury związków wykorzystanych w pracy przedstawiono w tabeli 8. oraz tabeli 9.

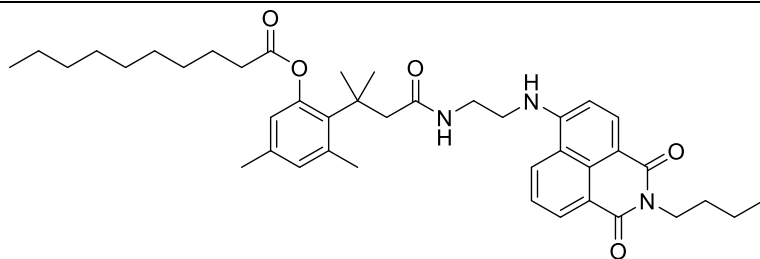
Tab.8. Struktury koniugatów o charakterze lipidowym z FMDP lub cispentacyną wykorzystane w pracy.

Nazwa związku	Struktura
K-Lip-1	
K-Lip-2	
K-Lip-3	
K-Lip-4	
K-Lip-5	
K-Lip-6	

Tab.9. Struktury koniugatów o charakterze lipidowym znakowanych fluorescencyjnie wykorzystane w pracy.

Nazwa związku	Struktura
K-Lip-7	

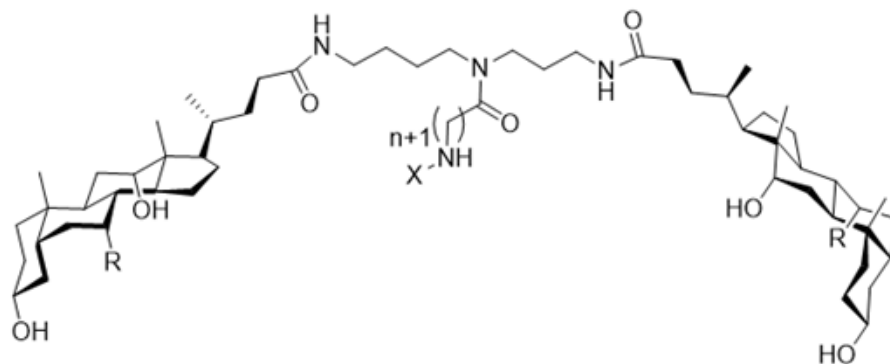
K-Lip-8



Koniugaty, których struktury przedstawiono w powyższych tabelach zostały otrzymane przez mgr inż. Michała Nowaka z Katedry Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej oraz dr inż. Andrzeja Skwareckiego z Katedry Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

3.2.4. Koniugaty parasoli molekularnych z makrolidowymi antybiotykami polienowymi

Ostatnią, dodatkową grupą przebadanych związków były koniugaty makrolidowych antybiotyków polienowych. W skład tej grupy wchodziły koniugaty z amfoterycyną B lub nystatyną o różnych długościach łącznika pomiędzy parasolem a związkiem aktywnym. Łącznik pomiędzy cząsteczką aktywną a nośnikiem miał charakter sztywny i nie ulegał rozkładowi pod wpływem oddziaływania z komórkami grzybowymi. Struktury badanych związków przedstawiono na rysunku 20-22.

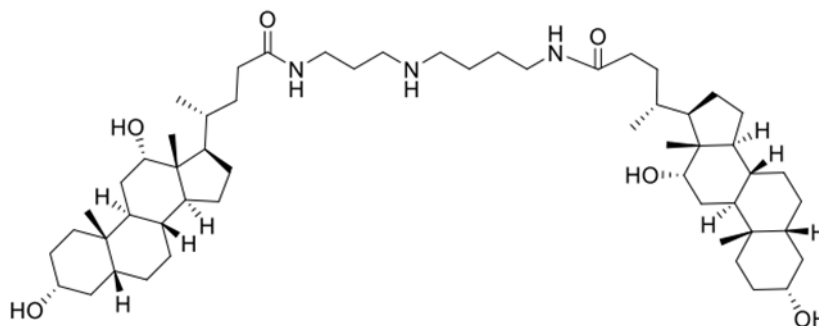


K-AmB-1, X = AmB, R = H, n = 1
K-AmB-2, X = AmB, R = H, n = 2
K-AmB-3, X = AmB, R = H, n = 4
K-AmB-4, X = AmB, R = H, n = 6
K-AmB-5, X = AmB, R = OH, n = 2
K-AmB-6, X = AmB, R = OH, n = 6

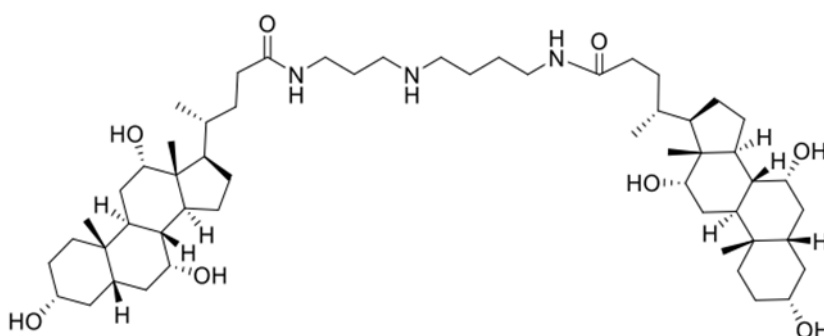
K-Nys-1, X = Nys, R = H, n = 1
K-Nys-2, X = Nys, R = H, n = 2
K-Nys-3, X = Nys, R = H, n = 4
K-Nys-4, X = Nys, R = H, n = 6
K-Nys-5, X = Nys, R = OH, n = 2
K-Nys-6, X = Nys, R = OH, n = 6

Rys.20. Struktury koniugatów parasoli molekularnych i makrolidowych antybiotyków polienowych

Dodatkowo zbadano również sam parasol deoksycholowy i cholowy oznaczony dalej odpowiednio K-Nat-1 i K-Nat-2.



Rys.21. Parasol molekularny spermidyny i kwasu deoksycholowego (K-Nat-1).



Rys.22. Parasol molekularny spermidyny i kwasu cholowego (K-Nat-2).

Przedstawione koniugaty zostały otrzymane przez dr inż. Kornelię Skarbek z Katedry Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej oraz dr inż. Andrzeja Skwareckiego z Katedry Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

3.3. Metody badawcze

3.3.1. Oznaczenie aktywności przeciwgrzybowej i przeciwbakteryjnej *in vitro*

Aktywność przeciwgrzybową lub przeciwbakteryjną określano poprzez wyznaczenie najmniejszego stężenia związku powodującego zahamowanie wzrostu danych komórek w 50%, 80% i 90%, odpowiednio MIC_{50} , MIC_{80} i MIC_{90} , metodą podwójnych seryjnych rozcieńczeń rekomendowaną przez Instytut ds. Klinicznych Standardów Laboratoryjnych (CLSI 2002; CLSI 2008; pod nazwą NCCLS do roku 2005), zachowując przy wszystkich oznaczeniach opisane w procedurze warunki (gęstość *inoculum*, czas i temperatura inkubacji) [107,108]. Badanie prowadzono w sterylnych 96-studzienkowych mikropłytkach w płynnych podłożach (RPMI-1640, YNB-SA dla komórek grzybowych i MHBII dla komórek bakteryjnych).



Po 24-godzinnej hodowli na podłożu stałym (LA w przypadku szczepów bakteryjnych lub Sabouraud w przypadku szczepów grzybowych), komórki badanego szczepu zawieszano w sterylnej wodzie destylowanej. Po ustawieniu odpowiedniej gęstości optycznej zawiesiny na poziomie około 0,1 tak, aby otrzymać odpowiednią gęstość komórek w zawieszynie około 10^6 komórek/mL, rozcieńczano je 50-krotnie lub 150-krotnie (odpowiednio dla komórek grzybowych i bakteryjnych).

Roztwory badanych związków przygotowywano w odpowiednich podłożach. Do studzienek pierwszego rzędu mikropłytki dodawano 200 μ L podłoża płynnego wraz z przygotowanym roztworem danego związku, a do studzienek rzędów 2-10 po 100 μ L odpowiednich podłoży. Po wykonaniu seryjnych rozcieńczeń, do studzienek 1-10 dodawano po 100 μ L uprzednio przygotowanej zawiesiny komórek. W niektórych przypadkach dodawano 90 μ L zawiesiny komórek oraz 10 μ L roztworu związku, którego wpływ na działanie koniugatu badano (np. N-acetylo-D-glukozaminy lub L-izoleucyny). Studzienka 12, do której dodano 100 μ L podłoża i 100 μ L inoculum, stanowiła kontrolę hodowli. Studzienka 11, natomiast, do której dodano 100 μ L podłoża i 100 μ L sterylnej wody destylowanej, stanowiła kontrolę podłoża. Po dodaniu 100 μ L inoculum przygotowanego w wodzie destylowanej lub samej wody destylowanej uzyskiwano we wszystkich studzienkach właściwe stężenie składników pożywki. Przedziały stężeń badanych związków zostały dobrane odpowiednio do testowanego szczepu, użytego podłoża, a także zakresów stężeń innych związków w przypadku badań porównawczych.

Płytki inkubowano w temperaturze 37°C (szczepy bakteryjne) i 35°C (szczepy grzybowe) przez 24 h. Po upływie tego okresu mierzono gęstość optyczną (przy $\lambda=531$ nm) we wszystkich studzienkach za pomocą czytnika mikropłytek Victor³V firmy Perkin Elmer. Od otrzymanych wartości absorbancji odejmowano wartość absorbancji odpowiadającą absorbancji kontroli pożywki. Wartości MIC₅₀, MIC₈₀ oraz MIC₉₀ odpowiadają stężeniu związku powodującemu odpowiednio 50%, 80% lub 90% spadek wartości absorbancji w stosunku do kontroli hodowli (wartość absorbancji mniejszą lub równą odpowiednio 50%, 20% lub 10% wartości absorbancji kontroli hodowli). Wartości te wyznaczano na podstawie krzywych $A=f(c)$. Badania wykonywano przynajmniej w trzech, niezależnych powtórzeniach.

3.3.2. Wyznaczenie krytycznego stężenia agregacji koniugatów parasoli molekularnych z amfoterycyną B

Wyjściowe roztwory AmB i jej koniugatów z parasolami molekularnymi oraz ich kolejne, seryjne dwukrotne rozcieńczenia sporządzano w DMSO. Z tych roztworów pobierano próbki o objętości 75 μ L i wprowadzano do probówek zawierających 4,925 mL PBS. W ten sposób otrzymano serię roztworów w stężeniach od 15 μ M do 0,2 μ M. Po wymieszaniu roztworów przy użyciu wyrzaskarki (vorteksu) były one przenoszone do kuwet o objętości 1,6 mL i wykonywano ich widma UV-vis w zakresie 250-500 nm, w temperaturze 37 °C. Wartości krytycznego stężenia agregacji (cac)

wyznaczano z wykresów zależności molarnego współczynnika ekstynkcji przy długości fali 409 nm w funkcji odwrotności stężenia związku.

3.3.3. Wyznaczenie krytycznego stężenia agregacji koniugatów parasoli molekularnych z nystatyną

Wyjściowe roztwory nystatyny i jej koniugatów z parasolami molekularnymi oraz ich kolejne, seryjne dwukrotne rozcieńczenia sporządzano w DMSO. Z tych roztworów pobierano próbki o objętości 75 μ L i wprowadzano do probówek zawierających 4,925 mL PBS. Po wymieszaniu otrzymanych roztworów przy użyciu wytrząsarki (vorteksu), przenoszono je do kuwet kwarcowych o długości drogi optycznej 0,5 cm. Dokonywano pomiarów intensywności fluorescencji w temperaturze 37 °C za pomocą spektrofluorymetru FluoroMax-4 Horiba wyposażonego w podwójny monochromator emisji. Intensywność fluorescencji mierzono przy fali wzbudzenia 315 nm i fali emisji 415 nm.

Anizotropię stacjonarną $\langle r \rangle$, zdefiniowaną zależnością

$$\langle r \rangle = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}$$

otrzymano w wyniku pomiaru wertykalnych i horyzontalnych składników emitowanej fluorescencji ze wzbudzeniem wertykalnym (odpowiednio I_{VV} i I_{VH}) and horyzontalnym (odpowiednio I_{HV} i I_{HH}) w stosunku do osi emisji. Współczynnik G ($G = I_{HV}/I_{HH}$) koryguje błąd odchylenia wynikającego z układu detektorowego.

Skorzystano z pomocy i aparatury laboratoryjnej udostępnionej przez dr inż. Irenę Bylińską z Katedry Chemii Biomedycznej Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Gdańskiego.

3.3.4. Analiza rozkładu enzymatycznego koniugatów z wykorzystaniem RP-HPLC

Warunki prowadzenia analizy RP-HPLC

W pierwszej kolejności, na podstawie wstępnych doświadczeń określono poniższą fazę stacjonarną oraz fazę ruchomą (tabela 11). Przedstawione warunki analizy zastosowano do wszystkich wykonanych próbek przedstawionych w niniejszej części rozprawy doktorskiej (tabela 10). W spektrometrze mas wykorzystywanym jako detektor w układzie HPLC zastosowano jonizację ujemną metodą ESI.

Tab.10. Parametry kolumny i jej wypełnienia

Kolumna	XDB C-18
Długość [μm]	150
Średnica [μm]	46
Wielkość wypełnienia [μm]	5
Prędkość przepływu [mL/min]	1
Objętość nastrzyku próbki [μL]	25
Temperatura kolumny [$^{\circ}\text{C}$]	25

Tab.11. Zoptymalizowane warunki elucji podczas analizy RP-HPLC.

Czas separacji [min]	Rozp. A: H ₂ O + 0,01%HCOOH [%]	Rozp. B: MeOH [%]
0	95	5
8	70	30
11	50	50
12	95	5
17	95	5

Warunki prowadzenia analizy rozkładu enzymatycznego

Analizę rozkładu enzymatycznego koniugatów prowadzono w dwóch układach: A) układ modelowy, w obecności esterazy z wątroby świni oraz B) ekstrakt bezkomórkowy z *Candida albicans*.

Układ A.

Do 185 μM wodnego roztworu każdego z badanych związków (objętość 200 μl), dodano 100 μl roztworu esterazy (osiągając końcowe stężenie 5 mg/mL), a następnie mieszaninę inkubowano w temperaturze 30 $^{\circ}\text{C}$. Wykonano analizę HPLC-MS tak uzyskanych próbek bezpośrednio po dodaniu enzymu, po 40 minutach oraz po 120 minutach od rozpoczęcia hydrolizy enzymatycznej.

Układ B.

Otrzymywanie ekstraktu bezkomórkowego.

Dwudziestoczwierogodziną hodowlę komórek *C.albicans* ATCC 10231 w płynnym podłożu Saboraud odświeżono rozcieńczając ją do gęstości optycznej $\text{OD}_{660} = 0,1$ i inkubację zawiesiny przez kolejne ok. 2 godziny w temperaturze 30 $^{\circ}\text{C}$ z wytrząsaniem. Uzyskane komórki w logarytmicznej fazie wzrostu przemywano wodą destylowaną i ponownie ustalono gęstość optyczną próbki $\text{OD}_{660} = 1,5$ w buforze PBS (pH 7,4), która odpowiada około 10^7 kom./mL. Ekstrakt bezkomórkowy uzyskano poprzez mechaniczną dezintegrację masy komórkowej (2 ml próbki) z porcją ceramicznych kulek o średnicy $d = 1,0$ mm. Proces ten polegał na kilkukrotnym wytrząsaniu mieszaniny z przerwami na

ochłodzenie próbki w lodzie. Każdy etap trwał ok. 2 minuty, a cały cykl powtarzano pięć razy. Na koniec odwirowywano zawiesinę (4°C, 10 tys. rpm, 20 min), a uzyskany supernatant przepuszczano przez filtr strzykawkowy (wielkość porów ok. 0,2 µm), pozbywając się w ten sposób komórek, które nie uległy dezintegracji w trakcie całego procesu. Otrzymany supernatant (ekstrakt bezkomórkowy) przechowywano w lodzie.

Hydroliza i analiza jej produktów.

W pierwszej kolejności, w próbówce typu Eppendorf umieszczono ekstrakt bezkomórkowy otrzymany w poprzednim kroku oraz roztwór badanego związku (końcowe stężenie: 185 µM). Całą mieszaninę inkubowano w 30 °C i pobierano do badania próbki o objętości 1 mL w momentach: 0, 40 i 120 min od rozpoczęcia hydrolizy. W celu odbiałczenia mieszanin, próbki umieszczono w próbkach wirówkowych z membraną półprzepuszczalną i poddawano wirowaniu (27°C, 8 tys. rpm, 10 min). Tak otrzymane roztwory z przesączy badano za pomocą HPLC-MS.

Badania zostały bezpośrednio wykonane przez dyplomantkę magisterską, mgr inż. Kaję Nowakowską. Opieka merytoryczna - dr inż. Katarzyna Kozłowska-Tylingo. Planowanie eksperymentów - Dorota Martynow.

Oznaczenia zostały wykonane za pomocą zestawu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) Agilent 1200 Series, który jest wyposażeniem badawczego Centrum Doskonałości „ChemBioFarm”, a zakup został częściowo sfinansowany z funduszy Unii Europejskiej. Zakup detektora MS został sfinansowany z dotacji Fundacji FOSTER.

3.3.5. Jakościowa ocena zdolności związków do wnikania do komórek grzybowych za pomocą mikroskopii konfokalnej

Komórki *C. albicans* hodowano przez noc (30°C, 150 rpm) w płynnym podłożu Sabouraud. Hodowlę odświeżano przez zawieszenie w świeżym podłożu do momentu uzyskania gęstości optycznej $OD_{660} \approx 0,1$ oraz dalszą inkubację w warunkach jak powyżej. Po uzyskaniu gęstości hodowli $OD_{660} \approx 0,3$, komórki płukano jałową wodą destylowaną, a następnie przygotowywano ich zawiesinę w PBS o gęstości wynoszącej $OD_{660} \approx 0,2$. Kolejnym etapem było dodanie roztworu wybranego związku (końcowe stężenie 50 - 70 µg/ml w zależności od eksperymentu) do rozporcjowanej po 2 mL zawiesiny komórek oraz również w zależności od eksperymentu znacznika Hoechst 33342 (końcowe stężenie 2 µg/ml). Zawiesinę inkubowano (30°C, 150 rpm). Próbki zawiesin przenoszono do próbek typu eppendorf, odwirowywano i kilkakrotnie przemywano PBS w celu odmycia związków fluorescencyjnych, które nie wniknęły do wnętrza komórek grzybowych. Po przemyciu komórki zawieszano w małej objętości PBS, nanoszono po 5 µL każdej próbki na mikroskopowe szkiełka adhezyjne i zabezpieczano szkiełkiem nakrywkowym. Tak wykonane preparaty obserwowano przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Stosowano długość fali wzbudzenia odpowiednią dla stosowanego związku fluorescencyjnego.

3.3.6. Inhibicja relaksacji DNA katalizowanej przez topoizomerazę II

Zestaw do relaksacji DNA topoizomerazy II (drożdże) zakupiono od firmy Inspiralis. Testy przeprowadzono zgodnie z procedurą producenta. Mieszanina reakcyjna zawierała 500 ng DNA pBR322 w buforze reakcyjnym (10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 2% (v / v) glicerol, 1 mM ATP), a także badane związki rozpuszczone i rozcieńczone w ddH₂O we wskazanych stężeniach. Reakcję zapoczątkowywano przez dodanie enzymu topoizomerazy II i pozostawiano w 30°C przez 30 min. Reakcje zakończano poprzez dodanie 5 µl buforu obciążającego (NEB; # B7024). Badane związki (jeśli wskazano) ekstrahowano z mieszanin reakcyjnych poprzez wirowanie przez 30 sekund z 30 µl roztworu chloroform: alkohol izoamylowy (24: 1). Po odwirowaniu (3 min, 20 000 x g) fazę wodną rozdzielano w 1% żelu agarozowym przy 90 V przez 4 godziny w buforze TBE (90 mM Tris-zasada, 70 mM kwas borowy, 1 mM EDTA, pH 8). Żel wybarwiano 1 µg/ml bromku etydyny przez 15 minut w celu wizualizacji DNA. Niezwiązany EtBr usuwano przez przemycie żelu w 1 mM roztworze MgSO₄ w ddH₂O przez 15 minut. Żele fotografowano w świetle UV przy użyciu urządzenia UVTEC Cambridge. Badanie zostało wykonane przez dr inż. Marcina Serockiego z Katedry Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

3.3.7. Określenie powinowactwa związków do ergosterolu

Komórki *C. albicans* SC 5314 hodowano w podłożu płynnym Sabourauda w 30° C aż do uzyskania logarytmicznej fazy wzrostu. Następnie, komórki zbierano przez wirowanie (rt, 3500 x g, 10 min.), przemywano dwukrotnie PBS i zawieszano w małej objętości tego buforu. Przygotowywano serię zawiesin komórkowych o objętości 2 ml i gęstości optycznej OD₆₆₀ w zakresie od 0 do 2,0. Zawiesiny odwirowywano (rt, 3500 x g, 10 minut) i ponownie zawieszano w tej samej objętości PBS zawierającej 30 µM AmB, Nys lub dowolnego z koniugatów. Komórki ponownie zawieszono w PBS służyły jako kontrola zerowa, a roztwory AmB, Nys lub dowolnego z koniugatów w PBS jako kontrole dodatnie. Zawiesiny komórkowe inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem (500 rpm), a następnie odwirowywano (temperatura pokojowa, 3500 x g, 10 minut). Ilość AmB, Nys lub dowolnego koniugatu pozostającego w supernatantach określano na podstawie pomiarów absorpcji UV-vis przy 409 nm.

Jako kontrolę negatywną wykorzystywano w badaniu komórki *E. coli*, które hodowano do logarytmicznej fazy wzrostu w podłożu LB w 37° C i następnie postępowano analogicznie jak z komórkami grzybowymi (opis powyżej).

3.3.8. Określenie właściwości hemolitycznych wybranych związków

Badanie właściwości hemolitycznych opierało się na wyznaczeniu EH_{50} czyli wartości stężenia związku, przy którym zostaje uwolnione 50% hemoglobiny z erytrocytów. Materiałem biologicznym wykorzystywanym do oznaczeń była krew pełna ludzka otrzymana z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku. Badania i ich powtórzenia przeprowadzono w ciągu 21 dni od otrzymania krwi.

Krew poddawano kilkukrotnemu wirowaniu (4°C , 650 rpm, 10 min) w celu oddzielenia erytrocytów od osocza. Komórki płukano 0,9% roztworem NaCl. W celu przeprowadzenia badania przygotowywano zawiesinę erytrocytów w soli fizjologicznej (0,9% NaCl) o gęstości około 2×10^7 kom./mL. Gęstość określano za pomocą licznika Coultera.

Do probówek typu eppendorf zawierających po 950 μL zawiesiny erytrocytów dodawano 50 μL roztworów badanych związków (w DMSO lub w wodzie, w zależności od związku) o stężeniach w zakresie od 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ uzyskując końcowe stężenia od 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dodatkowo, przygotowywano próbkę, w której 950 μL zawiesiny erytrocytów łączono z 50 μL DMSO lub wody destylowanej (kontrola negatywna) lub 50 μL 2% roztworu Tritonu X-100 (kontrola pozytywna). Tak przygotowane próby inkubowano w temp. 37°C .

Po upływie 30 min zawiesiny odwirowywano (2800 rpm, 5 min, 4°C) i наносzono po 100 μL supernatantu do kolejnych studzienek płytki titracyjnej 96-cio studzienkowej, a następnie dokonywano pomiaru absorpcji przy pomocy czytnika mikroplętek, przy długości fali $\lambda = 540 \text{ nm}$. W badaniu jako kontrolę pozytywną użyto roztworu Tritonu X-100 wywołującego 100% hemolizę. Kontrolę negatywną stanowiła zawiesina erytrocytów bez dodatku związku czy Tritonu X-100.

Przyjmując wartość absorbancji próby z Tritonem X-100 jako odpowiadającą 100% hemolizy wyznaczano wartości EH_{50} dla badanych związków oraz związku kontrolnego na podstawie krzywych $A_{540} = f(c)$. Oznaczenia powtarzano trzykrotnie.

3.3.9. Określenie cytotoksyczności badanych związków

Hodowlę komórek LLC-PK1 ($2,5 \cdot 10^4$ komórek/studzienkę) przeprowadzono w 24-dołkowej płytce w podłożu hodowlanym nr 199 z dodatkiem 5% FBS. Hodowlę komórek Hep G2 (4×10^4 komórek/studzienkę) przeprowadzono odpowiednio w podłożu MEM Eagle z dodatkiem 10% FBS. W przypadku komórek HEK-293T ($1,25 \times 10^4$ komórek/studzienkę) hodowlę przeprowadzono w podłożu DMEM z dodatkiem 10% FBS. W pierwszej kolejności przeprowadzano 24-godziną hodowlę. Następnie, badane związki dodawano do odpowiednich studzienek w ilości 10 μl na porcję 200 razy stężonego roztworu. Końcowe stężenie związków wynosiło 0,01 – 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Do kontroli dodano 10 μl rozpuszczalnika (H_2O lub DMSO w zależności od związku). Komórki ze związkami były poddane

inkubacji przez 72 h w 37°C. Do wszystkich celek dodawano 200 µl roztworu MTT w PBS (4 mg/ml) i dalej inkubowano 1 - 4h w tych samych warunkach. Mierzono absorbancję przy użyciu czytnika płytek, przy długości fali $\lambda = 540$ nm.

Badania cytotoxiczności wykonał dr inż. Marcin Serocki z Katedry Technologii Leków i Biochemii, Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

3.4. Omówienie i dyskusja wyników

3.4.1. Działanie biologiczne koniugatów ciprofloksacyny, lewofloksacyny i FMDP z peptydem penetrującym TP10

Ciprofloksacyna i lewofloksacyna są znanymi chemoterapeutykami przeciwbakteryjnymi, których działanie biologiczne jest konsekwencją hamowania enzymu gyrazy (bakteryjna topoisomeraza II). W stężeniach, w których mają działanie przeciwbakteryjne, nie wykazują one efektu toksycznego wobec drobnoustrojów grzybowych ani komórek ssaczy. Koniugaty CIP i LVX z TP10 zostały zaprojektowane i otrzymane w celu sprawdzenia czy skoniugowanie z tym peptydem penetrującym będzie miało wpływ na ich aktywność biologiczną.

Zbadano także aktywność biologiczną koniugatów peptydu TP10 z FMDP, czyli inhibitorem syntazy GlcN-6-P.

Oznaczenie aktywności przeciwgrzybowej i przeciwbakteryjnej koniugatów

Pierwszym etapem tych badań było przesiewowe oznaczenie aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* wobec modelowego szczepu *Candida albicans* ATCC 10231. Wyznaczono wartości MIC dla CIP, LVX, TP10 i 9 koniugatów w podłożu RPMI 1640, rekomendowanym do określania aktywności przeciwgrzybowej w procedurze CLSI oraz w podłożu minimalnym YNB.

Tab.12. Wstępne oznaczenie aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* CIP, LVX, FMDP, TP10 oraz 9 koniugatów.

Oznaczenie związku	RPMI-1640	
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	
	MIC ₉₀ [µg/mL]	MIC ₅₀ [µg/mL]
LVX	>>200	>>200
CIP	>>200	191
FMDP	>>200	>>200

TP10-NH ₂	>>200	200
CTP10-NH ₂	>>200	>>200
K-Pep-1	191	154
K-Pep-2	90	34
K-Pep-3	>>200	>>200
K-Pep-4	200	200
K-Pep-5	50	50
K-Pep-7	156	120
K-Pep-8	>>200	>>200
K-Pep-9	59	27
Nazwa	YNB-SA	
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	
	MIC ₉₀ [μg/mL]	MIC ₅₀ [μg/mL]
LVX	>>200	>>200
CIP	>>200	188
FMDP	>>200	>>200
TP10-NH ₂	>>200	159
K-Pep-1	109	48
K-Pep-2	50	21
K-Pep-3	200	141
K-Pep-7	134	111
K-Pep-8	>>200	>>200
K-Pep-9	50	21

Dla koniugatów wykazujących najwyższą aktywność, w kolejnym etapie badań określono ich aktywność przeciwgrzybową i przeciwbakteryjną (tylko w przypadku koniugatów CIP i LVX) wobec drobnoustrojów grzybowych *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* i *S. cerevisiae* oraz bakterii *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermidis* i *S. aureus*. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 13 - 15.

Tab.13. Aktywność przeciwgrzybowa *in vitro* badanych związków w podłożu RPMI-1640.

Nazwa związku	MIC [$\mu\text{g/ml}$]											
	<i>C. albicans</i> ATCC		<i>C. albicans</i> SC		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. albicans</i> $\Delta\text{opt1-opt5}$ $\Delta\text{ptr2}\Delta\text{ptr22}\Delta$	
	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀
FMDP	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200
CIP	>>200	191	>>200	199	>>200	>>200	>>200	>>200	NB	NB	NB	NB
LVX	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	NB	NB	NB	NB
TP10-NH ₂	>>200	171	174	108	>>200	200	>>200	179	181	111	169	93
CTP10-NH ₂	>>200	>>200	100	100	>>200	>>200	>>200	>>200			100	50
CIP, TP10 (1:1)*	>>200	167	200	175	>>200	200	>>200	180	198	158	>>200	182
LVX, TP10 (1:1)*	>>200	200	>>200	198	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	200	>>200	200
K-Pep-1	>>200	141	146	84	>>200	>>200	181	119	140	70	>>200	193
K-Pep-2	90	34	85	24	>>200	>>200	>>200	79	80	31	95	61
K-Pep-3	>>200	170	165	90	>>200	>>200	200	160	92	49	>>200	>>200
K-Pep-4	200	200	200	100	>>200	>>200	200	100	>>200	>>200	>>200	>>200
K-Pep-5	50	50	100	100	>>200	>>200	>>200	>>200	69	34	100	50
K-Pep-6	NB	NB	136	136	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	136	136
K-Pep-7	156	120	174	155	>>200	>>200	>>200	>>200	NB	NB	NB	NB
K-Pep-9	59	27	67	45	>>200	>>200	>>200	>>200	NB	NB	NB	NB

NB – nie badano

* fizyczna mieszanina równomolowa antybiotyku i peptydu TP10

Tab.14. Aktywność przeciwgrzybowa *in vitro* badanych związków w podłożu YNB-SA.

Nazwa związku	MIC [$\mu\text{g/ml}$]											
	<i>C. albicans</i> ATCC		<i>C. albicans</i> SC		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. albicans</i> $\Delta\text{opt1-opt5}$ $\Delta\text{ptr2}\Delta\text{ptr22}\Delta$	
	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀
CIP	>>200	188	>>200	198	>>200	>>200	>>200	>>200	NB	NB	NB	NB
LVX	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	NB	NB	NB	NB
TP10-NH ₂	>>200	168	180	111	>>200	195	>>200	173	193	129	178	101
CIP, TP10 (1:1)*	>>200	184	>>200	180	>>200	195	>>200	192	200	179	>>200	187
LVX, TP10 (1:1)*	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200	>>200
K-Pep-1	80	40	39	22	>>200	>>200	90	59	49	36	120	46
K-Pep-2	50	21	24	10	>>200	>>200	100	46	43	19	41	14
K-Pep-3	200	157	111	67	>>200	>>200	198	143	90	45	>>200	>>200
K-Pep-7	134	111	156	115	>>200	>>200	>>200	>>200	NB	NB	NB	NB
K-Pep-9	50	21	62	50	>>200	>>200	>>200	>>200	NB	NB	NB	NB

NB – nie badano

* fizyczna mieszanina równomolowa antybiotyku i peptydu TP10-NH₂

Tab.15. Aktywność przeciwbakteryjna *in vitro* CIP, LVX, TP10-NH₂ i koniugatów w podłożu MHBII.

Nazwa związku	MIC [µg/ml]							
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀
CIP	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	0,9	<0,3	<0,3	<0,3
LVX	1,5	1,1	<0,3	<0,3	2,2	1,5	<0,3	<0,3
TP10-NH ₂	>>300	284	246	121	>>300	215	>>300	257
CIP, TP10 (1:1)*	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	1,5	0,5	<0,3	<0,3
LVX, TP10 (1:1)*	1,1	0,8	<0,3	<0,3	2,5	0,5	0,5	<0,3
K-Pep-1	256	115	15,4	8,7	215	102	295	132
K-Pep-2	1,1	0,8	<0,3	<0,3	1,6	<0,3	1,1	0,7
K-Pep-3	164	140	74	28	274	211	>>300	199
K-Pep-4	>>250	>>250	62	31	31	16	125	31
K-Pep-5	62	31	8	8	8	8	62	62
K-Pep-6	125	125	4	4	31	31	63	63

* fizyczna mieszanina równomolowa antybiotyku i peptydu TP10

Analizując dane przedstawione w tabelach 13-15 należy zwrócić uwagę, że dołączenie peptydu TP10-NH₂ do CIP i LVX znacząco zmniejsza aktywność przeciwbakteryjną badanych antybiotyków. Takie zjawisko występuje w przypadku K-Pep-1, K-Pep-4, K-Pep-6 i K-Pep-3, K-Pep-5 (odpowiednio koniugaty CIP i koniugaty LVX), ale zdaje się być znacznie słabsze w przypadku koniugatu K-Pep-2 (CIP).

Dane przedstawione w tabeli 13 wskazują, że koniugaty TP10-NH₂ z CIP i LVX wykazują aktywność przeciwgrzybową, której nie stwierdzono dla samych CIP i LVX. Najwyższą aktywność, czyli najniższe wartości MIC uzyskano dla koniugatu K-Pep-2 i K-Pep-5 (odpowiednio MIC₅₀ = 34 µg/ml i MIC₅₀ = 50 µg/ml, RPMI-1640, *C. albicans* ATCC 10231). Aktywność przeciwgrzybową wykazuje również sam peptyd TP10-NH₂, jednakże niższą niż jego koniugaty z CIP. Ponadto, aktywność mieszaniny równomolowej LVX i TP10-NH₂ oraz CIP i TP10-NH₂ jest niższa, niż odpowiednich koniugatów K-Pep-1 oraz K-Pep-3. Nie stwierdzono znaczących różnic aktywności TP10-NH₂ i koniugatów wobec *C. albicans* SC 5314 oraz jego mutantu *C. albicans opt1-opt5Δptr2Δptr22Δ*, pozbawionego permeaz peptydowych.

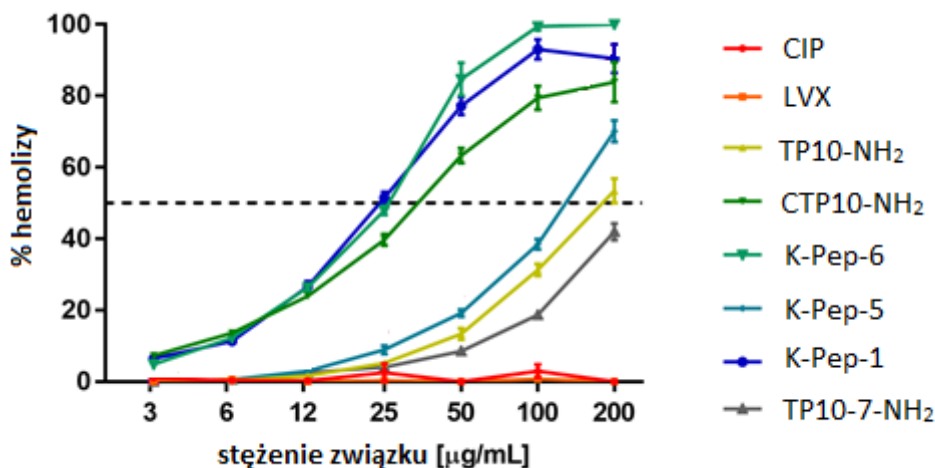
Można zatem generalnie stwierdzić, że przyłączenie TP10-NH₂ do CIP lub LVX skutkuje obniżeniem aktywności przeciwbakteryjnej, ale indukuje pojawienie się aktywności przeciwgrzybowej koniugatów, nieobecnej u wyjściowych chemoterapeutyków.

Rozważając aktywność przeciwgrzybową i przeciwbakteryjną koniugatów ciprofloksacyny i lewofloksacyny oraz mieszanin fizycznych ich składników, należy zauważyć, że peptyd TP10-NH₂ jest w niektórych przypadkach dołączony do pozycji 7 cząsteczki ciprofloksacyny (rys. 17, rozdział 2.3.3), która jest uważana za miejsce oddziaływania z gyrazą DNA [93, 94]. Stąd może wynikać różnica w działaniu pomiędzy koniugatami tego antybiotyku z TP10 a jego mieszaniną fizyczną z peptydem. Dołączenie TP10-NH₂ w tym miejscu może skutkować obniżeniem aktywności przeciwbakteryjnej względem niektórych szczepów. Mimo, że w przypadku niektórych koniugatów (w tym z LVX) nie następuje modyfikacja pozycji 7, to dołączenie TP10-NH₂ wiązaniem kowalencyjnym może mieć skutek w obniżonej aktywności przeciwbakteryjnej tych związków.

Rozważając aktywność koniugatów TP10 z FMDP tj. K-Pep-7, K-Pep-8 oraz K-Pep-9, można zauważyć, że dołączenie do FMDP peptydu TP10-NH₂ oraz TP10-7-NH₂ skutkuje wykazaniem aktywności przeciwgrzybowej przez zaproponowane koniugaty. Spośród tych dwóch związków, koniugat K-Pep-9 wykazuje silniejsze właściwości przeciwgrzybowe. Można stwierdzić, że dołączenie TP10-NH₂ lub TP10-7-NH₂ do FMDP powoduje zwiększenie aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* cząsteczki aktywnej.

Określenie właściwości hemolitycznych wybranych związków

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie właściwości hemolitycznych TP10 i jego koniugatów poprzez wyznaczenie wartości EH_{50} wobec ludzkich erytrocytów. Wyniki tych oznaczeń przedstawiono na Rys. 23.

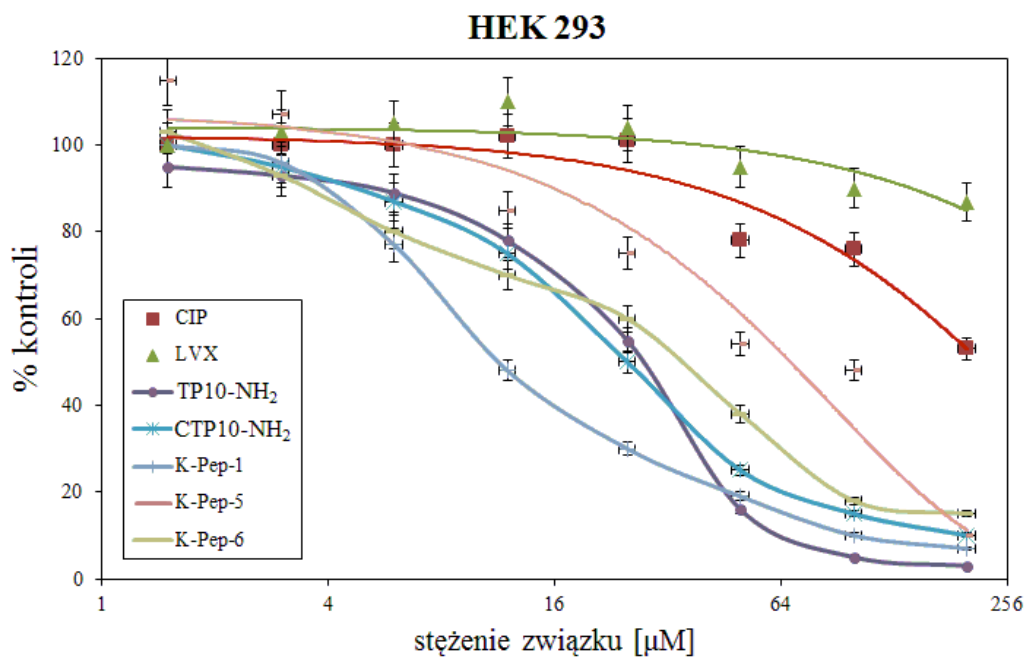


Rys.23. Właściwości hemolityczne wybranych związków.

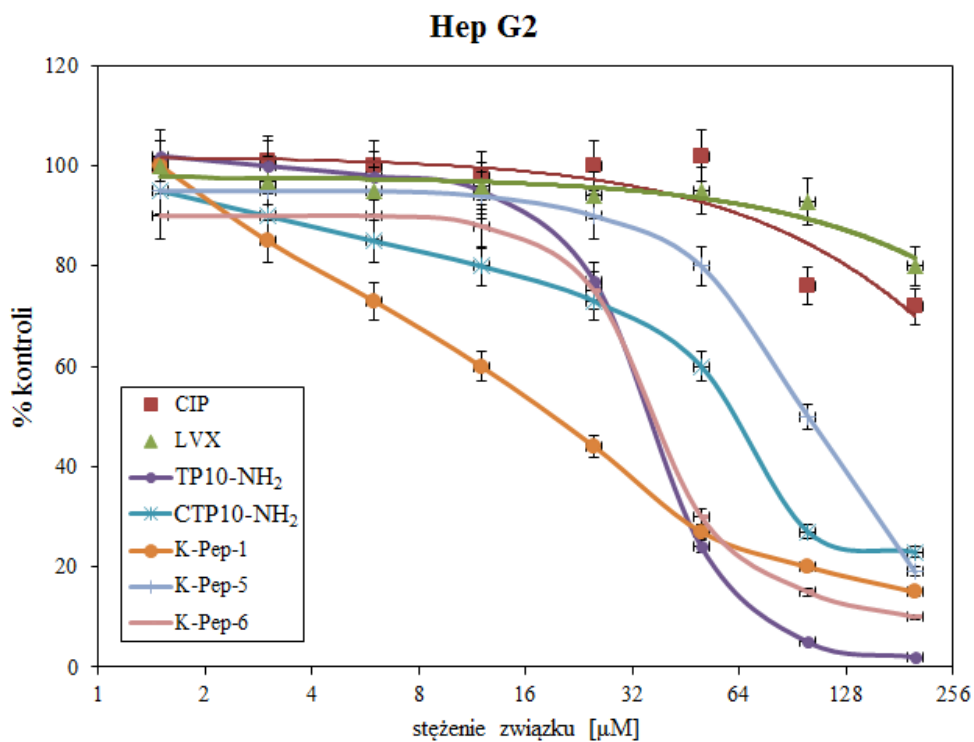
Z powyższego wykresu wynika, że CIP i LVX nie wykazują właściwości hemolitycznych w badanym zakresie stężeń. Peptyd TP10-NH₂ powoduje hemolizę 50% erytrocytów przy stężeniu 195 µg/mL. Natomiast najsilniejsze właściwości hemolityczne stwierdzono dla koniugatów CIP z TP10-NH₂ (K-Pep-1 i K-Pep-6). Wynik ten sugeruje, że TP10-NH₂, a szczególnie koniugaty tego peptydu z CIP i LVX mogą oddziaływać z błoną biologiczną, powodując jej uszkodzenie.

Określenie cytotoksyczności wybranych związków

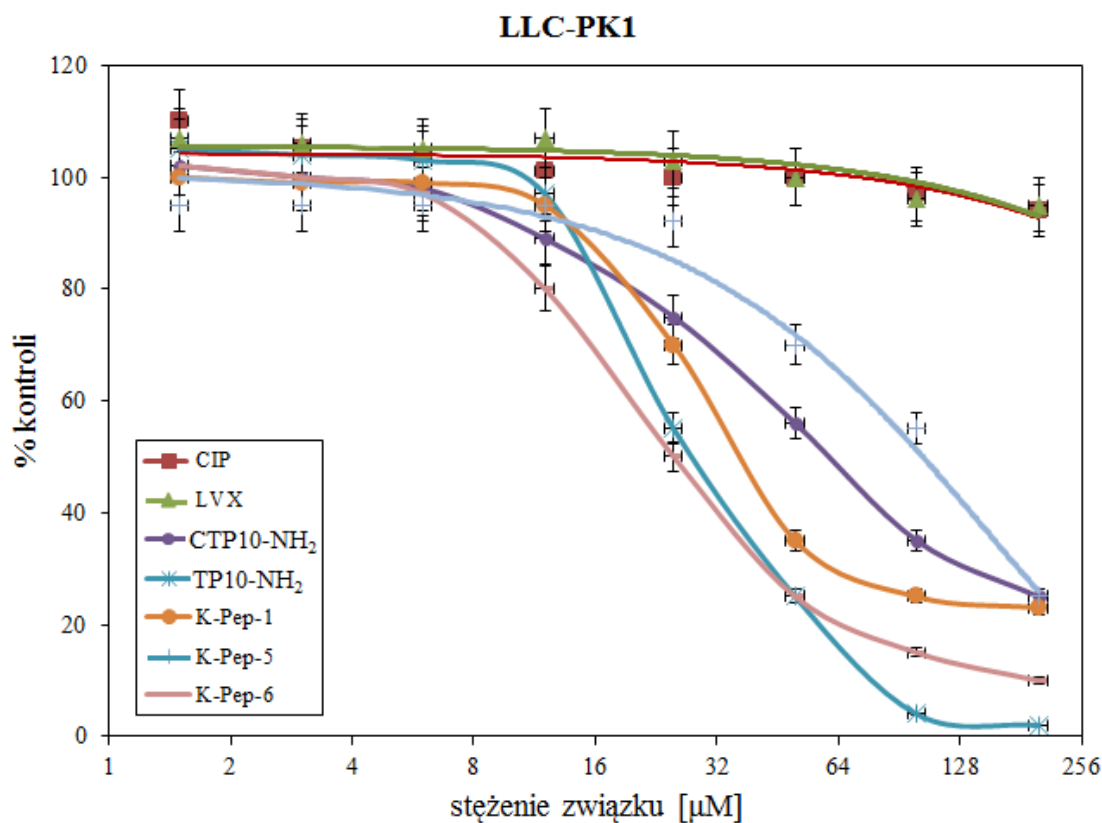
Wyniki oznaczenia hemotoksyczności wybranych związków wskazywały na możliwość toksycznego działania tych koniugatów wobec komórek ssaczych. Ich właściwości cytotoksyczne zostały sprawdzone na trzech liniach komórkowych: LLC-PK1, linii komórek prawidłowych, nabłonkowych, przylegających do proksymalnych kanalików nerkowych izolowanych z nerki 3-4 tygodniowej samicy świni, HEK 293, linii ludzkich embrionalnych komórek nerki oraz Hep G2, linii komórek raka wątroby ludzkiej. Oprócz cytotoksyczności wybranego koniugatu K-Pep-1, K-Pep-5 oraz K-Pep-6 oceniono także cytotoksyczność ich składników. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys 24, 25, 26 i w tabeli 16.



Rys.24. Cytotoksyczność badanych związków wobec komórek HEK 293.



Rys.25. Cytotoksyczność badanych związków wobec komórek Hep G2.



Rys.26. Cytotoksyczność badanych związków wobec komórek LLC-PK1.

Tab.16. Cytotoksyczność badanych związków wobec trzech linii komórkowych.

Związek	IC ₅₀ [µg/ml]		
	HEK 293	Hep G2	LLC-PK1
CIP	> 200	> 200	> 200
LVX	> 200	>200	> 200
TP10-NH ₂	54,68	70,03	49,56
CTP10-NH ₂	44,46	136,94	117,82
K-Pep-1	25,98	28,58	67,48
K-Pep-2	35,21	51,11	41,20
K-Pep-4	27,58	55,37	45,39
K-Pep-5	113,50	>200	>200
K-Pep-6	56,59	102,40	57,92

Z danych przedstawionych w tabeli 16 wynika, że CIP i LVX nie wykazują efektu cytotoksycznego w badanym zakresie stężeń, podczas gdy TP10-NH₂ jest cytotoksyczny, podobnie jak i jego koniugaty z CIP. Wartości IC₅₀ uzyskane dla tych koniugatów są zbliżone do odpowiednich wartości dla TP10-NH₂ (niekiedy niższe). W przypadku koniugatu LVX K-Pep-5 można zauważyć, że wykazuje on słabsze właściwości cytotoksyczne niż pozostałe związki.

Na podstawie uzyskanych danych dotyczących aktywności przeciwdrobnoustrojowej (MIC_{50}) i cytostatycznej (IC_{50}) badanych związków możliwe było obliczenie wartości indeksów selektywnej toksyczności $SI = IC_{50}/MIC_{50}$.

Tab.17. Indeksy selektywnej toksyczności (SI) wyznaczony dla parametrów aktywności wobec *C.albicans* SC 5314 oraz Hep G2.

Nazwa związku	$MIC_{50}[\mu g/ml]$	$IC_{50}[\mu g/ml]$	SI
CIP	199	>200	>1,01
LVX	>200	>200	NW
TP10-NH ₂	108	70,03	0,65
CTP10-NH ₂	100	136,94	1,37
K-Pep-1	84	28,58	0,34
K-Pep-2	24	51,11	2,13
K-Pep-4	100	55,37	0,55
K-Pep-5	100	>200	>2
K-Pep-6	136	102,40	0,75

NW – nie wyznaczono

Tab.18. Indeksy selektywnej toksyczności (SI) wyznaczony dla parametrów aktywności wobec *E.coli* oraz Hep G2.

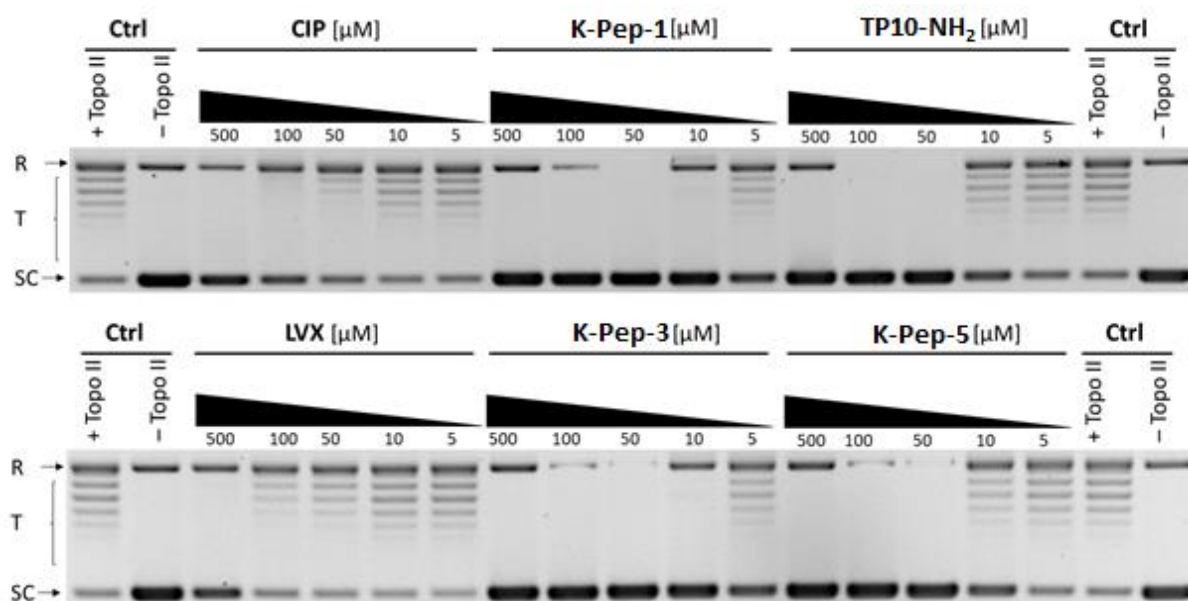
Nazwa związku	$MIC_{50}[\mu g/ml]$	$IC_{50}[\mu g/ml]$	SI
CIP	<0,30	>200	NW
LVX	<0,30	>200	NW
TP10-NH ₂	121,00	70,03	0,59
CTP10-NH ₂	8	136,94	17,12
K-Pep-1	8,70	28,58	3,29
K-Pep-2	<0,30	51,11	>170
K-Pep-4	31,00	55,37	1,79
K-Pep-5	8,00	>200	>25
K-Pep-6	4,00	102,40	25,60

ND – nie wyznaczono

Z wyznaczonych indeksów selektywnej toksyczności (tab. 17., tab. 18.) wynika, że poza antybiotykami CIP i LVX, największą selektywność wykazuje koniugat K-Pep-2, K-Pep-5 i K-Pep-6, ponieważ ich indeksy selektywnej toksyczności mają największe wartości (zaraz po CIP i LVX).

Inhibicja relaksacji DNA za pośrednictwem topoizomerazy II z komórek *S. cerevisiae* przez koniugaty CIP i LVX z TP10

W związku z faktem, że koniugaty CIP i LVX z TP10 wykazują aktywność przeciwgrzybową, zbadano, czy hamują one aktywność topoizomerazy II z komórek *S. cerevisiae*, czyli enzymu będącego odpowiednikiem gyrazy DNA, celu molekularnego dla CIP i LVX. W badaniu tym sprawdzono potencjał inhibicyjny CIP, LVX, TP10-NH₂ oraz trzech koniugatów: K-Pep-1, K-Pep-3 oraz K-Pep-5. Wyniki tego eksperymentu przedstawiono na rys. 27.

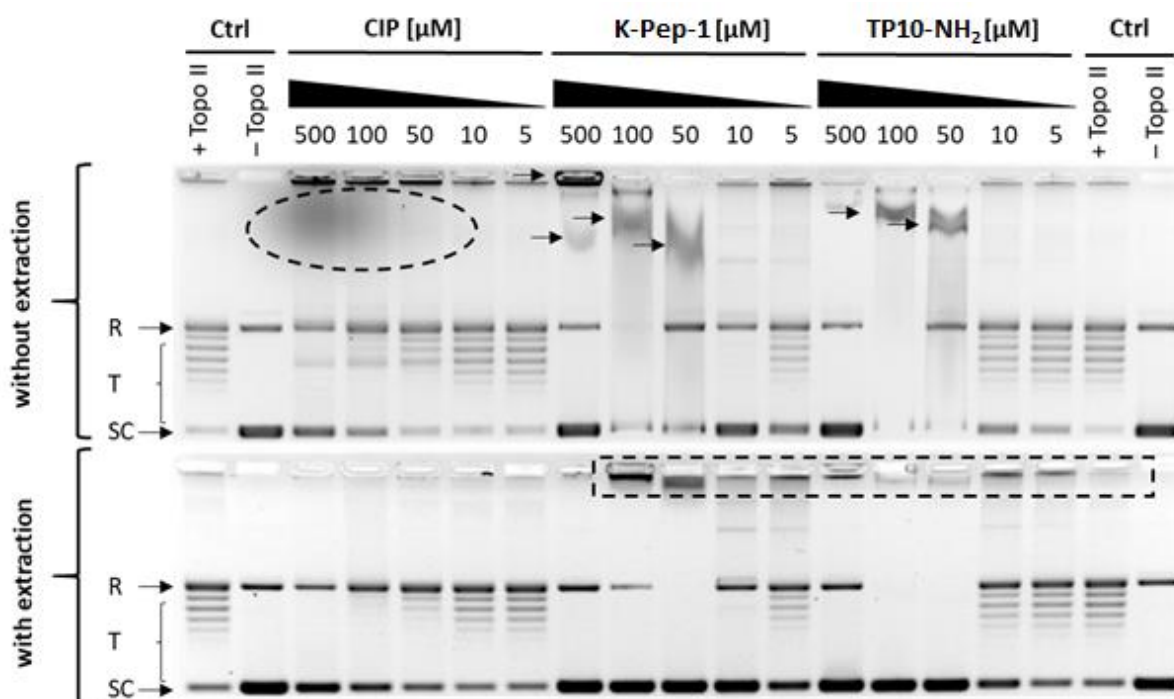


Rys.27. Inhibicja aktywności katalitycznej topoizomeraz DNA typu II przez fluorochinolony i ich koniugaty. R- zrelaksowane DNA; T – topomery DNA; SC – superzwinęte DNA.

Można zauważyć, że związki CIP, TP10-NH₂ i koniugaty K-Pep-1, K-Pep-3 oraz K-Pep-5 są w stanie blokować działanie topoizomerazy II w zakresie badanych stężeń. Wykazano, że peptyd TP10-NH₂ bez dołączonej cząsteczki aktywnej jest w stanie całkowicie zablokować działanie enzymu przy stężeniu 50 μM (109 μg/ml). Koniugaty K-Pep-1 i K-Pep-3 były w stanie w pełni zablokować działanie topoizomerazy II już w stężeniu 10 μM (25 μg/ml), a K-Pep-5 przy 50 μM (137 μg/ml). Z kolei, CIP hamował aktywność enzymu dopiero w stężeniu 500 μM (217 μg/ml), a LVX nie wykazywał aktywności inhibicyjnej. Warto zauważyć, że stężenia, w których TP10-NH₂ hamował aktywność topoizomerazy II były porównywalne z wartościami MIC tych związków wobec *S. cerevisiae* (tabela 13 oraz tabela 14). Dla K-Pep-1 i K-Pep-3 stężenia inhibicyjne wobec enzymu były zdecydowanie niższe, niż MIC wobec komórek drożdży, a w przypadku CIP i LVX, brak aktywności przeciwgrzybowej korelował z niską aktywnością inhibicyjną wobec enzymu.

Nasuwało się przypuszczenie, że hamowanie przez peptyd TP10-NH₂ relaksacji DNA indukowanej aktywnością drożdżowej topoizomerazy II przebiega innym mechanizmem, niż bezpośrednia inhibicja enzymu i może być konsekwencją wiązania się tego peptydu z DNA. To

przypuszczenie potwierdziło się w wyniku przeprowadzenia eksperymentu, w którym żele elektroforetyczne naświetlano promieniowaniem UV bez przeprowadzenia obróbki wstępnej, w tym ekstrakcji układem chloroform: alkohol izoamylowy. Było to możliwe z uwagi na właściwości fluorogenne badanych związków. Porównanie obrazów żeli z elektroforezy niepoprzedzonej ekstrakcją i takiej, w której etap ekstrakcji miał miejsce (rys. 28) prowadzi do wniosku, że peptyd TP10-NH₂ może oddziaływać z DNA na dwa różne sposoby. Po pierwsze, można zaobserwować stosunkowo słabe oddziaływanie peptydowego DNA, które mogłoby zostać zniszczone przez ekstrakcję mieszaniną chloroform:izoamyl (wskazane strzałką). Obserwowane prążki są zniekształcone i charakteryzują się dużym opóźnieniem ruchliwości żelu w porównaniu z prążkiem od zrelaksowanej postaci plazmidowego DNA. Po drugie, warto zauważyć stosunkowo silne oddziaływanie DNA (wskazane w prostokącie), którego nie można usunąć przez ekstrakcję. Wskazane pasma są ostre i charakteryzują się słabą ruchliwością w żelu.



Rys. 28. Wyniki rozdzielania elektroforetycznego produktów reakcji katalizowanej przez topoiizomerazę II. Panel górny: eksperyment bez ekstrakcji. Panel dolny: eksperyment z ekstrakcją. Niezwiązane CIP zostało oznaczone elipsą. Słabe oddziaływanie peptyd:DNA zostało oznaczone strzałką. Silne oddziaływanie peptyd:DNA zostało oznaczone prostokątem.

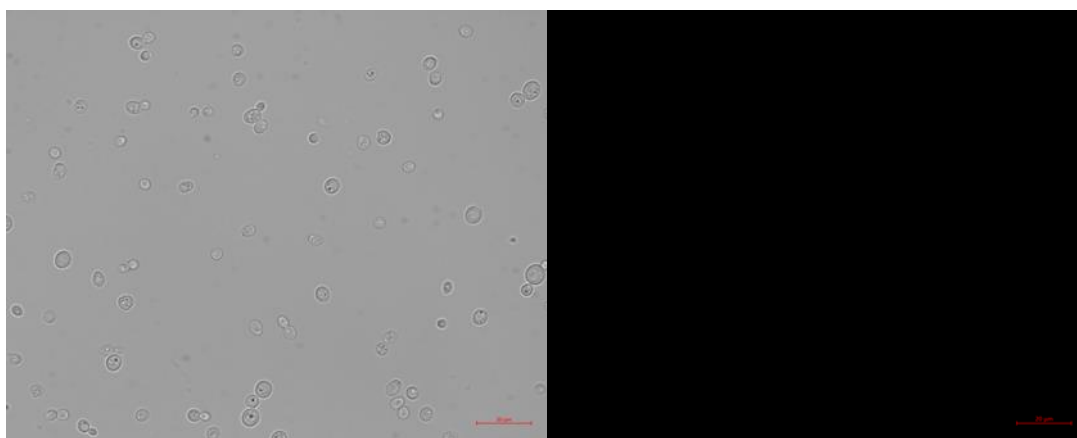
Wyniki opisane powyżej wskazują, że aktywność przeciwgrzybowa TP10-NH₂ oraz jego koniugatów z CIP i LVX może wynikać z hamowania aktywności topoiizomerazy II. W przypadku TP10-NH₂, hamowanie relaksacji DNA może być konsekwencją oddziaływania TP10-NH₂:DNA. Natomiast dla koniugatów K-Pep-1, K-Pep-3 i K-Pep-5, nie ulegających prawdopodobnie rozkładowi wewnątrzkomórkowemu, ich silny efekt inhibicyjny wobec topoiizomerazy II wydaje się wynikać z oddziaływania kompletnego koniugatu bezpośrednio z enzymem lub z matrycą DNA.

Ocena zdolności związków do wnikania do komórek grzybowych za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej

Wyniki badań opisanych w poprzednich podrozdziałach sugerowały z jednej strony, możliwość aktywności „błonowej” koniugatów CIP i LVX z TP10-NH₂, a z drugiej strony – hamowanie aktywności topoizomerazy II jako podstawy aktywności przeciwrzybowej tych koniugatów. Aby przybliżyć możliwość uzyskania odpowiedzi na pytanie, która z tych dwóch możliwości jest bardziej prawdopodobna, celem było zbadanie, czy koniugaty wnikają do komórek grzybowych, czy też pozostają w błonie cytoplazmatycznej. Badania takie mogły także dostarczyć wyjaśnienia znaczących różnic w podatności na działanie koniugatów komórek różnych gatunków z rodzaju *Candida*.

Przeprowadzono badania ukierunkowane na jakościową i ilościową (kinetyczną) analizę wnikania TP10-NH₂, CIP i koniugatu K-Pep-1 do komórek *C. albicans*, *C. albicans opt1-opt5Δptr2Δptr22Δ* i *C. glabrata*, wykorzystując w tych badaniach fluorescencyjne pochodne tych związków.

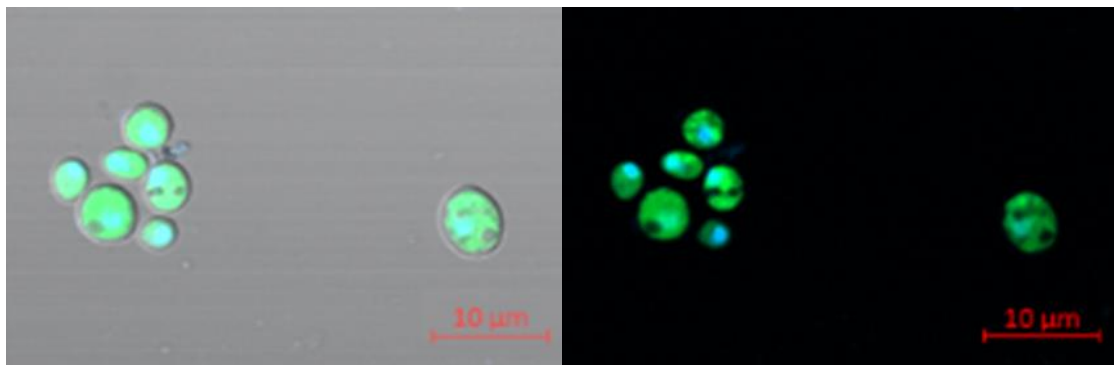
W pierwszej kolejności wykonano badanie lokalizacji koniugatów TP10-NH₂ we wnętrzu komórek grzybowych przy pomocy mikroskopii konfokalnej. W tym przypadku zbadano koniugat TP10-NH₂ z ciprofloksacyną znakowany fluorescencyjnie oraz jego składowe (sam TP10-NH₂ oraz sama ciprofloksacyna, także znakowane fluorescencyjnie). Dodatkowo, aby lepiej zlokalizować związki, użyto do badania barwnika Hoechst 3342, który gromadzi się w jądrze komórkowym. Przedstawione poniżej zdjęcia (Rys. 29. – 35.) przedstawiają obserwacje komórek szczepów *C. albicans* ATCC 10231 oraz *C. glabrata* DSM 11226 inkubowanych z trzema związkami - CIP, TP10-NH₂ oraz K-Pep-1 (każdy znakowany fluorescencyjnie). Szczep *C. albicans* ATCC 10231 posłużył jako szczep modelowy. *C. glabrata* został wybrany, ponieważ badane związki nie wykazywały aktywności względem komórek tego szczepu, więc należało sprawdzić, czy wnikają one do wnętrza tych komórek.



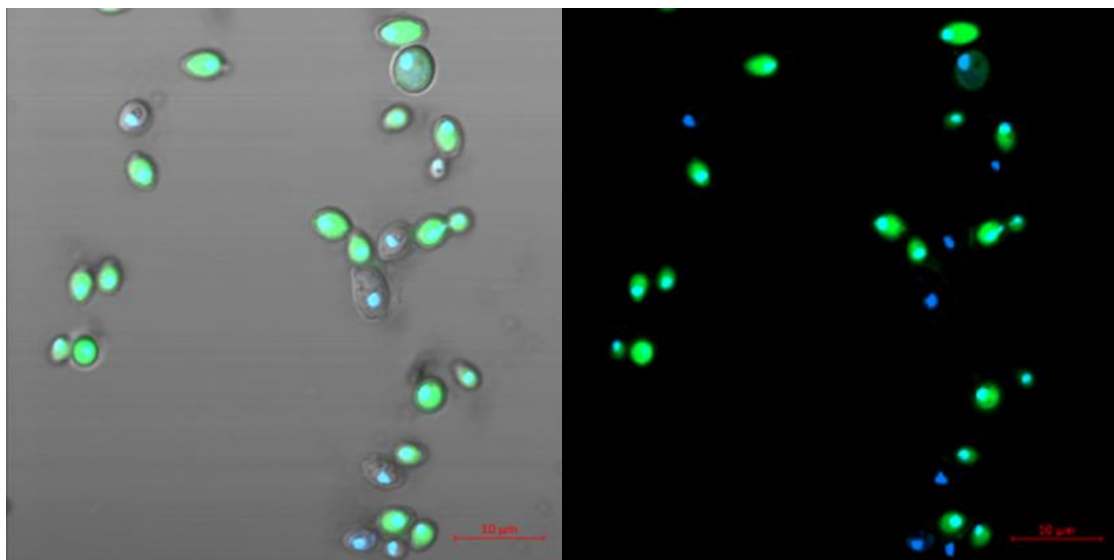
Rys.29. Kontrola ujemna - komórki *C. albicans* ATCC 10231 inkubowane 30 min w 30°C



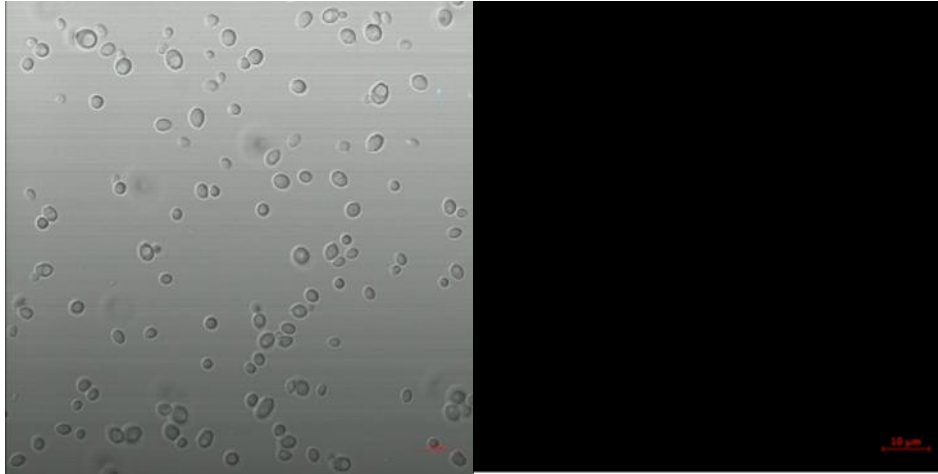
Rys.30. Wnikanie CIP znakowanej fluorescencyjnie do komórek *C. albicans* ATCC 10231. Zdjęcie wykonane po 30 min inkubacji w 30°C.



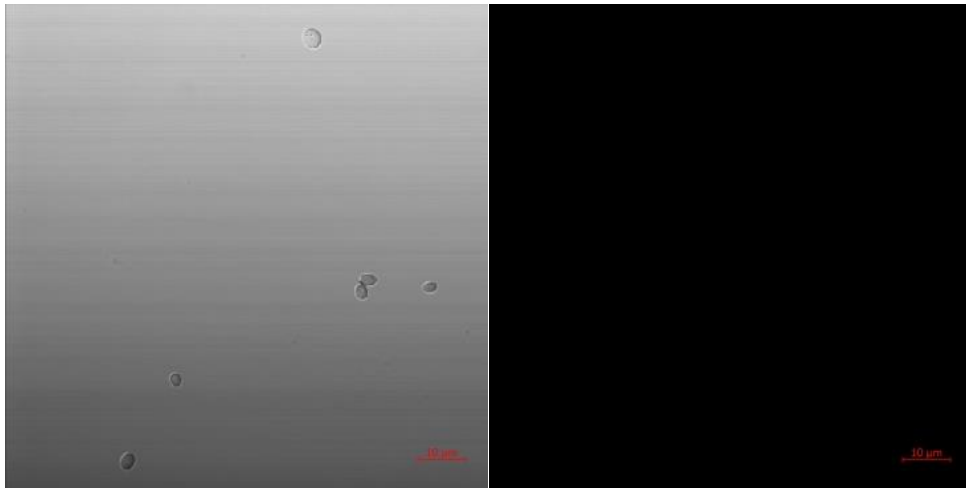
Rys.31. Wnikanie TP10 znakowanego fluorescencyjnie oraz barwnika Hoechst 3342 do komórek *C. albicans* ATCC 10231. Zdjęcie wykonane po 30 min inkubacji w 30°C.



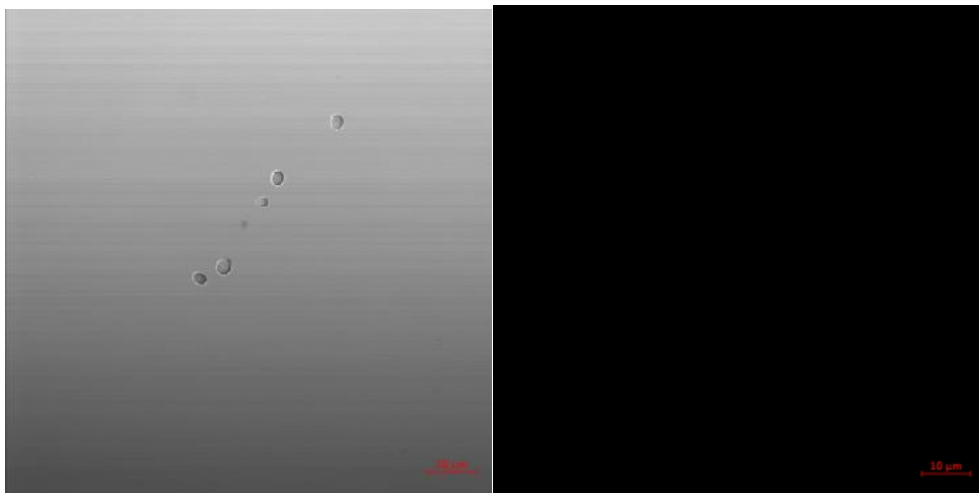
Rys.32. Wnikanie K-Pep-1 znakowanego fluorescencyjnie oraz barwnika Hoechst 3342 do komórek *C. albicans* ATCC 10231. Zdjęcie wykonane po 30 min inkubacji w 30°C.



Rys.33. Komórki *C. glabrata* inkubowane 30 min w 30°C – kontrola ujemna.

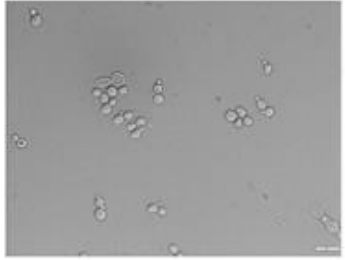

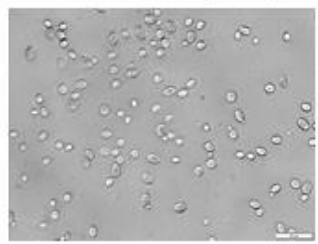

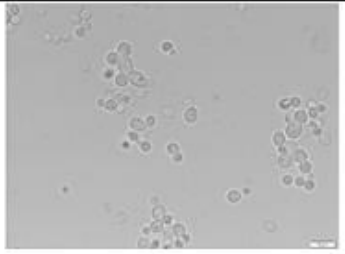
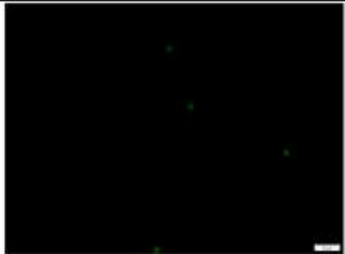
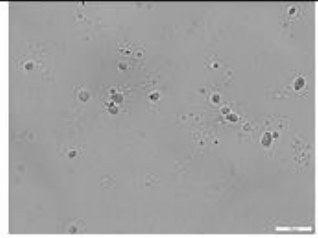

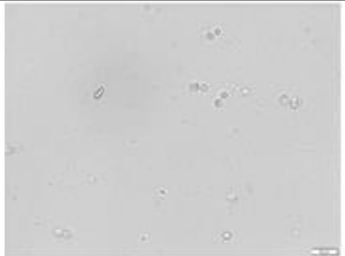
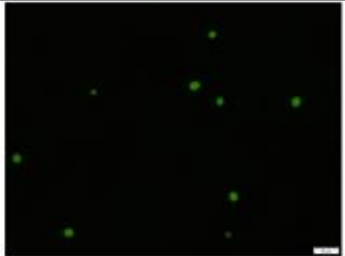
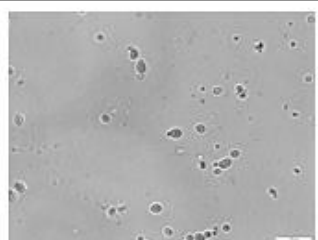
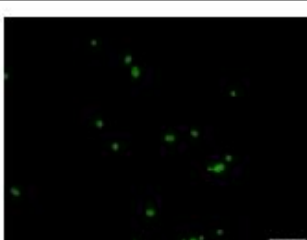


Rys.34. Wnikanie TP10-NH₂ znakowanego fluorescencyjnie do komórek *C. glabrata* . Zdjęcie wykonane po 30 min inkubacji w 30°C.

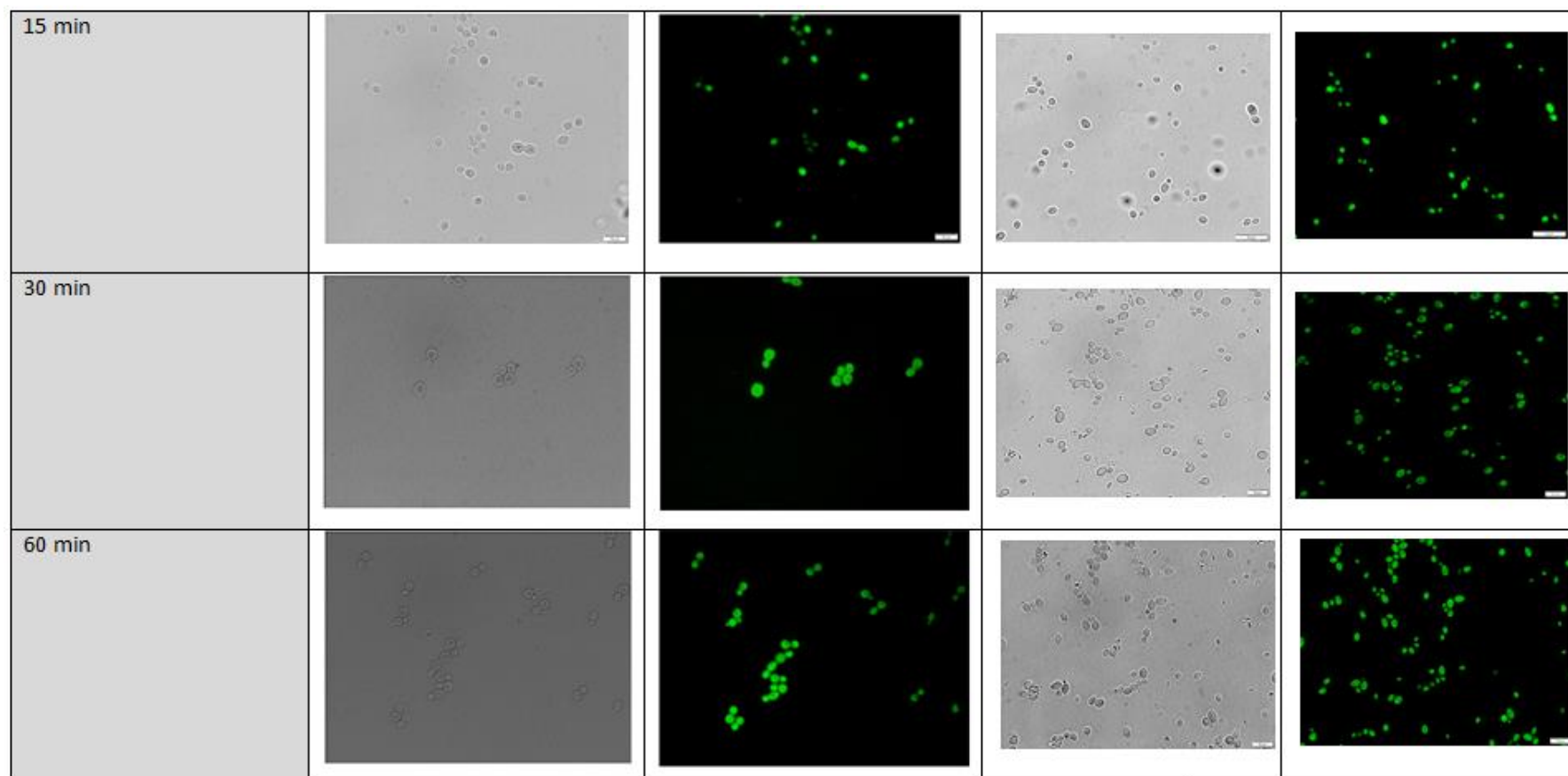


Rys.35. Wnikanie koniugatu K-Pep-1 znakowanego fluorescencyjnie do komórek *C. glabrata* . Zdjęcie wykonane po 30 min inkubacji w 30°C.

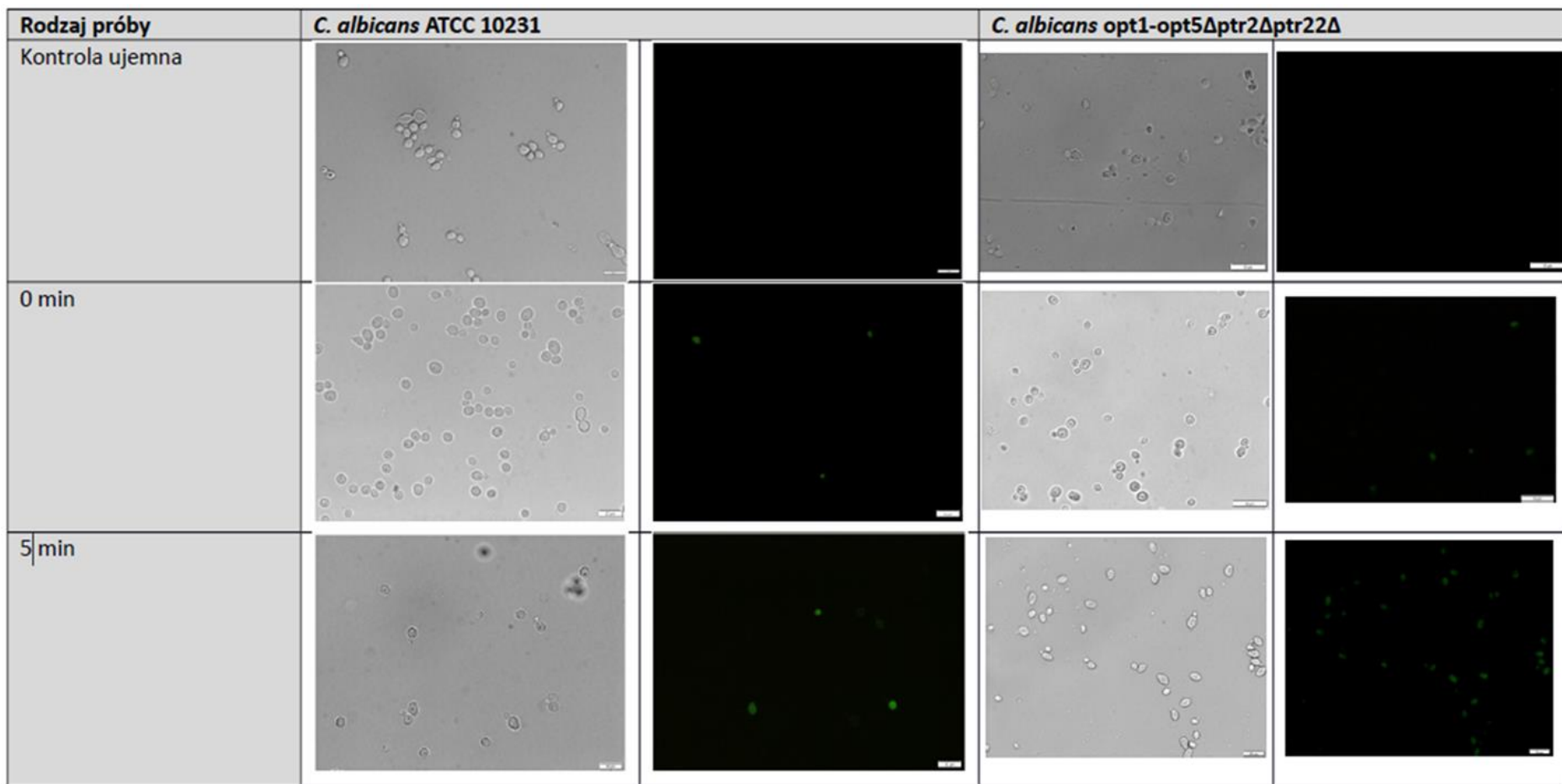
Kolejnym badaniem było zbadanie kinetyki wnikania koniugatu ciprofloksacyny i TP10 znakowanych fluorescencyjnie do wnętrza komórek grzybowych. W tym celu wykonano procedurę przedstawioną w metodyce, ale inkubację prowadzono w określonych odstępach czasowych (0, 5, 15, 30 oraz 60 min). Do badania wykorzystano modelowy szczep *C.albicans* ATCC 10231 oraz szczep *C.albicans* pozbawiony permeaz peptydowych *C. albicans opt1-opt5Δptr2Δptr22Δ*. Eksperyment miał na celu sprawdzenie, czy związki wnikają do wnętrza komórek oraz czy na ten proces mają wpływ permeazy peptydowe.

Rodzaj próby	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. albicans</i> opt1-opt5Δptr2Δptr22Δ	
Kontrola ujemna				
0 min				
5 min				

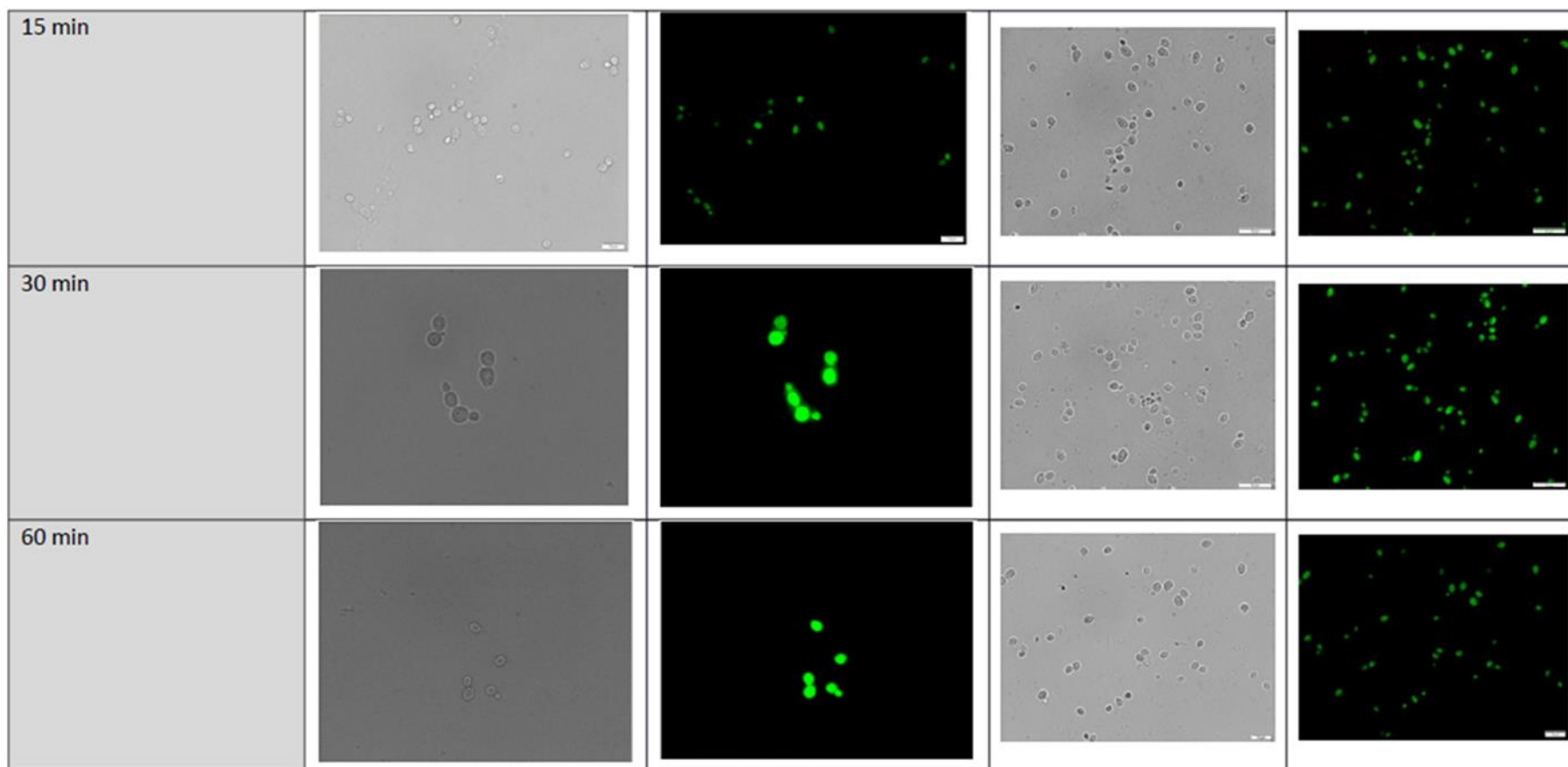
Rys. 36.A. Kinetika wnikania peptydu TP10-NH₂ znakowanego fluorescencyjnie. Kontrola ujemna była inkubowana przez maksymalny czas 60 min. Część pierwsza.



Rys.36.B. Kinetyka wnikania peptydu TP10-NH₂ znakowanego fluorescencyjnie. Część druga.



Rys.37.A. Kinytyka wnikania koniugatu K-Pep-1 znakowanego fluorescencyjnie. Kontrola ujemna była inkubowana przez maksymalny czas 60 min. Część pierwsza.



Rys.37. B. Kinetyka wnikania koniugatu K-Pep-1 znakowanego fluorescencyjnie. Część druga.

Uzyskane wyniki wskazują, że peptyd TP10-NH₂, oraz koniugat K-Pep-1 wnikają do wnętrza komórek *C. albicans*, a nie wnikają do komórek *C. glabrata*. Wnikanie do komórek *C. albicans* odbywa się bez udziału permez peptydowych, najprawdopodobniej na drodze dyfuzji prostej. Czym dłuższy czas inkubacji, tym można zauważyć silniejszy sygnał fluorescencyjny w komórkach, z wyjątkiem próbek po inkubacji 30 i 60 min, gdzie nie widać znaczącej różnicy. Oznacza to, że stężenie związków w komórce wzrasta w czasie oraz, że związki nie gromadzą się w błonie komórkowej. Z kolei CIP nie wnika do komórek grzybowych. Wyniki te tłumaczą brak aktywności peptydu i koniugatu wobec *C. glabrata* oraz brak aktywności CIP wobec komórek grzybowych. Głównym miejscem gromadzenia się związków jest cytozol, co jest zgodne z danymi literaturowymi, które wskazują, że peptyd TP10-NH₂ akumuluje się w cytozolu lub wakuolach w zależności od stężenia związku [52].

3.4.2. Działanie biologiczne koniugatów parasoli molekularnych z FMDP lub cispentacyną

FMDP i cis-pentacyna są inhibitorami cytozolowych enzymów grzybowych – odpowiednio syntazy GlcN-6-P i syntetazy Ile-tRNA^{Ile}. Oba te związki, z uwagi na ich hydrofilowy charakter, nie wnikają do komórek na drodze dyfuzji prostej, lecz są transportowane za pośrednictwem zlokalizowanych w błonie permeaz, dedykowanych dla przenoszenia naturalnych metabolitów: L-glutaminy i L-proliny. Transport FMDP przez permeazę glutaminową jest wysoce nieefektywny, natomiast oporność drobnoustrojów grzybowych na cis-pentacynę jest na ogół konsekwencją mutacji w genie kodującym permeazę prolinową. W tej sytuacji, konstrukcja koniugatów FMDP i cis-pentacyny z nanonośnikami molekularnymi wydaje się jedną z najbardziej obiecujących strategii polepszenia właściwości przeciwgrzybowych tych związków.

W ramach tej pracy zbadano właściwości biologiczne koniugatów FMDP lub cis-pentacyny z nośnikami molekularnymi, zwyczajowo nazywanymi „parasolami molekularnymi”. Pula badanych koniugatów obejmowała: a) koniugaty „sztywne”, w których FMDP lub cis-pentacyna są połączone wiązaniem amidowym z „rączką” parasola o różnej długości; b) koniugaty rozszczepialne zawierające wiązanie disiarczkowe; c) koniugaty rozszczepialne zawierające TML.

Aktywność przeciwgrzybowa *in vitro* koniugatów parasoli molekularnych z FMDP lub cispentacyną

Określono aktywność przeciwgrzybową *in vitro* koniugatów i ich składowych wobec *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. krusei*. Wyznaczono wartości MIC₅₀ i MIC₉₀ dla cis-pentacyny, FMDP i 14 koniugatów w podłożu RPMI 1640, rekomendowanym do określania aktywności przeciwgrzybowej w procedurze CLSI oraz w podłożu minimalnym YNB. Wyniki przedstawiono w tabelach 19 i 20.

Tab. 19. Aktywności przeciwgrzybowa koniugatów cis-pentacyny i FMDP z parasolami molekularnymi oraz ich składników w podłożu RPMI-1640. Przedstawiono średnie wartości z co najmniej trzech oznaczeń.

Nazwa związku	MIC [mM]							
	<i>C.albicans ATCC 10231</i>		<i>C. albicans SC 5314</i>		<i>C.glabrata DSM 11226</i>		<i>C.krusei DSM 6128</i>	
	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀
K-Umb-1	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-2	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-3	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-4	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-6	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-7	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-8	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-9	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Umb-10	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Umb-11	0,24	0,17	0,27	0,2	0,9	0,4	>>1	>>1
K-Umb-12	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Umb-13	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Umb-14	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
Cispentacyna	0,34	0,08	0,36	0,21	>>1	0,51	0,57	0,28
FMDP	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1

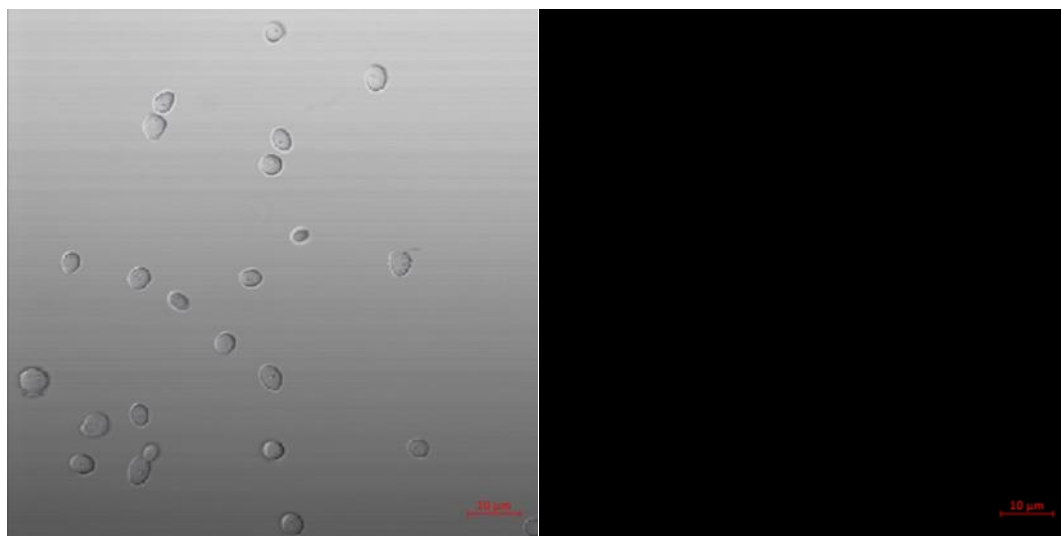
Tab. 20. Aktywności przeciwgrzybowa koniugatów cis-pentacyny i FMDP z parasolami molekularnymi oraz ich składników w podłożu YNB. Przedstawiono średnie wartości z co najmniej trzech oznaczeń.

Nazwa związku	MIC [mM]							
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. albicans</i> SC 5314		<i>C. glabrata</i> DSM 11226		<i>C. krusei</i> DSM 6128	
	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀
K-Umb-1	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-2	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-3	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-4	>>0,5	0,3	>>0,5	0,4	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-5	>>0,5	0,2	>>0,5	0,2	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-6	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-7	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-8	>>0,5	0,4	>>0,5	0,4	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-9	>>1	0,35	>>1	0,5	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Umb-10	>>0,5	0,3	>>0,5	0,3	>>0,5	>>0,5	>>0,5	>>0,5
K-Umb-11	0,22	0,13	0,29	0,17	>>1	0,55	>>1	>>1
K-Umb-12	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Umb-13	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Umb-14	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
Cispentacyna	0,1	0,02	0,15	0,1	0,5	0,1	0,15	0,09
FMDP	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1

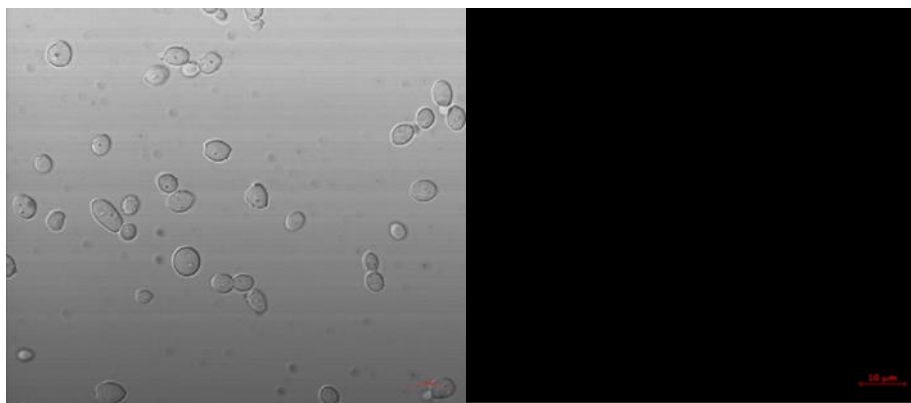
Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że parasole molekularne bez dołączonych cząsteczek aktywnych nie wykazują aktywności przeciwgrzybowej. Cis-pentacyna wykazuje aktywność wobec wszystkich badanych szczepów, natomiast FMDP jest nieaktywny. W przypadku koniugatów, stwierdzono znaczącą aktywność związku K-Umb-11 wobec *C. albicans* i *C. glabrata* w obu podłożach i brak aktywności wobec *C. krusei*. Ponadto kilka koniugatów (K-Umb-4, K-Umb-5, K-Umb-8, K-Umb-9 i K-Umb-10) wykazało słabą aktywność wobec *C. albicans* (jedynie wartość MIC₅₀) w podłożu YNB.

Jakościowa ocena zdolności koniugatów parasoli molekularnych z inhibitorami enzymatycznymi do wnikania do komórek grzybowych za pomocą mikroskopii konfokalnej i fluorescencyjnej

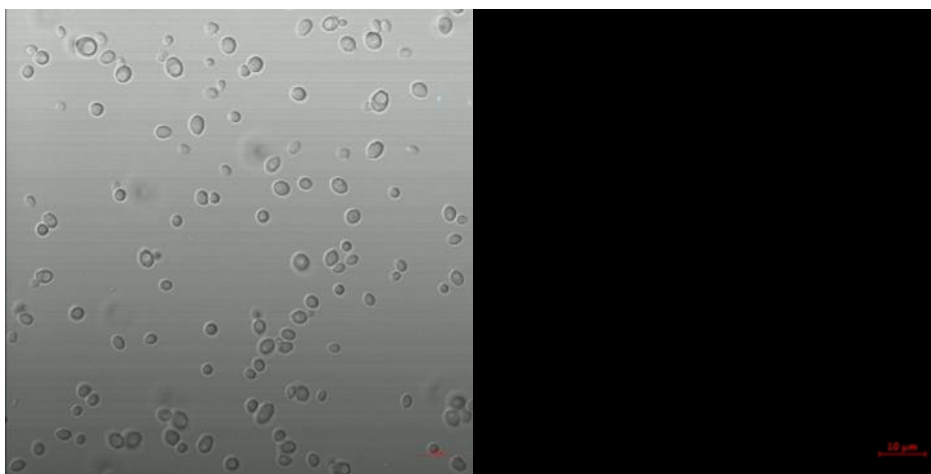
W związku z faktem, że większość zbadanych koniugatów parasoli molekularnych z inhibitorami enzymatycznymi nie wykazywała aktywności przeciwgrzybowej podjęto próby sprawdzenia, czy tego typu koniugaty wnikają do komórek grzybowych. Wykorzystano w tym celu fluorogenną pochodną koniugatu, związek K-Umb-15. Komórki grzybowe inkubowano w obecności tego związku i obserwowano ewentualną akumulację wewnątrzkomórkową za pomocą mikroskopii. Wyniki tych analiz przedstawiono na rys. 38 - 43.



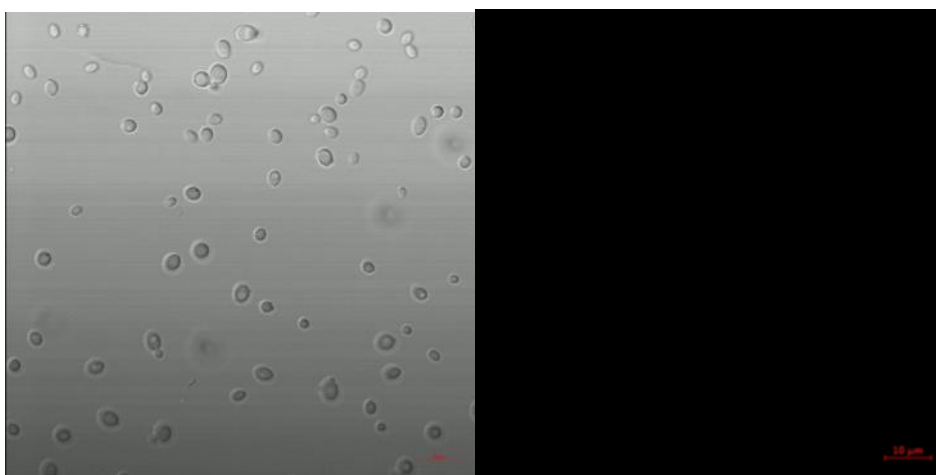
Rys.38. Komórki *C. albicans* ATCC 10231 inkubowane 30 min w 30°C – kontrola ujemna.



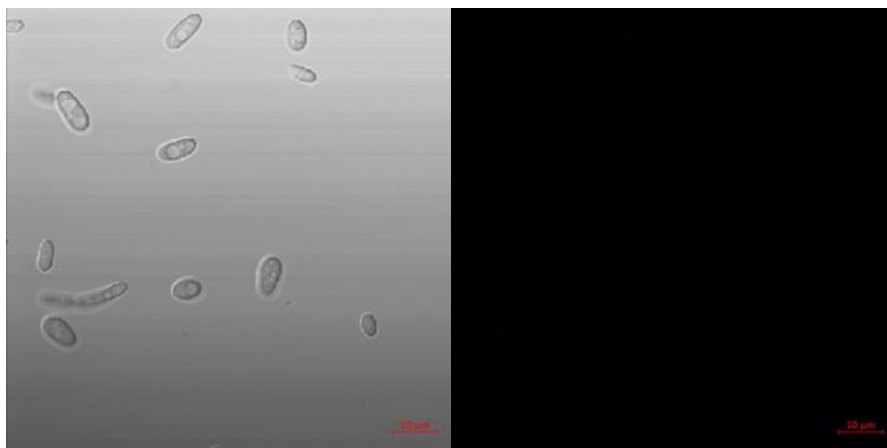
Rys.39. Komórki *C. albicans* ATCC 10231 inkubowane ze związkiem K-Umb-15 30 min w 30°C.



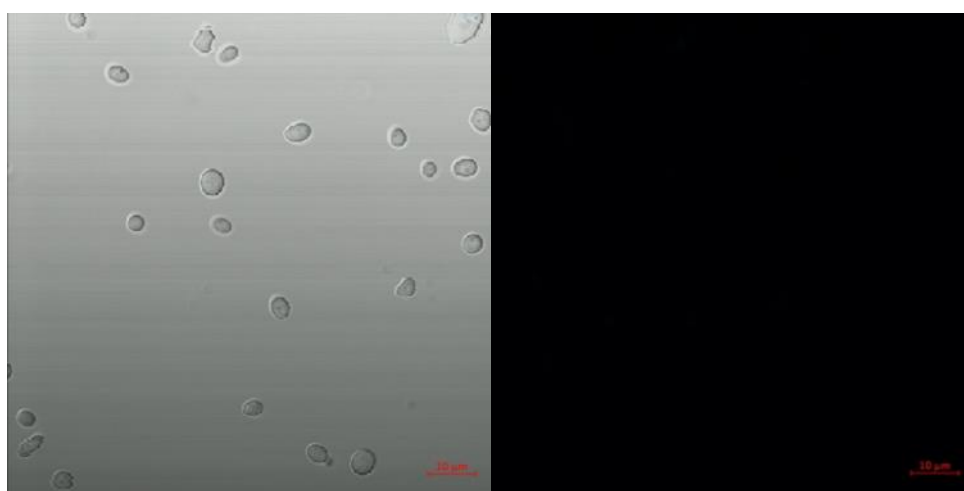
Rys.40. Komórki *C. glabrata* inkubowane 30 min w 30°C – kontrola ujemna.



Rys.41. Komórki *C. glabrata* inkubowane ze związkiem K-Umb-15 30 min w 30°C.



Rys.42. Komórki *C. krusei* inkubowane 30 min w 30°C – kontrola ujemna.



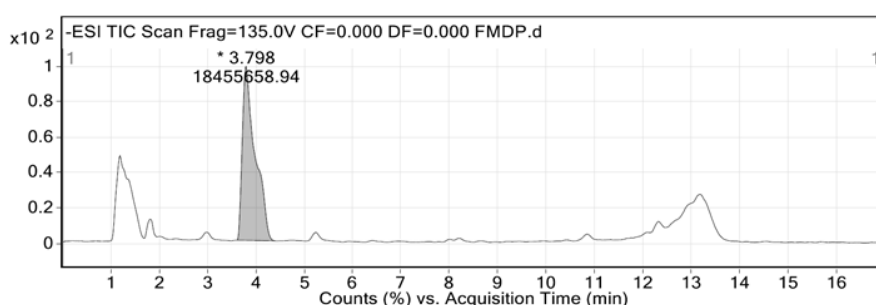
Rys.43. Komórki *C. krusei* inkubowane ze związkiem K-Umb-15 30 min w 30°C.

Z wykonanych obserwacji wynika, że związek K-Umb-15 nie wnika do wnętrza komórek grzybowych. Zaobserwowane rezultaty mogą częściowo tłumaczyć wyniki oznaczenia aktywności niektórych z badanych koniugatów parasoli z inhibitorami enzymatycznymi, ponieważ związek K-Umb-15 można uznać za analog strukturalny związków K-Umb-13 i K-Umb-14, które nie wykazują aktywności wobec *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. krusei*. Nie można natomiast jednoznacznie stwierdzić, czy w podobny sposób zachowują się inne koniugaty, gdyż nie dysponowano ich fluorogennymi analogami.

Analiza rozkładu enzymatycznego koniugatów w układzie modelowym i w ekstrakcie bezkomórkowym z wykorzystaniem RP-HPLC

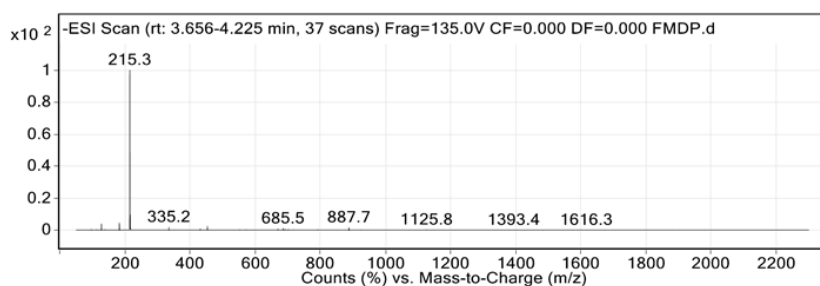
W dalszej kolejności wykonano badania hydrolizy enzymatycznej przy pomocy RP-HPLC w celu określenia, czy koniugaty zawierające TML ulegają hydrolizie enzymatycznej w układzie modelowym pod wpływem esterazy z wątroby świnińskiej oraz w ekstrakcie bezkomórkowym z *C. albicans*. Produkty reakcji analizowano za pomocą RP-HPLC z detektorem MS.

W pierwszej kolejności wykonano analizę wzorców. Na rysunkach 44 - 47 zostały przedstawione chromatogramy i widma masowe składowych koniugatów będących związkami czynnymi bez dodatków enzymów i ekstraktu bezkomórkowego.

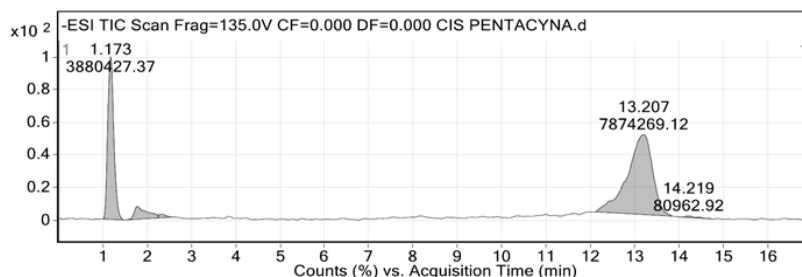


Rys.44. Chromatogram wodnego roztworu FMDP.

Widmo masowe przedstawione na rysunku 45 otrzymano dla FMDP eluowanego z czasem retencji 3,8 min. Otrzymany sygnał, który jest widoczny na poniższym widmie masowym ($m/z = 215,3$) pochodzi od FMDP i odpowiada $[M-H]^-$.

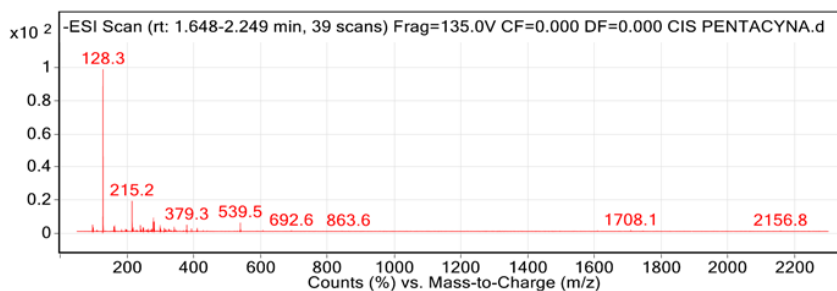


Rys.45. Widmo masowe FMDP, eluowanego z czasem 3,8 min.



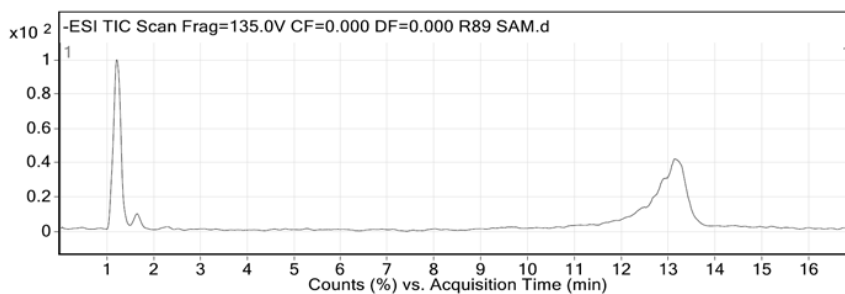
Rys.46. Chromatogram wodnego roztworu cispentacyny.

Czas retencji cispentacyny wynosi 1,9 min. Najsilniejszy sygnał widoczny na poniższym widmie ($m/z = 128,3$) odpowiada $[M-H]^-$ cis-pentacyny.

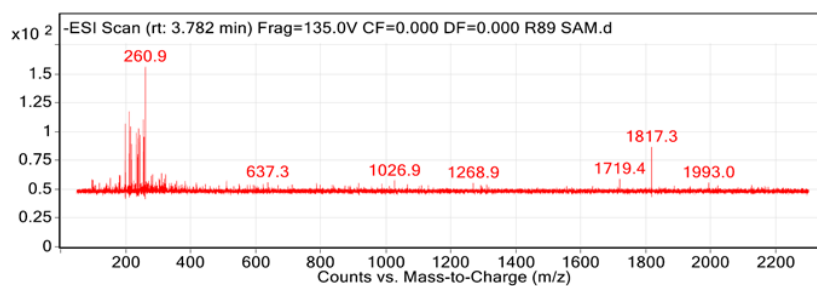


Rys.47. Widmo masowe cispentacyny eluowanej z czasem retencji 1,9 min.

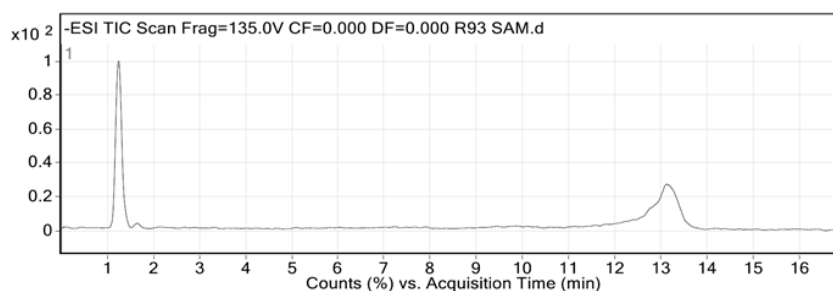
Kolejnymi związkami, które poddano wstępnej analizie w celu uzyskania informacji referencyjnych, były odpowiednio koniugaty K-Umb-8, K-Umb-10, K-Umb-11, K-Umb-13. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunkach 48 – 55.



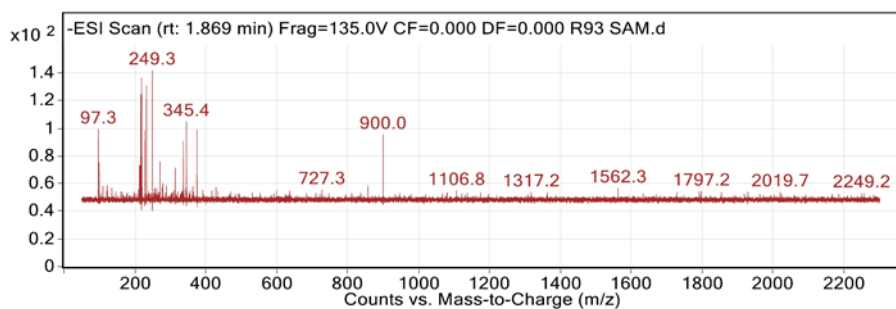
Rys.48. Chromatogram wodnego roztworu K-Umb-8.



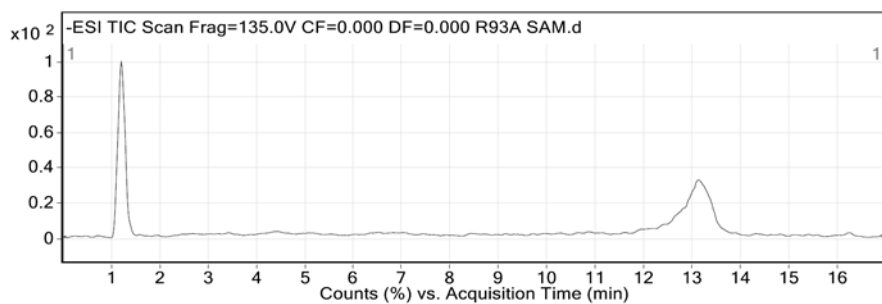
Rys.49. Widmo masowe związku K-Umb-8.



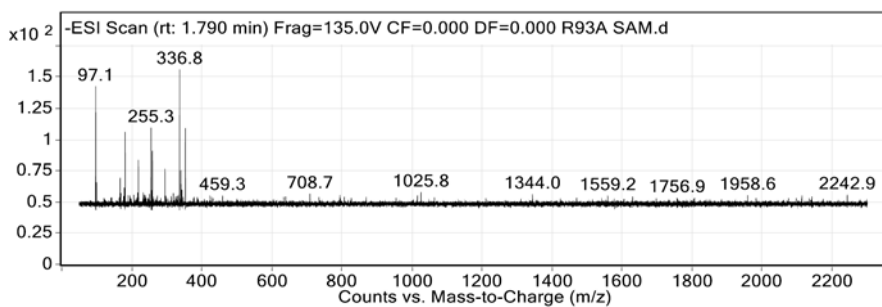
Rys.50. Chromatogram wodnego roztworu K-Umb-10.



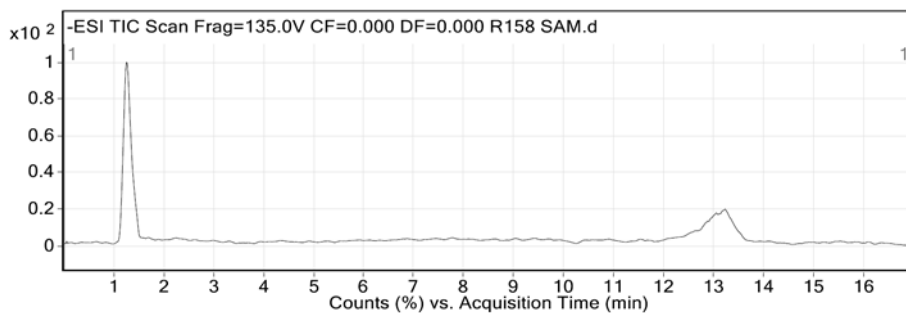
Rys.51. Widmo masowe związku K-Umb-10.



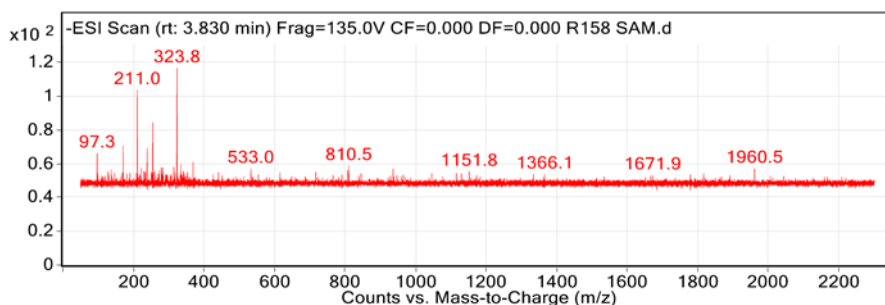
Rys.52. Chromatogram wodnego roztworu K-Umb-11.



Rys. 53. Widmo masowe związku K-Umb-11.



Rys.54. Chromatogram wodnego roztworu K-Umb-13.

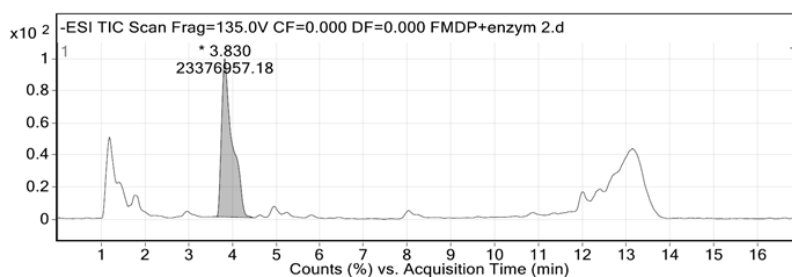


Rys.55. Widmo masowe związku K-Umb-13.

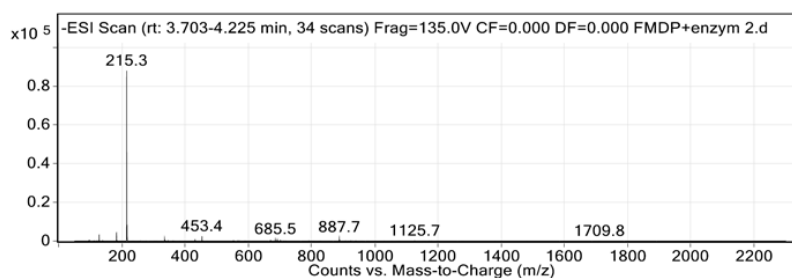
W otrzymanych chromatogramach występuje brak wyraźnych pików od koniugatów, a w widmach MS brak pików masowych dla tych związków. W konsekwencji, analiza mieszanin poreakcyjnych koniugatów poddanych hydrolizie enzymatycznej mogła być oparta jedynie na poszukiwaniu pików pochodzących od uwolnionych inhibitorów enzymatycznych (FMDP lub cispentacyny).

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie, czy pod wpływem esteraży zachodzi hydroliza enzymatyczna koniugatów z TML i uwolnienie cząsteczki aktywnej. Zwrócono szczególną uwagę na sygnały, które pochodziły od FMDP ($m/z = 215,3$) lub cispentacyny ($m/z = 128,3$), które mogłyby świadczyć, że cząsteczka aktywna została uwolniona z koniugatu.

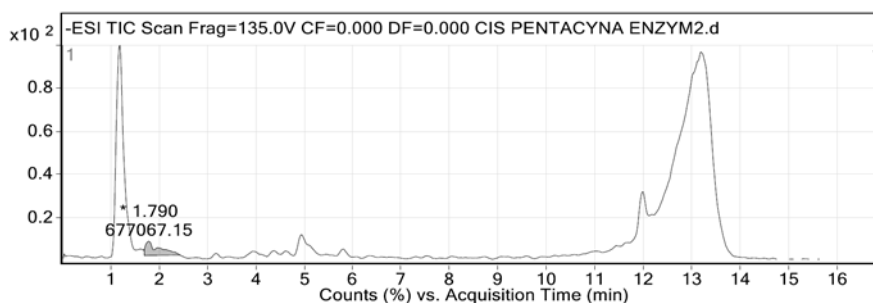
W pierwszej kolejności sprawdzono zachowanie inhibitorów (FMDP i cispentacyny) w obecności esteraży. Było to niezbędne, ponieważ FMDP zawiera w swojej strukturze wiązanie estrowe, które mogłyby ulec modyfikacji pod wpływem działania esteraży. Dzięki temu, można było uzyskać informacje, jakich sygnałów można spodziewać się po działaniu esteraży na koniugat. Poniżej przedstawiono chromatogramy i widma masowe otrzymane na tym etapie badania (rys.56 - 59).



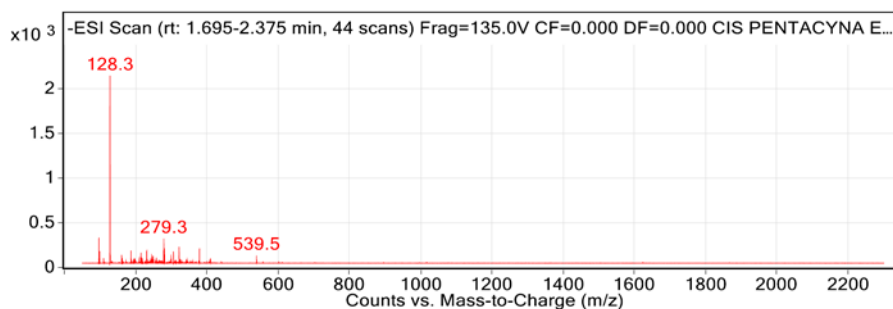
Rys.56. Chromatogram FMDP poddanemu działaniu esteraży.



Rys.57. Widmo masowe FMDP poddanemu działaniu esteraży.



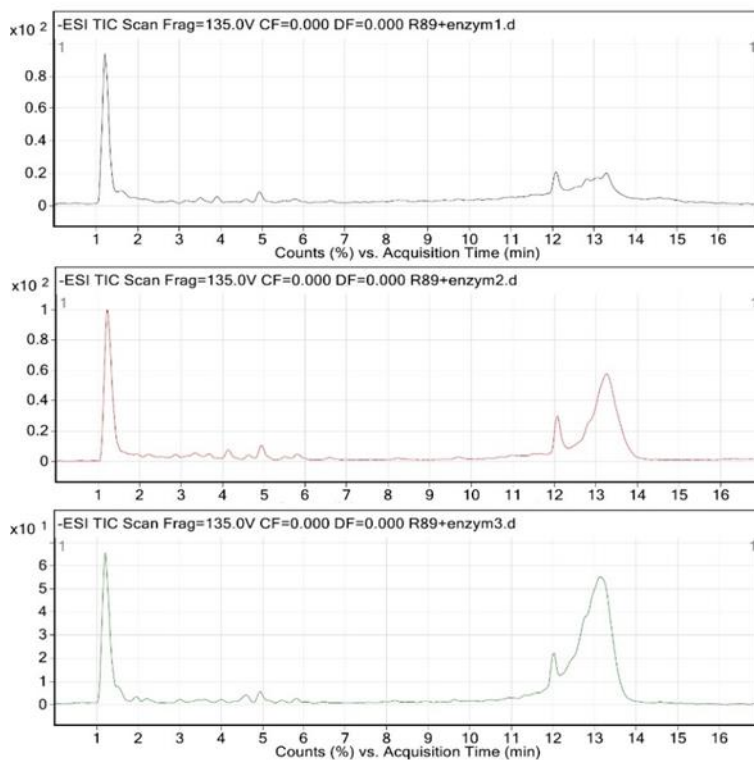
Rys.58. Chromatogram cispentacyny poddanej działaniu esterazy.



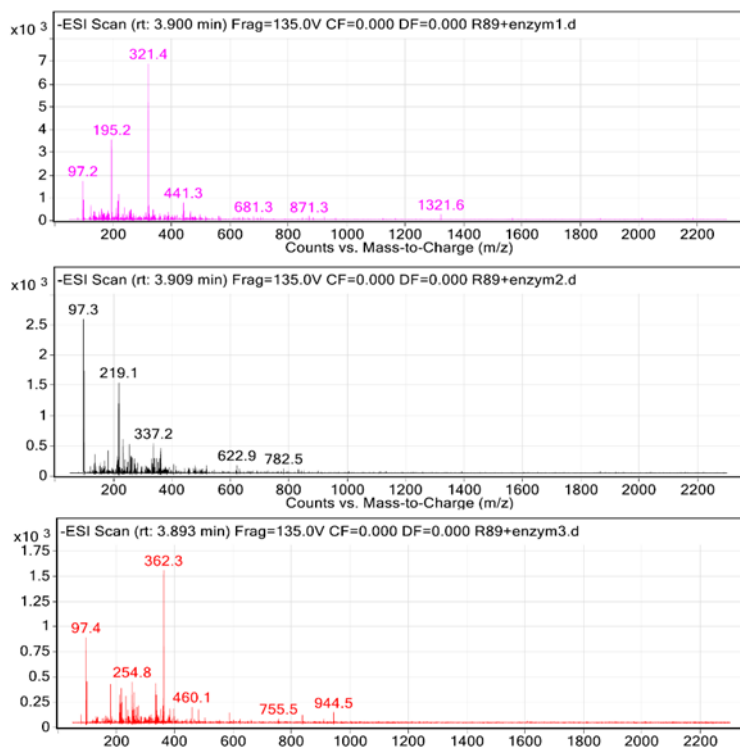
Rys.59. Widmo masowe cispentacyny poddanej działaniu esterazy.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że ani FMDP ani cispentacyna nie ulegają zmianie pod wpływem działania esterazy, więc oczekiwany sygnał od tych składowych koniugatu może pozostać w formie pierwotnej takiej, jak przedstawiono na rysunkach 44 - 47.

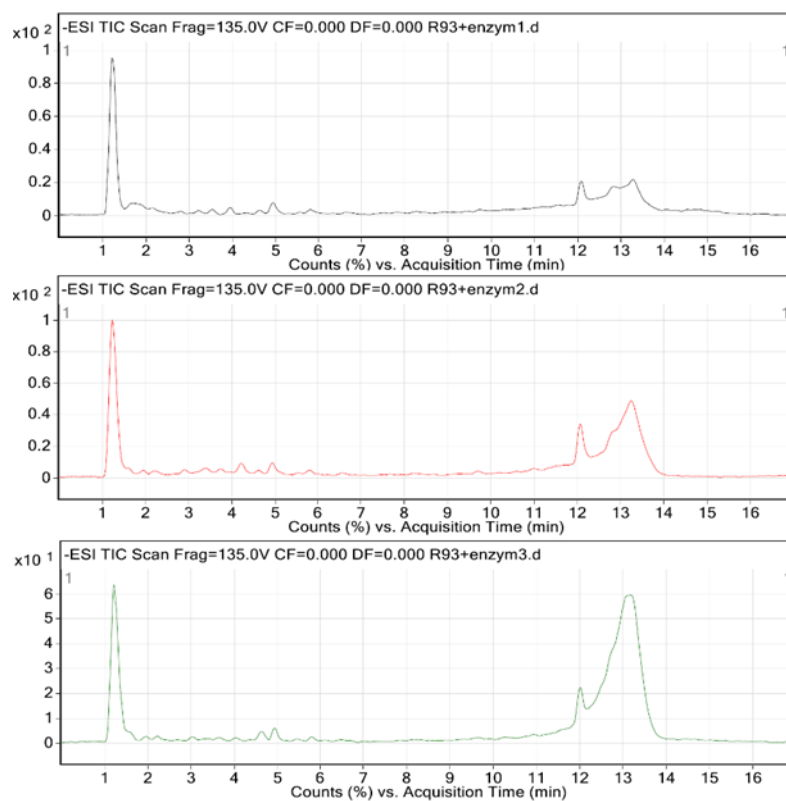
W dalszym etapie wykonano badania dotyczące wpływu działania esterazy na związki K-Umb-8, K-Umb-10, K-Umb-11 i K-Umb-13. Analiza chromatogramów oraz widm masowych polegała na poszukiwaniu sygnałów pochodzących od FMDP (w przypadku związków K-Umb-8 i K-Umb-13) lub cis-pentacyny (w przypadku związków K-Umb-10 oraz K-Umb-11). Poniżej na rysunkach 60-67 przedstawiono otrzymane na tym etapie wyniki.



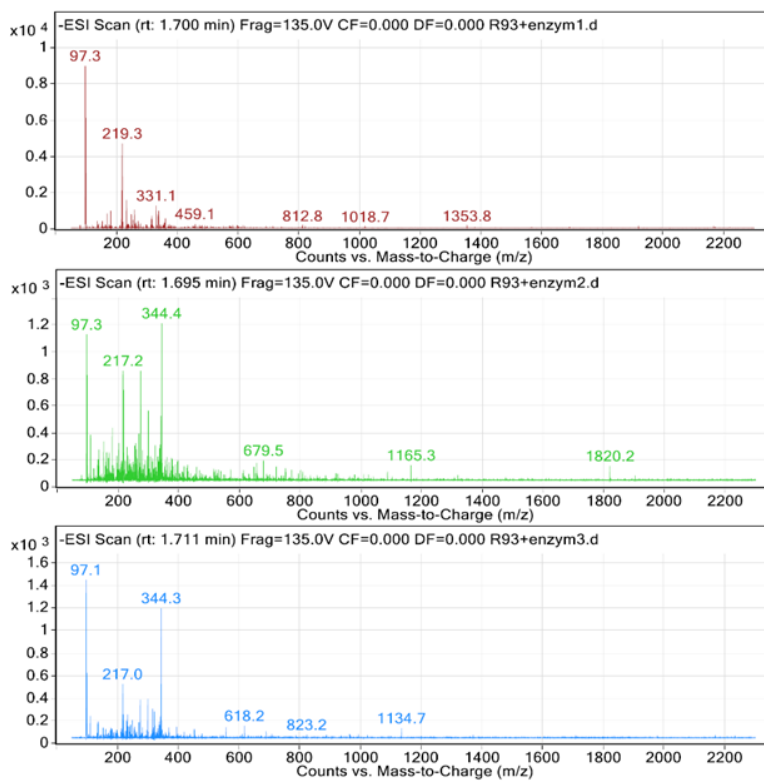
Rys.60. Chromatogramy związku K-Umb-8, który został poddany działaniu esteraży (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



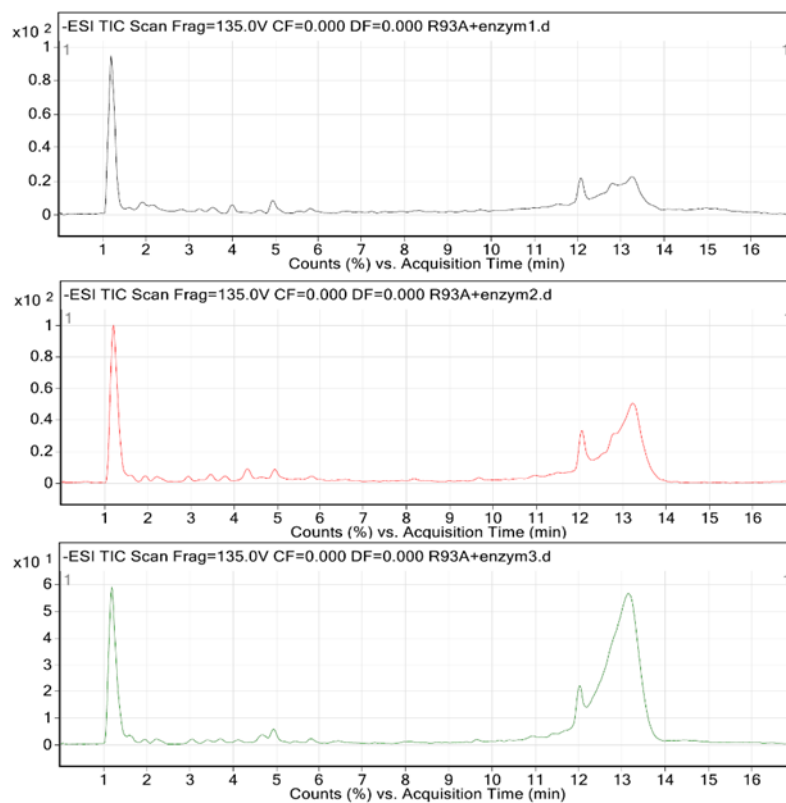
Rys.61. Widma masowe związku K-Umb-8, który został poddany działaniu esteraży (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



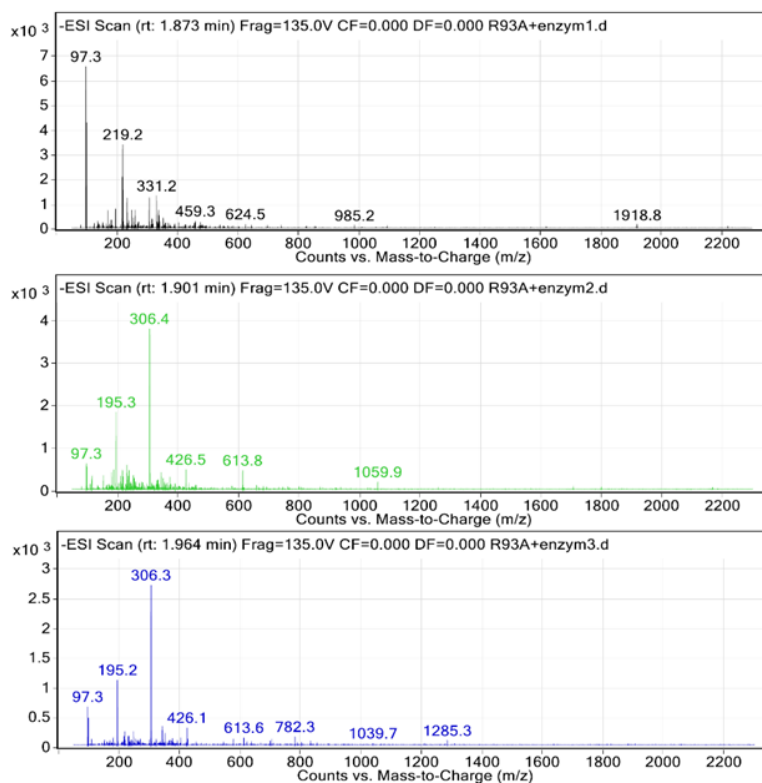
Rys.62. Chromatogramy związku K-Umb-10, który został poddany działaniu esterazy (czas trwania hydrolyzy: 0, 40 i 120 minut).



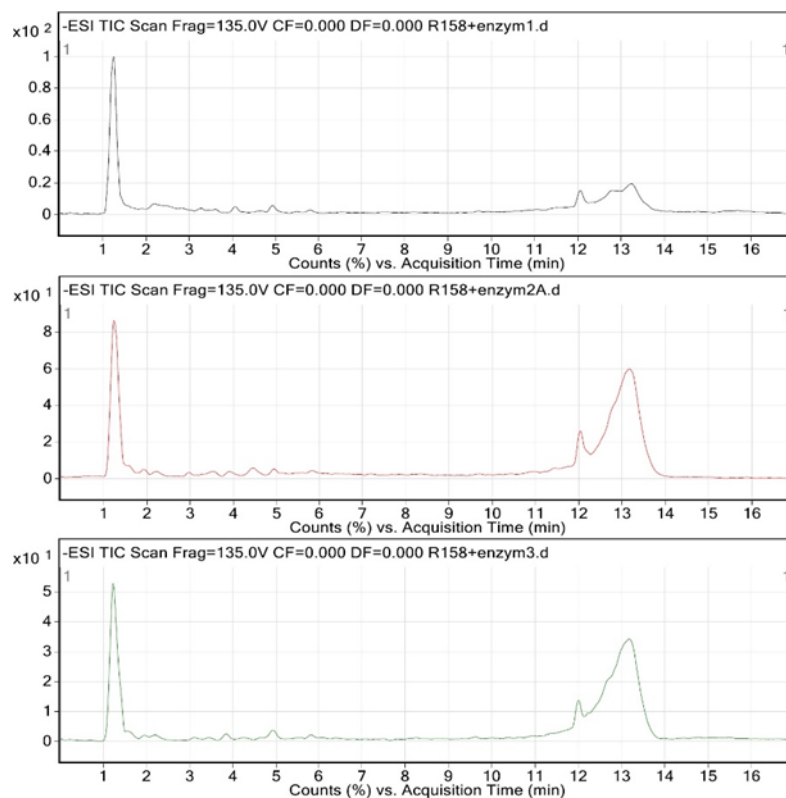
Rys.63. Widma masowe związku K-Umb-10, który został poddany działaniu esterazy (czas trwania hydrolyzy: 0, 40 i 120 minut).



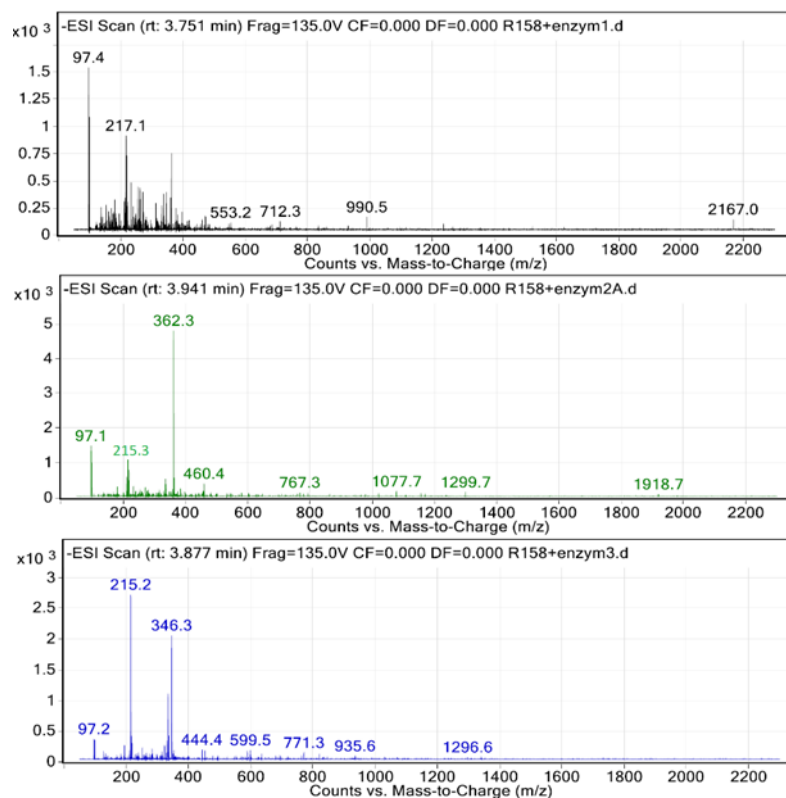
Rys.64. Chromatogramy związku K-Umb-11, który został poddany działaniu esteraży (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



Rys.65. Widma masowe związku K-Umb-11, który został poddany działaniu esteraży (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



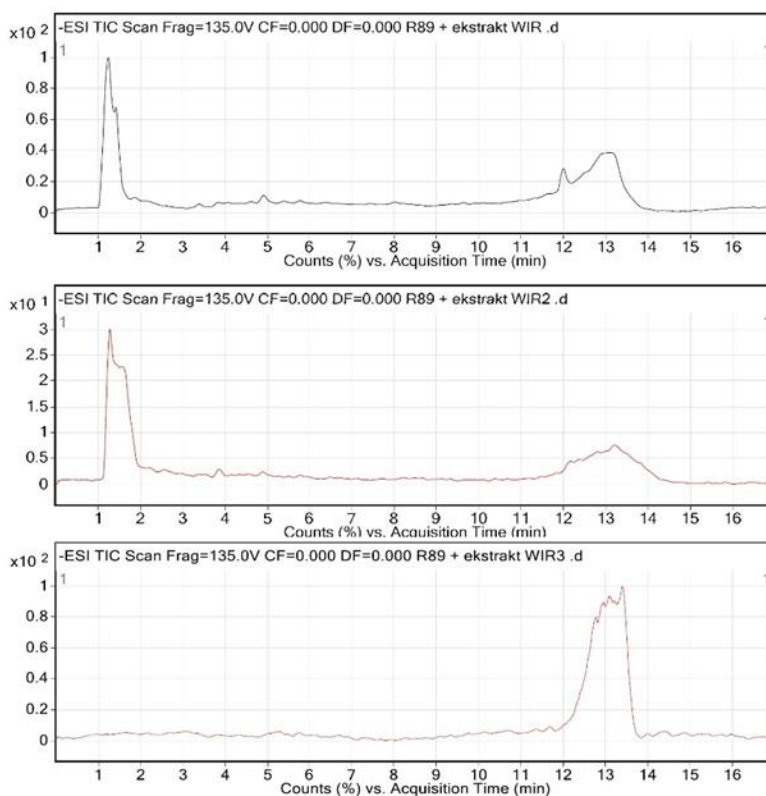
Rys.66. Chromatogramy związku K-Umb-13, który został poddany działaniu esteraży (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



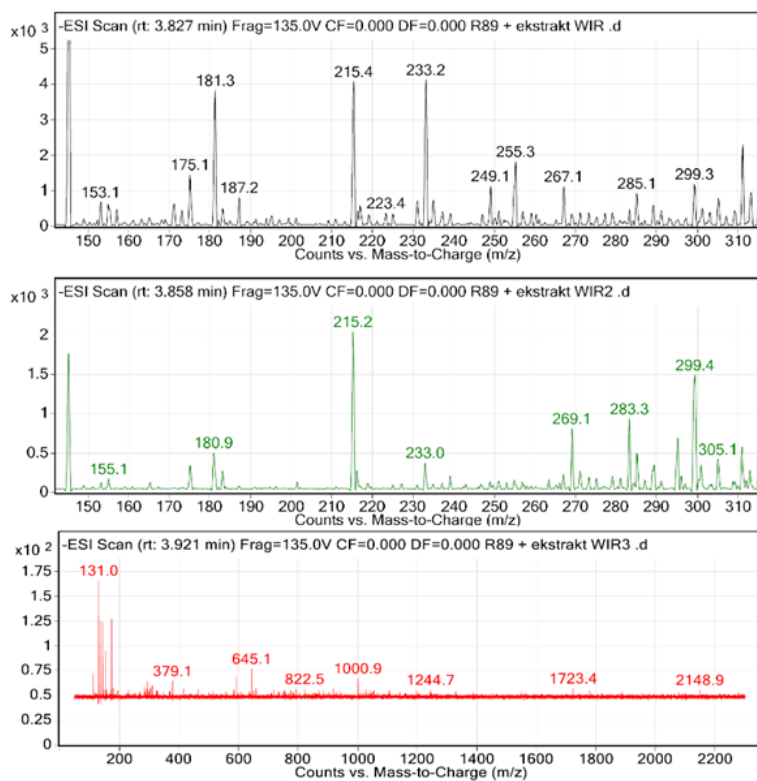
Rys.67. Widma masowe związku K-Umb-13, który został poddany działaniu esteraży (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).

Po wykonaniu wszystkich pomiarów przeanalizowano wyniki, które ujawniły, że działanie esterazy na koniugaty K-Umb-8, K-Umb-10 i K-Umb-11 nie powoduje uwolnienia inhibitora enzymatycznego (FMDP lub cis-pentacyny). W chromatogramach K-Umb-13 nie zaobserwowano sygnału o czasie retencji 1,9, ale w widmach masowych dla 40 min oraz 120 min inkubacji można zaobserwować pik o $m/z = 215,3$, co odpowiada $[M-H]^-$ dla FMDP, którego intensywność jest większa dla próby pobranej po dłuższym czasie inkubacji. Otrzymane wyniki oznaczają, że K-Umb-13 ulega przypuszczalnie hydrolizie pod wpływem enzymu uwalniającego FMDP, jednak szybkość tej hydrolizy jest niewielka.

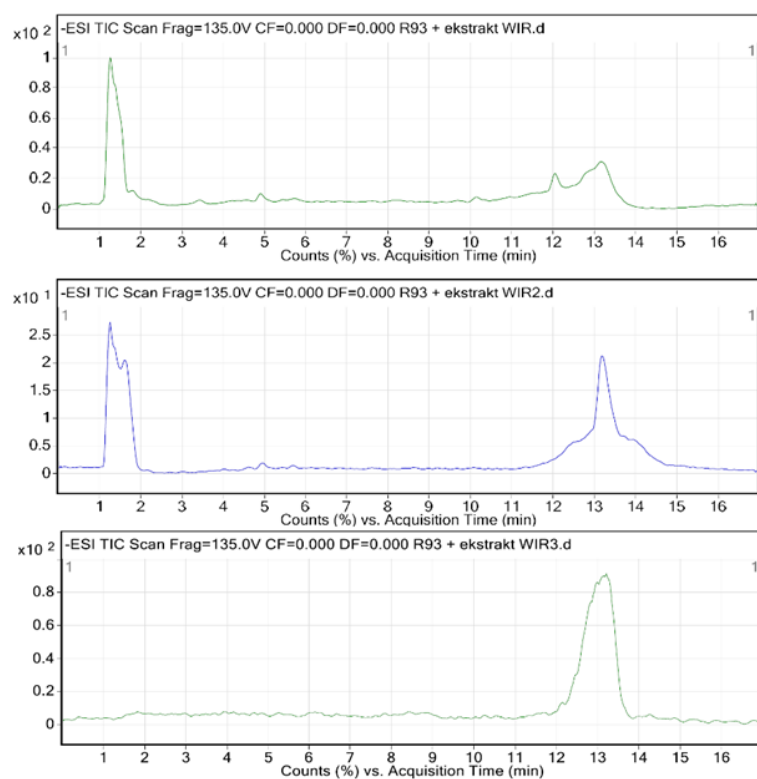
W drugim etapie tych badań dokonano analizy możliwego rozkładu koniugatów pod wpływem ekstraktu bezkomórkowego komórek *C.albicans ATCC 10231*. W przypadku związków K-Umb-8 i K-Umb-13 zwracano uwagę na sygnał pochodzący od FMDP (czas retencji ok. 3,8 min), a w przypadku K-Umb-10 i K-Umb-11 zwracano uwagę na sygnał pochodzący od cispentacyny (czas retencji ok.1,9 min). Na rysunkach 68 - 75 przedstawiono otrzymane chromatogramy i widma masowe.



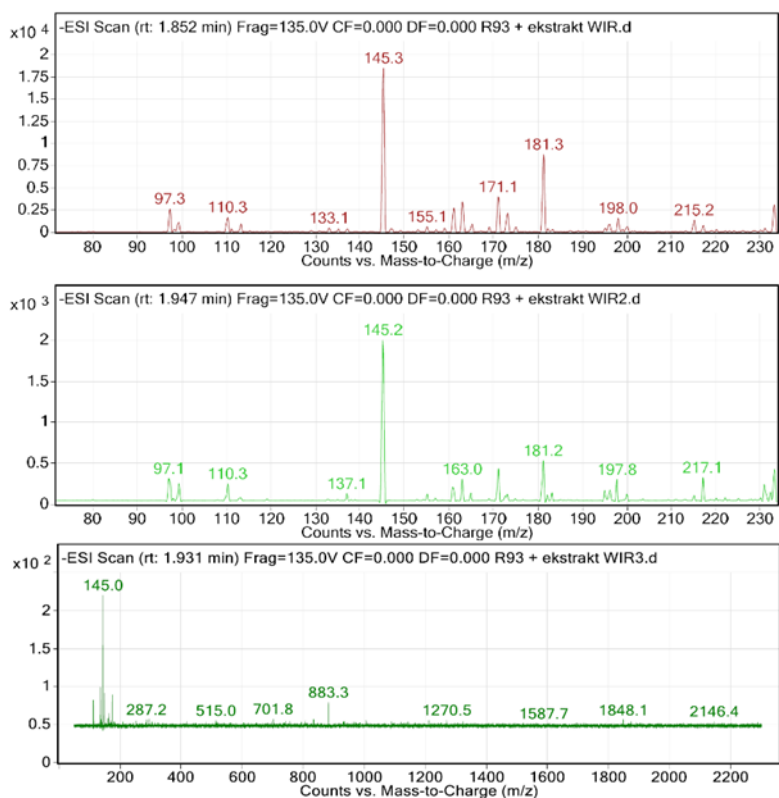
Rys.68. Chromatogramy związku K-Umb-8, który został poddany działaniu ekstraktu bezkomórkowego (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



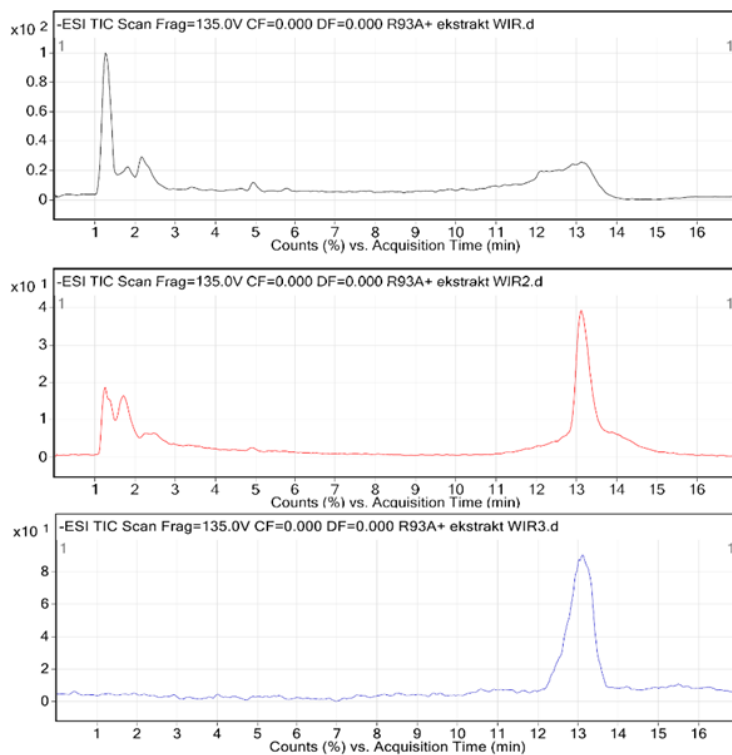
Rys.69. Widma masowe związku K-Umb-8, który został poddany działaniu ekstraktu bezkomórkowego (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



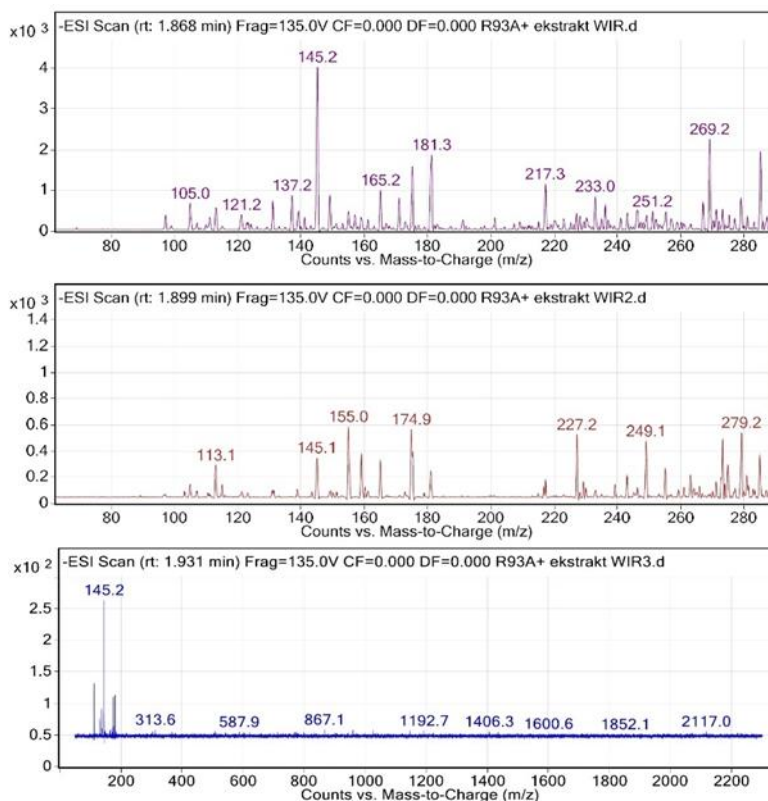
Rys.70. Chromatogramy związku K-Umb-10, który został poddany działaniu ekstraktu bezkomórkowego (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



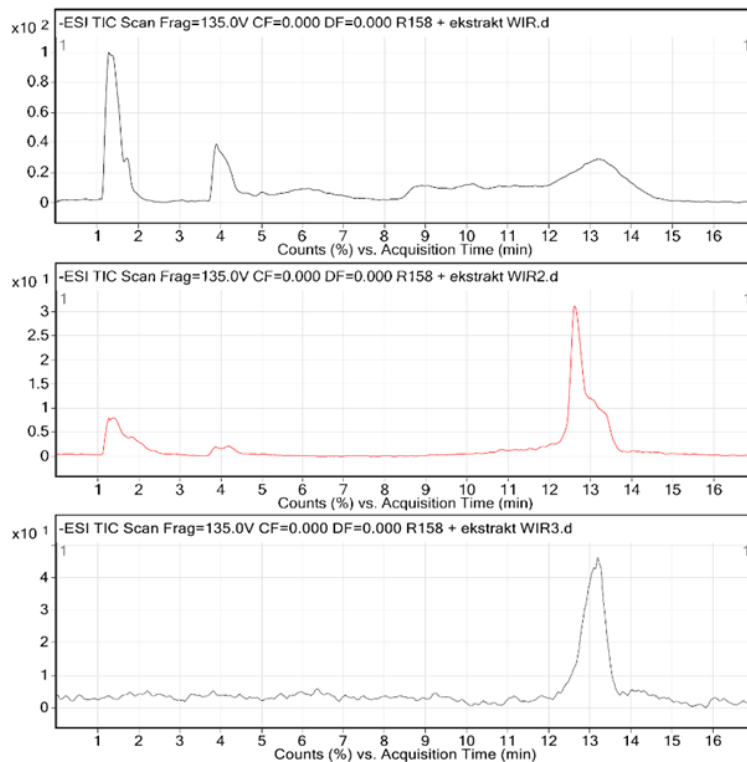
Rys.71. Widma masowe związku K-Umb-10, który został poddany działaniu ekstraktu bezkomórkowego (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



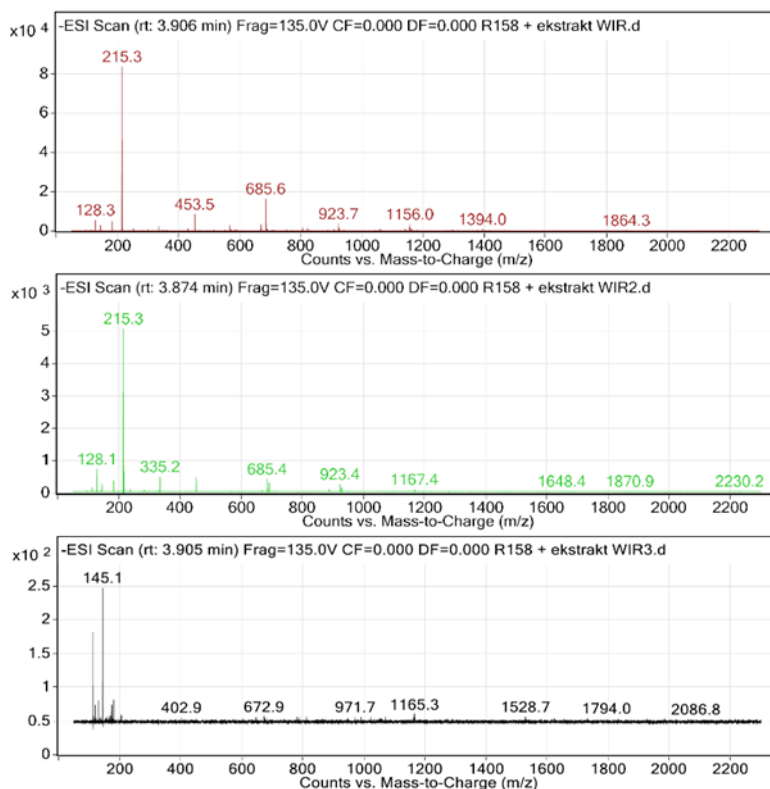
Rys.72. Chromatogramy związku K-Umb-11, który został poddany działaniu ekstraktu bezkomórkowego (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



Rys.73. Widma masowe związku K-Umb-11, który został poddany działaniu ekstraktu bezkomórkowego (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



Rys.74. Chromatogramy związku K-Umb-13, który został poddany działaniu ekstraktu bezkomórkowego (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



Rys.75. Widma masowe związku K-Umb-13, który został poddany działaniu ekstraktu bezkomórkowego (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).

Analizując powyższe wyniki, można stwierdzić, że jednoznaczne rezultaty otrzymano dla koniugatu K-Umb-13. Uwalnianie z tego koniugatu FMDP zostało potwierdzone poprzez obecność pików o czasie retencji 3,8 min oraz sygnału $m/z = 215,3$ w widmach masowych. W przypadku koniugatu K-Umb-8, hydroliza pod wpływem ekstraktu bezkomórkowego i tym samym uwolnienie FMDP jest możliwa (odpowiedni sygnał w widmie MS), ale brak sygnału na chromatogramie świadczy o tym, że hydroliza enzymatyczna może zachodzić wolno. W przypadku chromatogramów koniugatów K-Umb-10 i K-Umb-11 poddanych hydrolizie w ekstrakcie bezkomórkowym nie występują piki o czasie retencji 1,8 min, ale w widmach MS pojawiają się piki o $m/z = 145,1$ lub $m/z = 145,2$, które odpowiadają $M+16$ masy cis-pentacyny. Może to świadczyć o tym, że cispentacyna jest uwalniania z koniugatu, ale dalej ulega modyfikacji (np. wprowadzeniu grupy $-OH$).

Określenie mechanizmu działania parasoli z cispentacyną przy zastosowaniu odwracalnego charakteru L-izoleucyny względem cispentacyny

Cis-pentacynę można uznać za antymetabolit L-izoleucyny, gdyż jest ona inhibitorem syntetazy Ile-tRNA^{Ile}, dla której L-Ile jest substratem. W celu określenia, czy obserwowane hamowanie wzrostu *C. albicans* przez koniugat K-Umb-11 jest konsekwencją hamowania aktywności Ile-tRNA^{Ile}, wykonano badanie polegające na próbie odwrócenia działania K-Umb-11 i cispentacyny poprzez dodanie L-izoleucyny do podłoża minimalnego. Badanie zostało wykonane względem szczepu *C.albicans* ATCC 10231 w minimalnym podłożu płynnym YNB-SA oraz w minimalnym podłożu płynnym YNB-SA z dodatkiem 10 mM L-Ile. Wyniki przedstawiono w tabeli 20.

Tab.20. Wpływ obecności L-izoleucyny w podłożu na aktywność grzybobójczą cispentacyny i koniugatu K-Umb-11.

	YNB – SA		YNB – SA + L-Ile	
	MIC ₉₀ [mM]	MIC ₅₀ [mM]	MIC ₉₀ [mM]	MIC ₅₀ [mM]
cispentacyna	0,081	0,015	0,453	0,111
K-Umb-11	0,251	0,148	0,239	0,152

Nie ulega wątpliwości, że dodatek L-Ile powoduje znaczące odwrócenie działania cispentacyny, natomiast można zauważyć brak wpływu obecności tego aminokwasu na działanie K-Umb-11. Może to oznaczać, że aktywność przeciwgrzybowa K-Umb-11 wynika z innego powodu niż obecność cispentacyny w strukturze koniugatu.

Wyniki uzyskane w tej części pracy wskazują, że koniugaty parasoli molekularnych z FMDP i cispentacyną w głównej mierze nie wykazują aktywności przeciwgrzybowej względem szczepów *C.albicans*, *C.glabrata* oraz *C. krusei*. Jedynym koniugatem, który wykazał aktywność zbliżoną do aktywności cząsteczki aktywnej – cispentacyny – był K-Umb-11. Badania dotyczące rozkładu enzymatycznego koniugatów w układzie modelowym i w ekstrakcie bezkomórkowym nie były jednoznaczne w kwestii uwalniania przez koniugat cząsteczki aktywnej. Jednakże zbadanie działania parasola z cispentacyną przy zastosowaniu odwracalnego charakteru L-izoleucyny względem cispentacyny wskazało, że aktywność parasola nie jest związana z obecnością cispentacyny w strukturze cząsteczki. Brak aktywności pozostałych koniugatów może być częściowo spowodowany brakiem ich zdolności do wnikania do wnętrza komórek grzybowych. Badania na ten temat wykazały, że koniugat K-Umb-15 z łącznikiem TML oraz łańcuchem w łączniku o długości n=6 znakowany fluorescencyjnie, nie wnika do wnętrza komórek grzybowych. Jednak nie można mieć pewności, że każdy z koniugatów nie ma zdolności do wnikania do tych komórek, ponieważ nie było możliwości wykonania obserwacji mikroskopowych dla każdego ich rodzaju.

3.4.3. Działanie biologiczne koniugatów FMDP i cispentacyny z nanośnikami lipidowymi

Kolejną grupą badanych związków były koniugaty FMDP i cis-pentacyny z nanośnikami lipidowymi, w strukturze których występuje ugrupowanie TML. Koniugaty te różnią się strukturą fragmentu lipidowego o charakterze alifatycznego lub aromatycznego kwasu karboksylowego występującego jako acyl tworzący wiązanie estrowe z grupą -OH TML.

Aktywność przeciwgrzybowa in vitro koniugatów nanośników lipidowych z FMDP i cispentacyną

Określono aktywność przeciwgrzybową *in vitro* koniugatów wobec *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. krusei*. Wyznaczono wartości MIC₅₀ i MIC₉₀ dla cis-pentacyny, FMDP i 6 koniugatów w podłożu RPMI-1640, rekomendowanym do określania aktywności przeciwgrzybowej w procedurze CLSI oraz w podłożu minimalnym YNB. Wyniki przedstawiono w tabelach 21 i 22.

Tab. 21. Aktywności przeciwgrzybowa koniugatów cis-pentacyny i FMDP z nanośnikami lipidowymi w podłożu RPMI-1640. Przedstawiono średnie wartości z co najmniej trzech oznaczeń.

Nazwa związku	MIC [mM]							
	<i>C.albicans ATCC 10231</i>		<i>C. albicans SC 5314</i>		<i>C.glabrata DSM 11226</i>		<i>C.krusei DSM 6128</i>	
	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀
K-Lip-1	>>1	0,8	>>1	0,85	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Lip-2	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Lip-3	0,23	0,13	0,85	0,3	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Lip-4	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Lip-5	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Lip-6	0,3	0,16	0,91	0,53	>>1	>>1	>>1	>>1
Cispentacyna	0,34	0,08	0,36	0,21	>>1	0,51	0,57	0,28
FMDP	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1

Tab. 22. Aktywności przeciwgrzybowa koniugatów cis-pentacyny i FMDP z nanonośnikami lipidowymi w podłożu YNB. Przedstawiono średnie wartości z co najmniej trzech oznaczeń.

Nazwa związku	MIC [mM]							
	<i>C.albicans ATCC 10231</i>		<i>C. albicans SC 5314</i>		<i>C.glabrata DSM 11226</i>		<i>C.krusei DSM 6128</i>	
	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀
K-Lip-1	>>1,8	0,6	>>1,8	0,9	>>1,8	>>1,8	>>1,8	>>1,8
K-Lip-2	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Lip-3	0,15	0,07	0,48	0,1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Lip-4	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Lip-5	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1
K-Lip-6	0,22	0,1	0,57	0,38	>>1	>>1	>>1	>>1
Cispentacyna	0,1	0,02	0,15	0,1	0,5	0,1	0,15	0,09
FMDP	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1	>>1

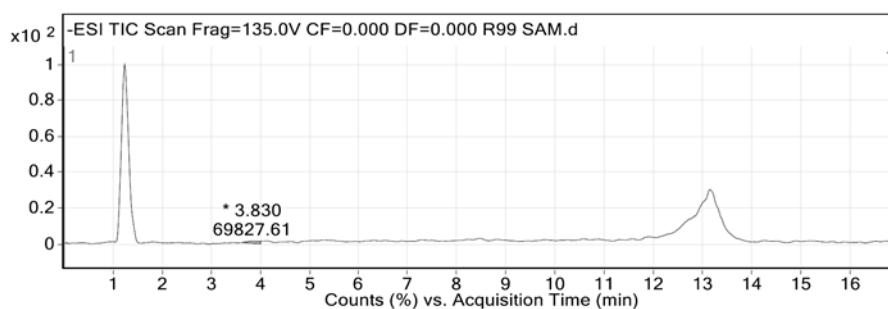


Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że aktywność wobec *C. albicans* wykazują dwa z sześciu koniugatów t.j. K-Lip-3, K-Lip-6. W obu związkach występuje ta sama struktura nanośnika, a różnią się one obecnością inhibitora, czyli FMDP w K-Lip-3 i cis-pentacyny w K-Lip-6. Aktywność obu związków była nieco wyższa w podłożu minimalnym YNB-SA. Oba związki, podobnie jak i pozostałe koniugaty, okazały się nieaktywne wobec komórek *C.glabrata* oraz *C.krusei*.

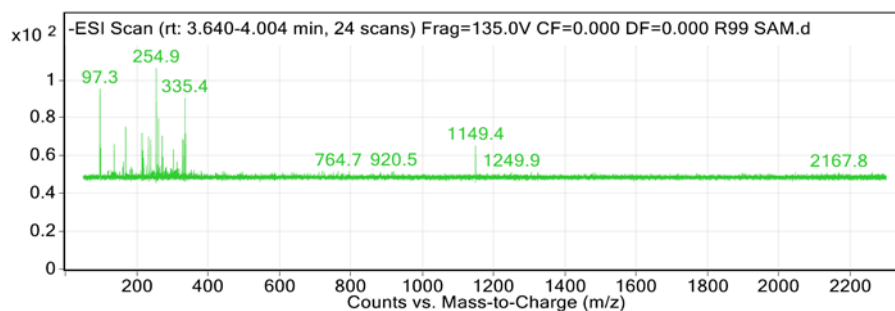
Analiza rozkładu enzymatycznego koniugatów w układzie modelowym i w ekstrakcie bezkomórkowym z wykorzystaniem RP-HPLC

W celu określenia, czy koniugaty lipidowe zawierające TML ulegają hydrolizie pod wpływem ekstraktu bezkomórkowego, wykonano badania przy pomocy RP-HPLC.

Po analizie wzorców przeprowadzono właściwe badanie związku K-Lip-1, który pełnił rolę reprezentanta tej grupy związków. Wyniki dla związku bez dodatku enzymu oraz bez ekstraktu bezkomórkowego przedstawiono na rysunku 76 i 77.



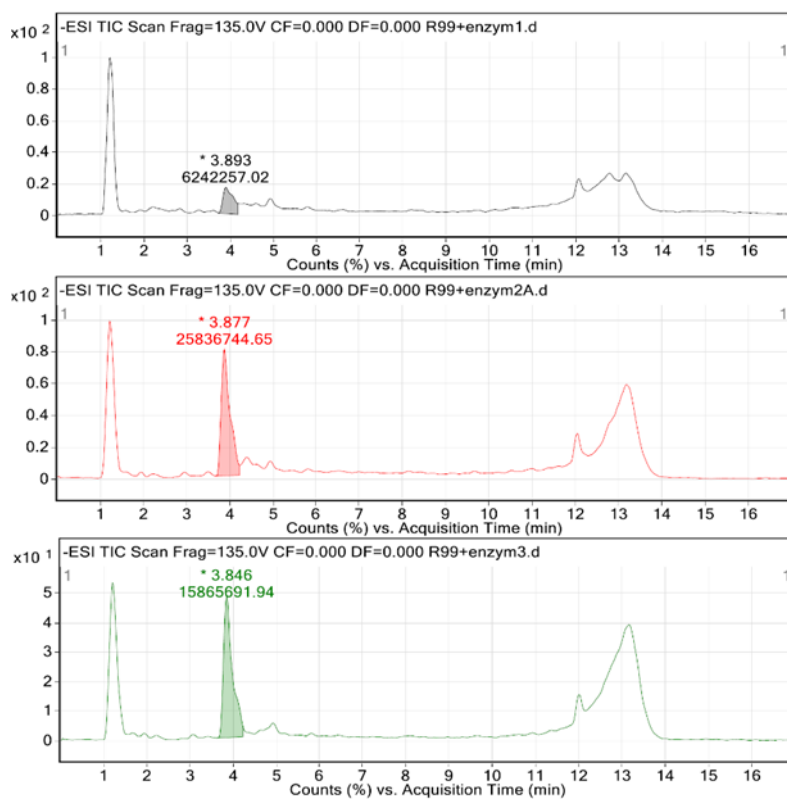
Rys.76. Chromatogram roztworu K-Lip-1 w DMSO.



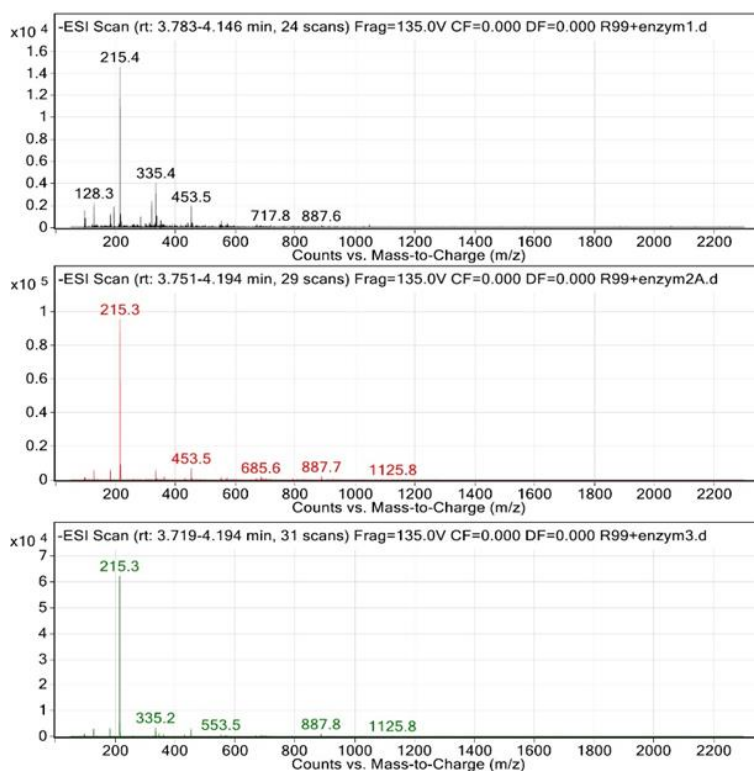
Rys.77. Widmo masowe związku K-Lip-1.

Podobnie jak w analogicznej analizie z poprzedniego rozdziału, charakterystyczne sygnały, których poszukiwano w dalszych etapach eksperymentu dotyczyły FMDP ($m/z = 215,3$), które występowało w strukturze koniugatu jako cząsteczka aktywna.

W dalszym etapie wykonano badania dotyczące działania esterazy na związek K-Lip-1. Analiza chromatogramów i widm masowych polegała na poszukiwaniu sygnałów pochodzących od FMDP. Poniżej na rysunkach 78 i 79 przedstawiono otrzymane rezultaty.



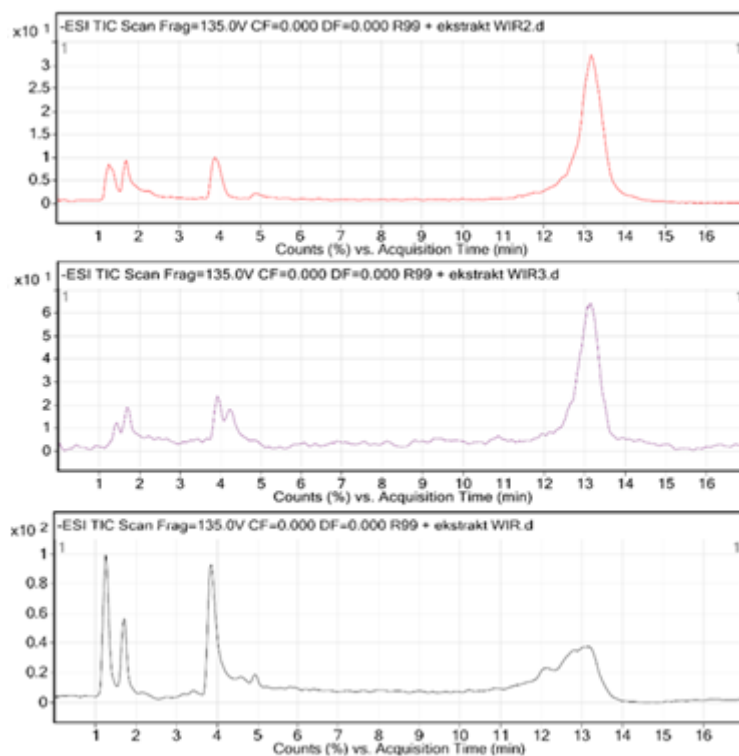
Rys.78. Chromatogramy związku K-Lip-1, który został poddany działaniu esterazy (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



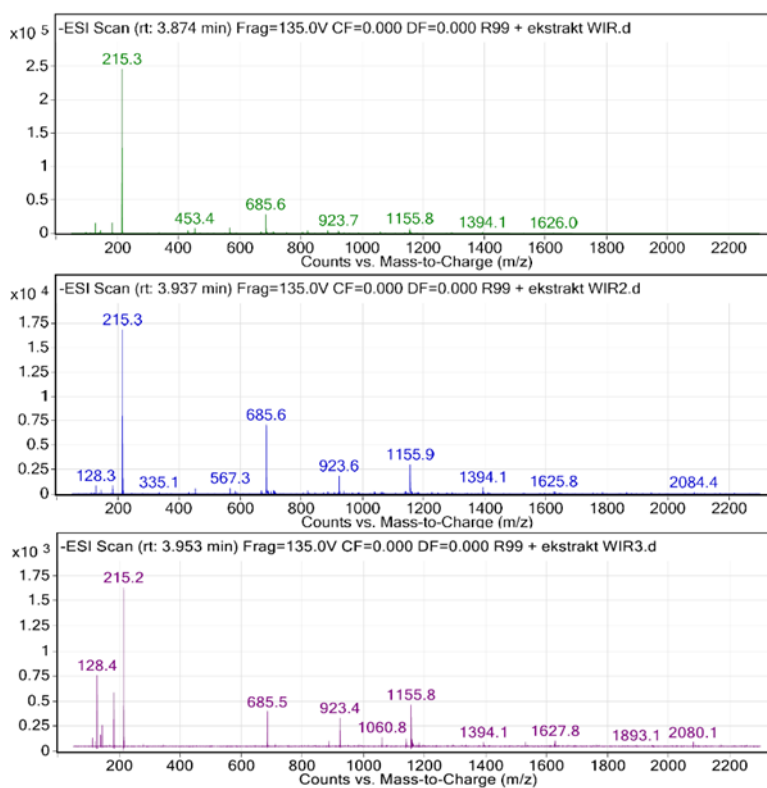
Rys.79. Widma masowe związku K-Lip-1, który został poddany działaniu esterazy (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).

W powyższych wynikach można zaobserwować piki o czasie retencji 3,8 min, które pochodzą od FMDP, co zostało również potwierdzone przez analizę widma masowego tego związku (sygnał $m/z = 215,3$). Otrzymane wyniki oznaczają, że K-Lip-1 ulega hydrolizie pod wpływem enzymu uwalniając FMDP. Warto również zauważyć, że szybkość hydrolizy dla koniugatu K-Lip-1 jest wysoka w porównaniu z wynikami otrzymanymi dla koniugatów parasoli molekularnych z FMDP i cispentacyną (rozdział 3.4.2.). Może być to spowodowane różnicą w wielkości i budowie przestrzennej cząsteczki.

Ostatnim etapem badania było sprawdzenie, czy koniugat ulega hydrolizie pod wpływem ekstraktu bezkomórkowego komórek *C.albicans ATCC 10231*. Na rysunkach 80 i 81 przedstawiono otrzymane chromatogramy i widma masowe.



Rys.80. Chromatogramy związku K-Lip-1, który został poddany działaniu ekstraktu bezkomórkowego (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).



Rys.81. Widma masowe związku K-Lip-1, który został poddany działaniu ekstraktu bezkomórkowego (czas trwania hydrolizy: 0, 40 i 120 minut).

Analizując powyższe wyniki, można jednoznacznie stwierdzić, że związek K-Lip-1 ulega hydrolizie pod wpływem enzymów zawartych w ekstrakcie bezkomórkowym z *C. albicans*. Uwalnianie z koniugatu cząsteczki FMDP zostało wykazane poprzez obecność pików o czasie retencji 3,8 min oraz sygnału $m/z = 215,3$ w widmach masowych.

Określenie mechanizmu działania związków lipidowych z TML i FMDP przy zastosowaniu odwracalnego charakteru N-acetylo-glukozaminy z FMDP oraz L-izoleucyny z cispentacyną

Aby określić mechanizm działania koniugatów, w dalszej kolejności wykonano badanie polegające na próbie odwrócenia działania przeciwgrzybowego koniugatu FMDP poprzez dodanie N-acetylo-D-glukozaminy do podłoża hodowlanego. Dzięki takiemu badaniu można stwierdzić, czy aktywność przeciwgrzybowa wykazywana przez dany związek, jest efektem działania FMDP dołączonego do wybranego nośnika. Analogicznie wykonano próbę ze związkiem zawierającym cispentacynę, w przypadku którego do podłoża dodano L-izoleucynę. Do badania wykorzystano związek K-Lip-6 oraz związek K-Lip-3. Badanie zostało wykonane względem szczepu *C. albicans* ATCC 10231 w minimalnym podłożu płynnym YNB-SA oraz w minimalnym podłożu płynnym YNB-SA z dodatkiem 10 mM N-acetylo-glukozaminy lub 10 mM L-izoleucyny. Wyniki przedstawiono w tabelach 23 - 24 poniżej.

Tab.23. Aktywność przeciwgrzybowa K-Lip-6 wobec szczepu *C. albicans* ATCC 10231 w przypadku płynnego podłoża minimalnego YNB-SA oraz podłoża YNB-SA z dodatkiem L-Ile.

	YNB – SA		YNB – SA + L – Ile	
	MIC ₉₀ [mM]	MIC ₅₀ [mM]	MIC ₉₀ [mM]	MIC ₅₀ [mM]
cispentacyna	0,081	0,015	0,453	0,111
K-Lip-6	0,305	0,154	0,287	0,141

Tab.24. Aktywność przeciwgrzybowa K-Lip-3 wobec szczepu *C. albicans* ATCC 10231 w przypadku płynnego podłoża minimalnego YNB-SA oraz podłoża YNB-SA z dodatkiem N-acetylo-glukozaminy.

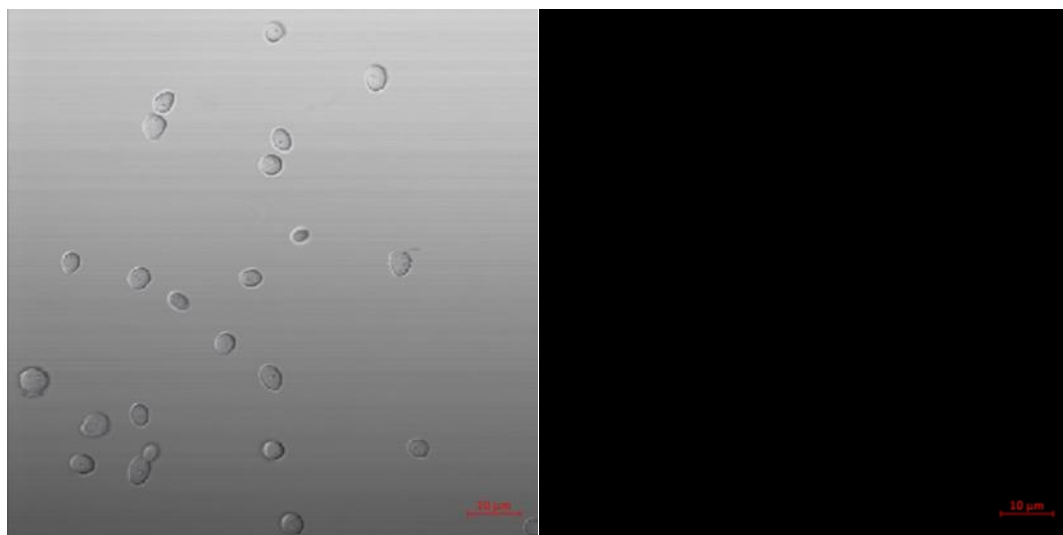
	YNB - SA		YNB - SA + NAG	
	MIC ₉₀ [mM]	MIC ₅₀ [mM]	MIC ₉₀ [mM]	MIC ₅₀ [mM]
K-Lip-3	0,173	0,083	0,167	0,096

W powyższych wynikach można zaobserwować brak jednoznacznej zależności pomiędzy aktywnością przeciwgrzybową K-Lip-3 a obecnością dodatku N-acetylo-glukozaminy w podłożu hodowlanym. Może to oznaczać, że aktywność przeciwgrzybowa K-Lip-3 wynika z innego powodu niż obecność FMDP w strukturze związku.

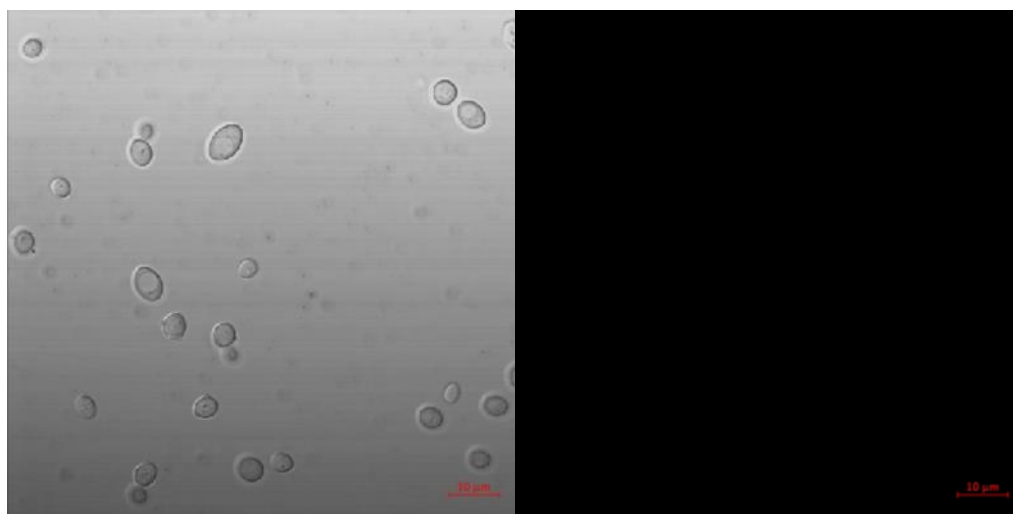
Podobne wnioski można wyciągnąć na podstawie wyników dla koniugatu K-Lip-6, który zawiera w swojej strukturze cispentacynę. Dodatek L-Ile nie wpływa znacząco na jego aktywność, co może świadczyć, że wynika ona z innego powodu niż obecność cispentacyny w strukturze koniugatu.

Jakościowa ocena zdolności koniugatów lipidowych z cispentacyną i FMDP do wnikania do komórek grzybowych za pomocą mikroskopii konfokalnej

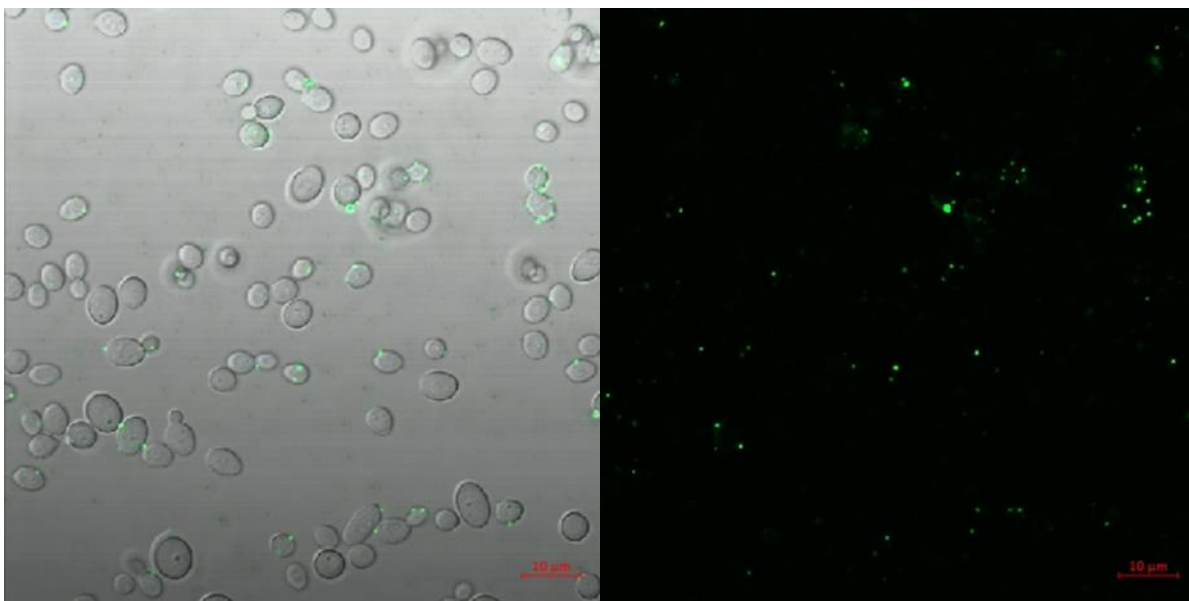
Kolejnym badaniem było określenie zdolności związków lipidowych do wnikania do komórek grzybowych. Wybrane koniugaty były znakowane fluoresceiną. Na poniższych zdjęciach przedstawiono obserwacje próbek inkubowanych ze związkami K-Lip-7 oraz K-Lip-8 (szczepy *C.albicans* ATCC 10231, *C.glabrata* oraz *C.krusei*).



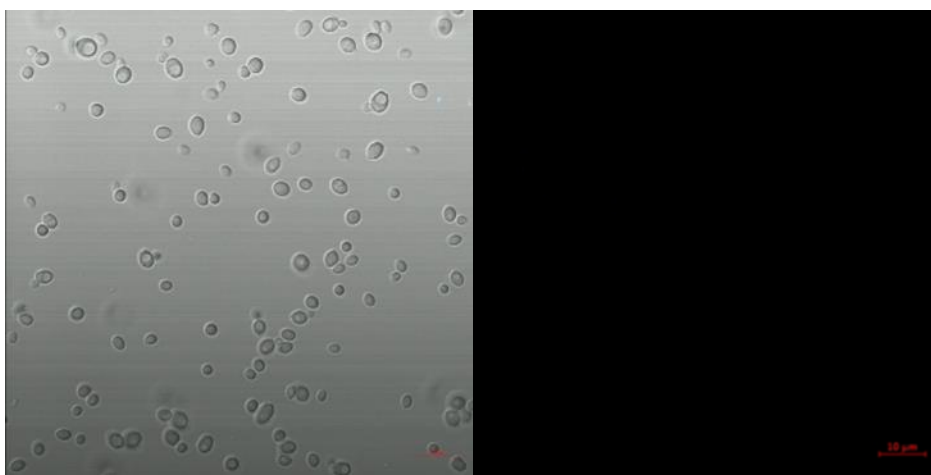
Rys.82. Komórki *C. albicans* ATCC inkubowane 30 min w 30°C – kontrola ujemna.



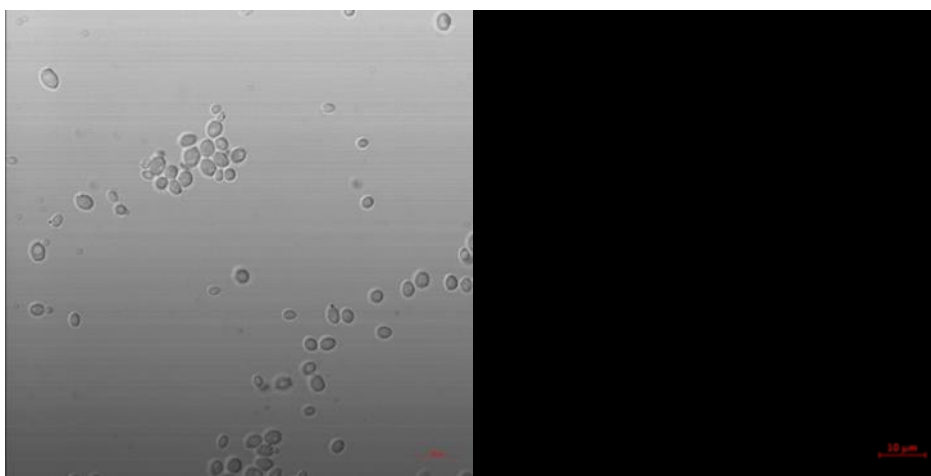
Rys.83. Komórki *C. albicans* ATCC inkubowane ze związkiem K-Lip-7 30 min w 30°C.



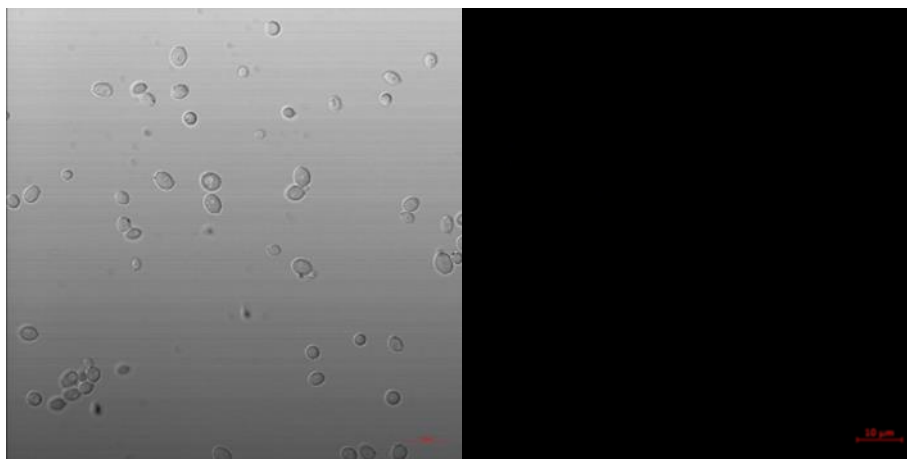
Rys.84. Komórki *C. albicans* ATCC inkubowane ze związkiem K-Lip-8 30 min w 30°C.



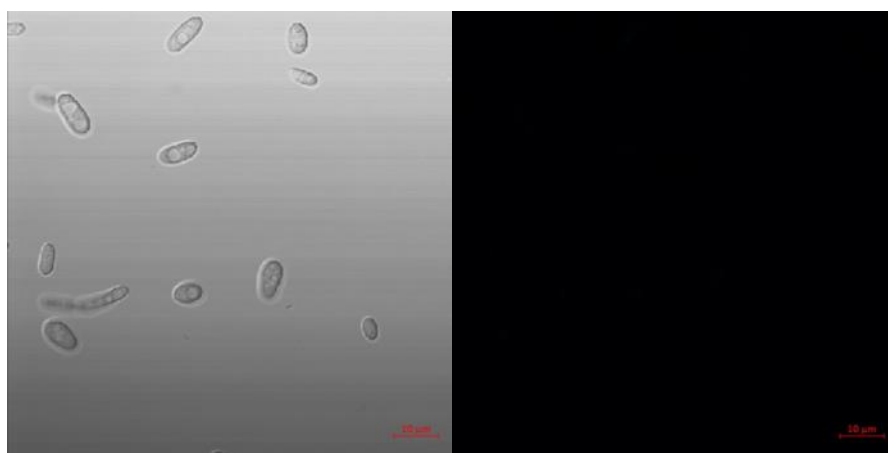
Rys.85. Komórki *C. glabrata* inkubowane 30 min w 30°C – kontrola ujemna.



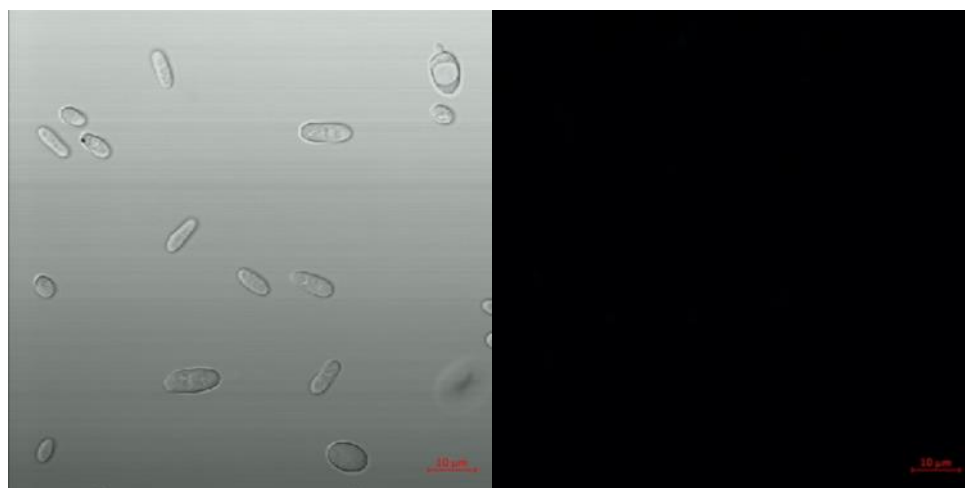
Rys.86. Komórki *C. glabrata* inkubowane ze związkiem K-Lip-7 30 min w 30°C.



Rys.87. Komórki *C. glabrata* inkubowane ze związkiem K-Lip-8 30 min w 30°C.



Rys.88. Komórki *C. krusei* inkubowane 30 min w 30°C – kontrola ujemna.



Rys.89. Komórki *C. krusei* inkubowane ze związkiem K-Lip-7 30 min w 30°C.



Rys.90. Komórki *C. krusei* inkubowane ze związkami K-Lip-8 30 min w 30°C.

Z wykonanych obserwacji wynika, że związek K-Lip-7 nie wnika do wnętrza komórek grzybowych. Związek K-Lip-8 wnika do komórek grzybowych szczepu *C. albicans*, ale gromadzi się głównie w obrębie błony komórkowej. Zaobserwowane rezultaty mogą częściowo tłumaczyć wyniki oznaczenia aktywności badanych związków, ponieważ związek K-Lip-8 można uznać za analog strukturalny związków K-Lip-3 i K-Lip-6, które wykazują aktywność wobec *C. albicans*, a są nieaktywne wobec *C. glabrata* i *C. krusei*. Ponadto K-Lip-8 oraz inne związki zawierające podobne ugrupowania lipidowe mogą samoorganizować się w większe agregaty i inne struktury, co może tłumaczyć ich agregację w błonie komórkowej.

W poprzednim rozdziale stwierdzono, że aktywność obu koniugatów nie jest związana z obecnością w ich strukturze związków aktywnych. Na podstawie obecnych wyników, można przypuszczać, że działanie koniugatów mających w swojej strukturze łańcuchy lipidowe może mieć charakter błonowy. Warto zauważyć, że związki K-Lip-3 i K-Lip-6 mają najdłuższe łańcuchy węglowodorowe spośród badanych związków. W literaturze można znaleźć przypadki, kiedy właśnie takie struktury wykazywały właściwości przeciwdrobnoustrojowe [76-81], więc można przypuszczać, że właśnie ten element struktury koniugatów lipidowych może wpływać na ich aktywność przeciwgrzybową. Dodatkowo należy zauważyć, że żaden ze związków nie wnika do wnętrza komórek *C. glabrata* i *C. krusei* i również nie wykazuje wobec nich aktywności przeciwgrzybowej.

3.4.4. Działanie biologiczne koniugatów parasoli molekularnych z makrolidowymi antybiotykami polienowymi

Makrolidowe antybiotyki polienowe są znane ze swojej wysokiej aktywności przeciwgrzybowej, ale również toksyczności wobec komórek ssaczy. Jednym z możliwych sposobów polepszenia selektywnej toksyczności tych związków może być odpowiednia modyfikacja chemiczna cząsteczki antybiotyku. W ramach niniejszej pracy zbadano aktywność biologiczną oraz właściwości fizykochemiczne 12 koniugatów amfoterycyny B (AmB) i nystatyny (Nys) z parasolami molekularnymi. Związkami odniesienia były macierzyste antybiotyki, a badania miały na celu ustalenie jaki wpływ na selektywną toksyczność AmB i Nys ma wprowadzenie podstawników.

Aktywność przeciwgrzybowa *in vitro* koniugatów parasoli molekularnych z amfoterycyną B i nystatyną

W pierwszej fazie badań określono aktywność przeciwgrzybową parasoli molekularnych, AmB, Nys oraz koniugatów parasoli z AmB lub Nys w podłożu RPMI-1640 wobec trzech szczepów grzybowych: *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* SC 5314, *C. glabrata* DSM 11226. Wyznaczono wartości MIC₅₀ i MIC₉₀. Wyniki oznaczenia przedstawiono w tabeli 25 poniżej.

Tab.25. Przesiewowe oznaczenie aktywności parasoli molekularnych, amfoterycyny B, nystatyny oraz ich koniugatów.

Związek	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. albicans</i> SC 5314		<i>C. glabrata</i> DSM 11226	
	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀
K-Nat-1	-	32	-	-	-	-
K-Nat-2	-	16	-	-	-	-
K-Amb-1	7	3,1	8	5,5	7,9	5,3
K-Amb-2	2,2	1,5	4	1,3	3,8	2,7
K-Amb-3	122	26	131	39	167	80
K-Amb-4	1	0,7	0,5	0,3	4,0	2,7
K-Amb-6	0,7	0,3	0,7	0,4	1,9	1,3
K-Nys-1	35	16	64	18	62	30
K-Nys-2	16,2	12	16	10	25	16
K-Nys-3	73	27	73	33	64	46
K-Nys-4	36	25	44	25	92	40
K-Nys-5	32	20	56	38	67	28
K-Nys-6	110	40	189	60	128	98
AmB	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3
Nys	1,2	0,7	1,0	0,3	1,2	0,5

Z danych przedstawionych w tabeli 25 wynika, że same parasole molekularne wykazują pewną aktywność przeciwgrzybową. Aktywność kilku koniugatów była znacząco mniejsza niż aktywność AmB i Nys. Natomiast część koniugatów (K-Amb-6, K-Amb-4, K-Amb-2, K-Amb-1, K-Nys-2) wykazuje aktywność przeciwgrzybową bardziej zbliżoną do aktywności macierzystych antybiotyków. Dla wybranych koniugatów, w tym tych o największej aktywności przeciwgrzybowej,

wyznaczono wartości MIC₅₀ i MIC₈₀ wobec szerszej gamy drożdżaków z rodzaju *Candida*, w tym szczepów klinicznych *C. albicans* i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Oznaczenie przeprowadzono w podłożu RPMI-1640. Wyniki przedstawiono w kolejnych tabelach 26 i 27.

Tab.26. Aktywność przeciwgrzybowa wybranych koniugatów parasoli molekularnych z amfoterycyną B.

	MIC ₅₀ [µg/ml]					MIC ₈₀ [µg/ml]				
	AmB	K-Amb-1	K-Amb-2	K-Amb-4	K-Amb-6	AmB	K-Amb-1	K-Amb-2	K-Amb-4	K-Amb-6
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,3	3,1	1,5	0,7	0,3	0,5	3,8	2	0,8	0,5
<i>C. albicans</i> B3	0,3	2,7	1,8	0,9	0,4	0,5	4,1	1,4	0,8	0,8
<i>C. albicans</i> B4	0,3	6,2	3,5	3,6	1,3	0,5	8,0	2,9	2,3	1,6
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	0,3	2,9	1,7	0,9	0,6	0,5	3,9	1,3	0,8	0,8
<i>C. glabrata</i> DSM 11226	0,3	5,3	2,7	2,7	1,3	0,5	7,1	3,6	3,6	1,7
<i>C. krusei</i> DSM 6128	0,5	3,2	4,1	3,8	1,5	3,3	8,1	3,8	3,0	1,8
<i>C. parapsilosis</i> DSM 5784	0,4	3,3	3,8	1,0	1,7	0,5	4,2	3,2	0,7	2,0
<i>C. albicans</i> SC5314	0,3	5,5	1,3	0,3	0,4	0,4	7,2	1,8	0,5	0,6

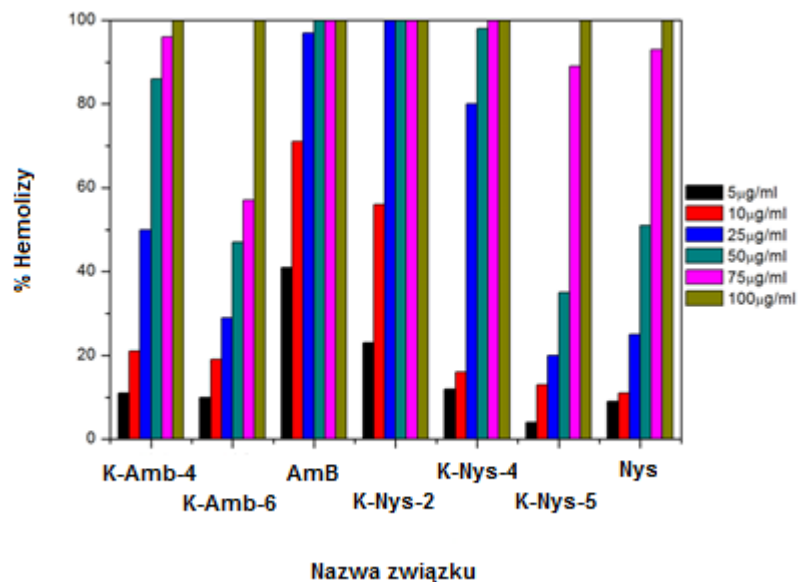
Tab.27. Aktywność przeciwgrzybowa wybranych koniugatów parasoli molekularnych z nystatyną.

	MIC ₅₀ [µg/ml]				MIC ₈₀ [µg/ml]			
	Nys	K-Nys-2	K-Nys-4	K-Nys-5	Nys	K-Nys-2	K-Nys-4	K-Nys-5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,7	12	25	20	1,0	15	32	30
<i>C. albicans</i> B3	0,3	13	50	80	0,5	15	65	60
<i>C. albicans</i> B4	0,8	10	50	33	1,7	15	95	56
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	0,3	3	30	24	0,5	3,8	58	32
<i>C. glabrata</i> DSM 11226	0,5	16	40	28	0,8	22	86	44
<i>C. krusei</i> DSM 6128	1,8	17	176	43	3,5	31	>>256	61
<i>C. parapsilosis</i> DSM 5784	0,8	>>256	32	35	1,9	>>256	53	59
<i>C. albicans</i> SC5314	0,3	10	25	38	0,8	14	38	45

Z powyższych rezultatów wynika, że zarówno koniugaty parasoli molekularnych z amfoterycyną B jak i z nystatyną wykazują aktywność przeciwgrzybową w badanym zakresie stężeń. Co więcej, część z koniugatów wykazuje bardzo zbliżone właściwości przeciwgrzybowe do natywnych antybiotyków, szczególnie K-Amb-6 i K-Amb-4 w porównaniu z AmB. Wszystkie wybrane koniugaty z amfoterycyną B wykazują podobną aktywność przeciwgrzybową względem badanych szczepów. Z drugiej strony, aktywność przeciwgrzybowa koniugatów Nys jest niższa, niż macierzystego antybiotyku.

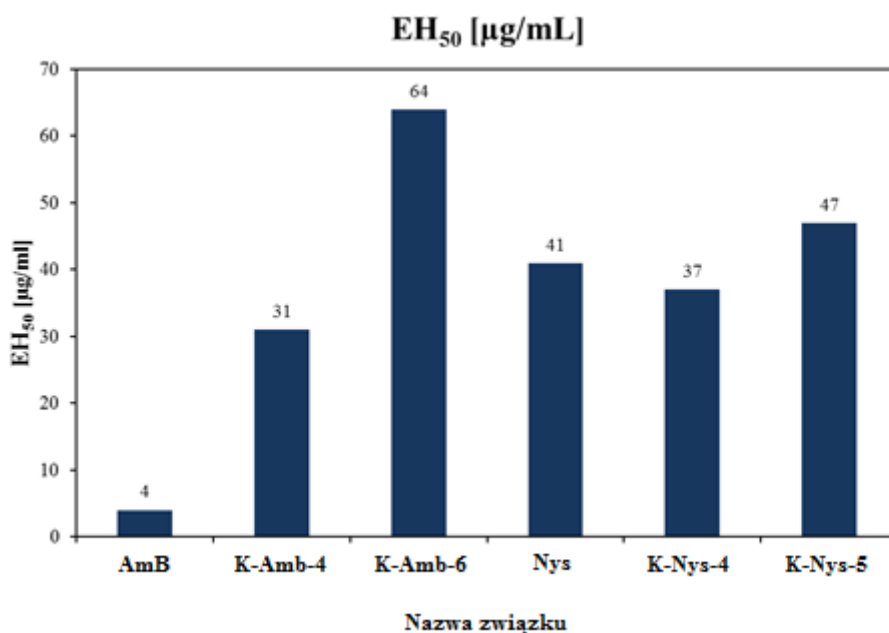
Właściwości hemolityczne wybranych koniugatów

Określono aktywność hemolityczną wybranych koniugatów w porównaniu z taką aktywnością macierzystych antybiotyków. Wyznaczono wartości parametru EH_{50} , czyli stężenia związku, przy którym zachodzi liza 50% erytrocytów. Wyniki przedstawiono poniżej na rysunku 91 oraz 92.



Rys.91. Właściwości hemolityczne AmB, Nys i wybranych koniugatów tych antybiotyków z parasolami molekularnymi.

Na wykresie przedstawionym na rysunku 91 pokazano procent erytrocytów, które uległy hemolizie w zależności od rodzaju związku i jego stężenia. Można zauważyć, że w przypadku koniugatów amfoterycyny B – K-Amb-4 i K-Amb-6 – oba związki wykazują słabsze właściwości hemolityczne niż natywny antybiotyk. W przypadku pochodnych nystatyny, jedynie koniugat K-Nys-5 wykazuje słabsze właściwości hemolityczne, niż macierzysty antybiotyk. Na rysunku 92 przedstawiono wartości EH_{50} wybranych związków.



Rys.92. Wartości EH₅₀ badanych związków wyrażona w [µg/mL].

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że najłagodniejsze właściwości hemolityczne wykazuje związek K-Amb-6. Ma on kilkakrotnie wyższe EH₅₀ niż amfoterycyna B (64 µg/mL, 4 µg/mL odpowiednio). W przypadku nystatyny i jej koniugatów, wszystkie związki mają porównywalne EH₅₀, z czego koniugat K-Nys-5 ma nieznacznie wyższe od reszty związków.

Na podstawie powyższych wyników oraz wyników oznaczenia aktywności przeciwgrzybowej obliczono współczynniki selektywnej toksyczności wybranych związków. Wyniki przedstawiono w tabeli 28.

Tab. 28. Zestawienie zbiorcze: MIC₈₀ (wobec *C. albicans* 5314), EH₅₀ oraz indeksy selektywnej toksyczności SI = EH₅₀/MIC₈₀ badanych koniugatów parasoli molekularnych z makrolidowymi antybiotykami polienowymi).

Związek	AmB	K-Am b-1	K-Am b-2	K-Am b-3	K-Am b-4	K-Am b-5	K-Am b-6	Nys	K-Nys -1	K-Nys -2	K-Nys -3	K-Nys -4	K-Nys -5	K-Nys -6
MIC ₈₀ [µM]	0,3	3,8	2,0	0,9	0,5	0,5	0,4	0,9	9,6	7,4	17,2	19,6	23,5	64,3
EH ₅₀ [µM]	4,3	4,6	6,4	7,9	16,0	22	32,5	44,3	3,5	2,7	12,5	19,1	24,5	ND
SI	13,4	1,2	3,2	8,4	34,8	42,3	73,9	51,5	0,4	0,4	0,7	1,0	1,0	-

Indeks selektywnej toksyczności (SI) określa zdolność substancji czynnej do zabijania drobnoustrojów nie wywołując efektu toksycznego względem komórek pacjenta. Im wyższy współczynnik selektywnej toksyczności, tym związek ma korzystniejsze właściwości terapeutyczne. Z powyższych badań wynika, że wśród koniugatów parasoli molekularnych z amfoterycyną B, trzy z nich charakteryzują się wartościami SI wyższymi niż SI AmB, a najkorzystniejsze właściwości posiada K-Amb-6, który jest koniugatem parasola cholowego z AmB, z łącznikiem w postaci łańcucha między

parasolem a cząsteczką aktywną o długości 6 atomów węgla. Wszystkie koniugaty Nys charakteryzują się znacząco niższymi wartościami SI, niż sama nystatyna.

Określenie cytotoksyczności badanych związków

W dalszej kolejności zbadano cytotoksyczność wybranych związków względem trzech linii komórkowych. Poniżej przedstawiono otrzymane wyniki. Badania przeprowadził dr inż. Marcin Serocki z Katedry Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Badania wykonano przy pomocy klasycznego testu MTT.

Tab.29. Cytotoksyczność wybranych związków wobec trzech linii komórek ssaczych.

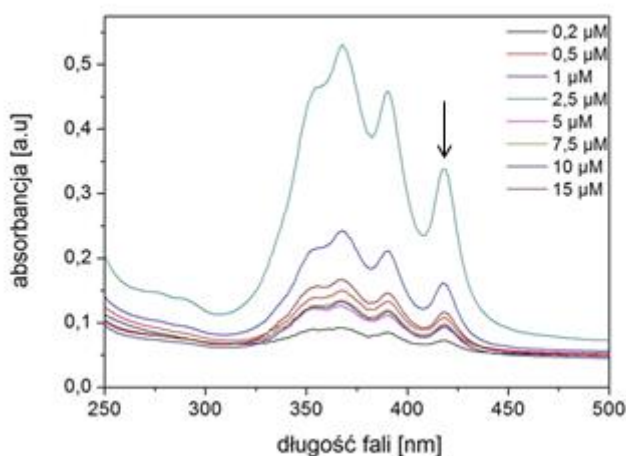
Związek	IC ₅₀ [µg/ml]		
	HEK-293T	LLC-PK1	Hep G2
Am B	0,488 ±0,101	2,688 ±0,950	0,565 ±0,111
K-Amb-2	16,708 ±3,571	8,471 ±1,204	>50
K-Amb-4	5,565 ±0,253	6,454 ±0,992	25,209 ±2,313
K-Amb-6	17,742 ±2,642	15,411 ±1,018	33,071 ±2,907
Nys	6,173 ±0,602	11,652 ±2,332	7,864 ±0,540
K-Nys-2	2,176 ±0,122	2,505 ±0,397	16,102 ±4,089

Analizując powyższe wyniki, można zauważyć, że wszystkie zbadane koniugaty parasoli molekularnych z amfoterycyną B wykazują wyższe wartości IC₅₀ niż natywne amfoterycyna B. Oznacza to, że są mniej cytotoksyczne względem tych linii komórkowych, niż odpowiadający im antybiotyki. Wiąże się to z korzystniejszymi właściwościami zmodyfikowanych leków. Najwyższe IC₅₀ wykazały koniugaty K-Amb-2 i K-Amb-6. Koniugat nystatyny K-Nys-2 okazał się bardziej cytotoksyczny wobec komórek dwóch linii, niż sama nystatyna.

Wyznaczenie krytycznego stężenia agregacji koniugatów parasoli molekularnych z amfoterycyną B

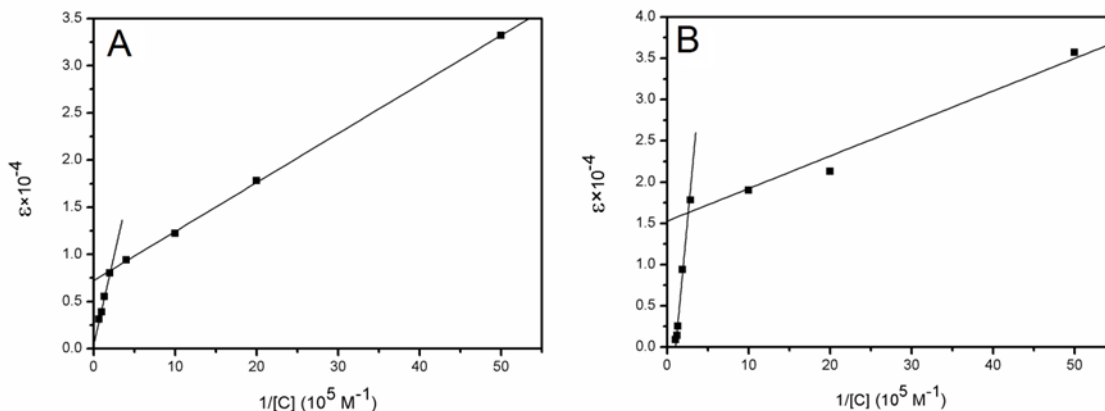
Amfoterycyna B jest związkiem o działaniu błonowym, który ulega agregacji w środowisku wodnym. Sądzi się, że toksyczność amfoterycyny B wobec komórek ssaczych powiązana jest z jej formami zagregowanymi, a forma monomeryczna jest mniej toksyczna. Jej monomer można zidentyfikować dzięki specyficznemu pasmu absorpcji w widmie UV-vis przy długości fali $\lambda=409$ nm, które zanika w przypadku dominacji form zagregowanych. Jeśli w roztworze znajdują się jednocześnie formy monomeryczne i agregaty wtedy zachodzi zależność: $\varepsilon = \varepsilon_p + (\varepsilon_m - \varepsilon_p)m/T$, gdzie T i m to całkowite stężenie antybiotyku i stężenie form monomerycznych, a ε , ε_m i ε_p są odpowiednio: całkowitym, molowym współczynnikiem absorpcji, molowym współczynnikiem absorpcji dla form monomerycznych i odpowiednio dla agregatów. Dzięki pomiarowi molowego współczynnika absorpcji w funkcji odwrotności stężenia badanego związku, można wyznaczyć krytyczne stężenie agregacji (cac). Im stężenie agregacji jest wyższe, tym proces agregacji zachodzi przy wyższych stężeniach i związek jest potencjalnie mniej toksyczny wobec komórek ssaczych, szczególnie erytrocytów.

Pierwszym etapem wyznaczenia cac było otrzymanie widm UV-vis dla każdego z koniugatów oraz natywnej amfoterycyny B. Przykładowe, otrzymane widmo przedstawiono poniżej na rys 93.



Rys. 93. Przykładowe widmo UV-vis koniugatu parasola molekularnego z amfoterycyną B (K-Amb-2). Pasma 409 nm zostało oznaczone strzałką.

Kolejnym etapem było otrzymanie wykresu zależności wartości molowego współczynnika ekstynkcji przy $\lambda = 409$ nm w funkcji odwrotności stężenia danego związku. Przykładowe wykresy przedstawiono na rysunku 94.



Rys.94. Wykres zależności współczynnika ekstynkcji od odwrotności stężenia przy $\lambda = 409 \text{ nm}$ dla koniugatów K-Amb-4 (A) i K-Amb-6 (B).

Z otrzymanych wykresów wyznaczono wartości krytycznego stężenia agregacji (c_{ac}) jako stężenia, przy którym następowало przecięcie dwóch prostych składowych wykresu. Wartości c_{ac} otrzymane tą metodą przedstawiono w tabeli 30.

Tab.30. Wartości krytycznego stężenia agregacji (c_{ac}) AmB i jej wybranych koniugatów.

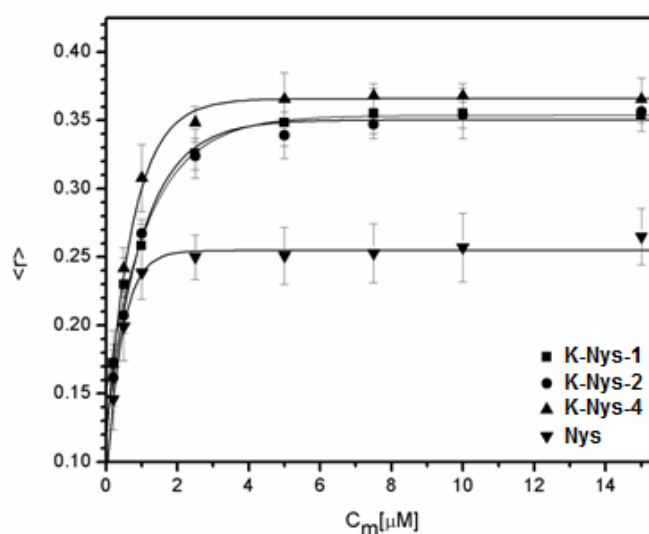
Nazwa związku	c_{ac} [μM]
AmB	1,0
K-Amb-1	1,5
K-Amb-2	0,2
K-Amb-4	3,2
K-Amb-6	3,8

Wyniki wskazują, że wartości c_{ac} AmB oraz jej koniugatów są dość zbliżone i zawierają się pomiędzy 0,2 a 3,8 μM . Wydaje się więc, że wprowadzenie podstawnika w postaci parasola molekularnego nie ma bezpośredniego wpływu na zdolność do tworzenia agregatów.

W niektórych pracach naukowych można znaleźć informacje, że dołączenie do amfoterycyny B parasoli molekularnych lub łańcuchów PEG skutkuje znacznym wzrostem c_{ac} oraz zmniejszeniem właściwości hemolitycznych (wzrost EH_{50}) [109, 110]. W tym przypadku nie obserwuje się takiej zależności, co może znaczyć, że nie wszystkie pochodne AmB wykazują takie same właściwości.

Wyznaczenie krytycznego stężenia agregacji koniugatów parasoli molekularnych z nystatyną

Nystatyna, podobnie jak amfoterycyna B ulega agregacji w środowisku wodnym. W jej przypadku nie można zastosować takiej samej metodologii jak w przypadku amfoterycyny B, ponieważ nystatyna wykazuje inne właściwości spektralne. W przypadku nystatyny można wykorzystać jej właściwości fluorescencyjne, czyli emisję dla $\lambda = 410$ nm przy wzbudzeniu $\lambda = 320$ nm. Obserwując te właściwości, można wyznaczyć krytyczne stężenie agregacji nystatyny i jej koniugatów. Dzięki otrzymanym widmom dla różnych stężeń próbki, można zbadać proces agregacji. W tym badaniu wykonano pomiary fluorescencji i jej anizotropii wybranych koniugatów. Otrzymane wyniki przedstawiono poniżej.



Rys.95. Zależność anizotropii fluorescencyjnej od stężenia związków K-Nys-1, K-Nys-2, K-Nys-4 oraz nystatyny.

Jak można zauważyć, w niskich stężeniach anizotropia związków rośnie wraz ze stężeniem, a następnie przy $2 \mu\text{M}$ osiąga maksimum $0,25 \pm 0,03$ i dalej jest niezależna od stężenia. Zaobserwowane zależności są spójne z informacjami na temat agregacji antybiotyku w środowisku wodnym [111]. Otrzymane wartości c_{ac} wynosiły odpowiednio jak przedstawiono w tabeli 31.

Tab.31. Zbiór otrzymanych krytycznych stężeń agregacji c_{ac} dla nystatyny i jej koniugatów.

Nazwa związku	c_{ac} [μM]
Nystatyna	2
K-Nys-1	5,5
K-Nys-2	4
K-Nys-4	4

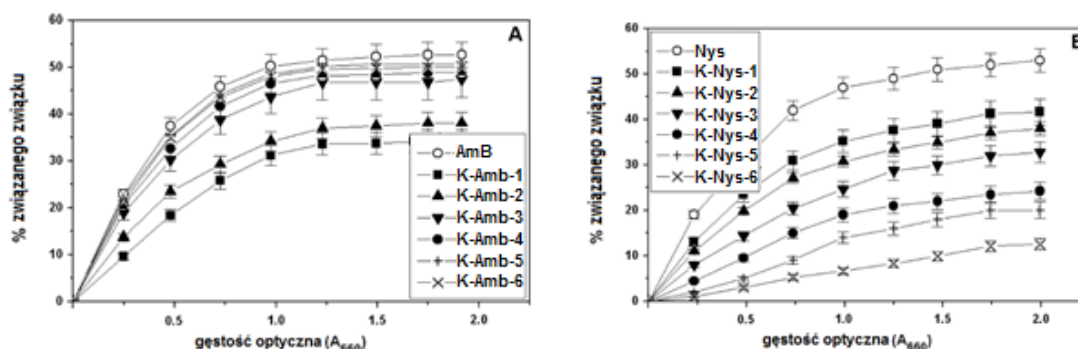
Podobnie jak w przypadku amfoterycyny B, stężenie c_{ac} dla nystatyny oraz jej koniugatów jest podobne i mieści się w przedziale $2 - 5,5 \mu\text{M}$. Nie można jednoznacznie stwierdzić, czy w przypadku

nystatyny i jej pochodnych dołączenie parasoli do antybiotyku ma wpływ na właściwości hemolityczne, ponieważ w przypadku tych związków są one również do siebie bardzo zbliżone. Należy jednak zauważyć, że mimo to koniugaty nystatyny wykazują słabsze właściwości przeciwgrzybowe i silniejsze cytotoksyczne niż natywny antybiotyk.

Powinowactwo związków do ergosterolu

W celu sprawdzenia zależności pomiędzy aktywnością przeciwgrzybową a ilością antybiotyku lub koniugatu połączonego z ergosterolem komórek grzybowych szczepów z rodzaju *C.albicans*, zbadano powinowactwo związków do ergosterolu.

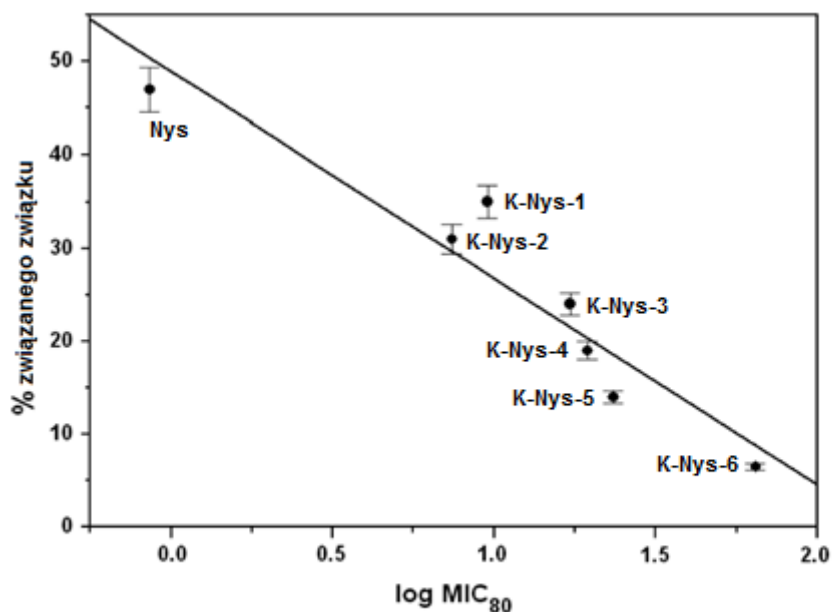
W tym celu zawiesiny komórkowe o różnych gęstościach optycznych inkubowano z wybranymi związkami, których końcowe stężenie w mieszaninie wynosiło 30 μM . Dalej komórki były odwirowywane, a supernatant był badany spektrofotometrycznie tak, aby określić ile związku nie przyłączyło się do komórek.



Rys.96. Zależność pomiędzy ilością związanego związku do komórek *C.albicans* a gęstością optyczną zawiesiny komórkowej. A – wyniki otrzymane dla amfoterycyny B i jej koniugatów, B – wyniki otrzymane dla nystatyny i jej koniugatów.

Wyniki przedstawione na rysunku 96 wskazują, że związki wiążą się z komórkami *C.albicans* i jest to zależne od gęstości optycznej, czyli ilości komórek. Nie zaobserwowano żadnego powinowactwa do komórek *E.coli*, które nie zawierają steroli w swojej błonie (kontrola ujemna), więc można sądzić, że zależność przedstawiona na rysunku 96 jest skutkiem powinowactwa związków do ergosterolu.

Aby stwierdzić, czy zachodzi zależność pomiędzy powinowactwem związku do ergosterolu a aktywnością przeciwgrzybową, przedstawiono na jednym wykresie powinowactwo związków (dla $A_{660}=1,0$) i aktywność przeciwgrzybową w postaci MIC_{80} .



Rys.97. Korelacja pomiędzy powinowactwem związków do ergosterolu a aktywnością nystatyny i jej koniugatów. Wartości przedstawione na wykresie są wartościami średnimi z trzech niezależnych prób.

Na rysunku 97 można zauważyć zależność pomiędzy powinowactwem związków a ich aktywnością, jednak jest to zależność niepewna ($r^2=0,87$). Wykres dla AmB i jego koniugatów nie został pokazany, ponieważ zarówno wartości MIC₈₀, jak i powinowactwo wiązania wszystkich tych związków były bardzo podobne.

Część koniugatów parasoli molekularnych z amfoterycyną B lub nystatyną wykazuje właściwości przeciwrzybowe podobne do macierzystych antybiotyków. Pomimo dołączenia do cząsteczek antybiotyku nośnika w postaci parasola, nie nastąpił wzrost krytycznego stężenia agregacji badanych związków, co oznacza, że nośnik nie wpływa na tworzenie agregatów, które potencjalnie mogą być bardziej toksyczne niż formy monomeryczne. Niemniej jednak należy zauważyć, że koniugaty parasoli molekularnych z amfoterycyną B, szczególnie K-AmB-6, wykazują słabsze właściwości hemolityczne niż natywny antybiotyk, a co za tym idzie lepszą selektywną toksyczność. Z drugiej strony, zastosowanie takich samych rozwiązań w przypadku nystatyny i jej koniugatów nie skutkowało takimi samymi efektami jak w przypadku amfoterycyny B i jej koniugatów. Różnice w wynikach aktywności przeciwrzybowej pomiędzy koniugatami amfoterycyny B a koniugatami nystatyny mogą wynikać z różnego powinowactwa badanych związków do ergosterolu.

4. PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy zbadano szereg koniugatów o działaniu przeciwgrzybowym. Każdy z koniugatów składał się z ugrupowania pełniącego rolę nośnika, związku aktywnego oraz łącznika. Nośnik miał za zadanie poprawić właściwości związane z aktywnością przeciwgrzybową, transportem związku aktywnego przez błonę komórkową lub, w przypadku koniugatów parasoli molekularnych z AmB i NYS - poprawić selektywną toksyczność. W koniugatach będących przedmiotem badań wykorzystano trzy rodzaje nośników: peptyd penetrujący TP10-NH₂, parasole molekularne oraz ugrupowania o charakterze lipidowym. Związek aktywny odpowiadał za działanie przeciwgrzybowe koniugatu. Jako składniki czynne wykorzystano znane chemoterapeutyki przeciwbakteryjne, ciprofloksacynę i lewoksacynę, będące inhibitorami gyrazy, antybiotyki przeciwgrzybowe amfoterycynę B i nystatynę oraz inhibitory enzymatyczne, FMDP i cispentacynę. Łącznik miał za zadanie utrzymać związek aktywny przyłączony do nośnika lub uwolnić go wewnątrz komórki grzybowej. W niektórych koniugatach badanych w tej pracy znajdowały się łączniki rozszczepialne, TML lub wiązanie disiarczkowe. W pozostałych zastosowano połączenia sztywne, najczęściej w postaci wiązań amidowych. W pracy zbadano cztery rodzaje koniugatów: 1) TP10-NH₂ z dołączoną ciprofloksacyną, lewofloksacyną lub FMDP, 2) parasole molekularne połączone z amfoterycyną B lub nystatyną, 3) parasole molekularne z FMDP lub cispentacyną oraz 4) koniugaty lipidowe z FMDP lub cispentacyną. Najistotniejsze wyniki badań dotyczących tych czterech grup koniugatów opisane w niniejszej rozprawie, można podsumować następująco:

1. Ciprofloksacyna i lewoksacyna są znanymi chemoterapeutykami przeciwbakteryjnymi. W wyniku badań, których wyniki przedstawiono w tej rozprawie, wykazano, że nie posiadają one aktywności przeciwgrzybowej *in vitro*, natomiast dołączenie TP10-NH₂ powoduje, że otrzymane w ten sposób koniugaty wykazują taką aktywność. Obecność przyłączonego TP10-NH₂ obniża jednak aktywność przeciwbakteryjną CIP i LVX. Udowodniono, że dołączenie TP10-NH₂ do ciprofloksacyny umożliwia jej transport do wnętrza komórek grzybowych, co nie ma miejsca w przypadku natywnego chemoterapeutyku. Zbadany koniugat K-Pep-1 gromadzi się w cytozolu lub wakuolach komórek grzybowych. Wykazano, że mechanizm działania takiego typu związków polega na inhibicji relaksacji DNA za pośrednictwem topoizomeryzy II zarówno przez peptyd TP10-NH₂, jak i ciprofloksacynę. Jednakże, koniugaty CIP z TP10-NH₂, w przeciwieństwie do samej CIP, wykazują również właściwości hemolityczne i cytotoksyczne. Są one, jak się wydaje, konsekwencją biologicznego działania składnika peptydowego.

FMDP jest inhibitorem syntazy GlcN-6-P. W postaci natywnej, jako związek hydrofilowy, nie jest w stanie pokonać bariery błony komórkowej komórek grzybowych. Dołączenie do niego peptydu penetrującego TP10-NH₂, który pełnił funkcję nośnika, spowodowało, że koniugat FMDP z TP10-NH₂ wykazuje właściwości przeciwgrzybowe. Ze względu, że aktywność przeciwgrzybowa koniugatu jest wyższa niż peptydu TP10-NH₂, można przypuszczać, że

przynajmniej w części wynika ona z działania FM DP przeniesionego do wnętrza komórki dzięki skoniugowaniu z peptydem penetrującym i następnie uwolnionego w wyniku wewnątrzkomórkowej hydrolizy enzymatycznej.

Należy zwrócić uwagę, że w literaturze istnieją przykłady innych nośników peptydowych, które mogą być zastosowane w przypadku ciprofloksacyny lub lewofloksacyny, a które nie wykazują właściwości cytotoksycznych względem komórek ssaczych. Przykładem takiej pracy są badania przedstawione przez Rolkę i współpracowników. Jedne z badań dotyczą koniugatów ciprofloksacyny, lewofloksacyny i flukonazolu z analogami peptydu HNP-2 pochodzącego z laktoferyny [112]. Taki koniugat peptydu z ciprofloksacyną wykazywał właściwości grzybobójcze względem *C.krusei* ($MIC_{50} = 63 \mu\text{g/ml}$), właściwości grzybobójcze względem *C.krusei* oraz klinicznego szczepu *C.tropicalis* oraz właściwości przeciwbakteryjne w badanym zakresie stężeń zarówno względem bakterii G(+) jak i G(-). Ponadto żaden z badanych koniugatów nie wykazał znaczących właściwości cytotoksycznych w badanym zakresie stężeń (1,6 – 200 μM). Innym przykładem podobnego podejścia są chimery peptydowe, które składały się z peptydów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [113]. W tym przypadku, naukowcy stwierdzili, że peptydy wykazują słabe właściwości cytotoksyczne, szczególnie w przypadku linii komórek prawidłowych (badania były wykonywane również na liniach nowotworowych). Ostatnim przykładem nietoksycznych peptydów służących jako nośniki leków są analogi laktoferycyny [114]. W tym przypadku, zespół prof. Rolki otrzymał koniugaty laktoferycyny z ciprofloksacyną, lewofloksacyną lub flukonazolem. Takie związki wykazywały właściwości przeciwrzybowe i przeciwbakteryjne oraz cytotoksyczne, ale jedynie względem nowotworowych linii komórkowych, ale nie w przypadku linii komórek prawidłowych. Na podstawie tych przykładów można stwierdzić, że warto poszukiwać peptydów pełniących rolę nośników leków, ponieważ są przypadki, w których ich dołączenie do związku aktywnego wpływa pozytywnie na aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz zmniejsza właściwości cytotoksyczne związków.

We wcześniejszych badaniach prowadzonych w grupie prof. Seebacha z ETH Zurich, koniugaty enrofloksacyny i ciprofloksacyny ze znanym syntetycznym peptydem penetrującym oktaargininą, charakteryzowały się niższą od wyjściowych fluorochinolonów aktywnością przeciwbakteryjną, natomiast ich aktywność przeciwrzybowa nie jest znana [115].

Podsumowując, można stwierdzić, że TP10-NH₂ jest efektywnym "transporterem molekularnym" do wnętrza komórek grzybowych dla różnych rodzajów cząsteczek aktywnych, jednakże jego własna aktywność przeciwrzybowa i cytotoksyczność wobec komórek ssaczych powoduje, że selektywna toksyczność koniugatów TP10-NH₂ w układzie komórki grzybowe:komórki ssacze nie jest wysoka.

2. Drugą grupą koniugatów badanych w niniejszej pracy były połączenia parasoli molekularnych z FM DP lub cispentacyną. W grupie tych koniugatów znajdowały się związki z rozszczepialnym łącznikiem w postaci wiązania disiarczkowego, ugrupowania TML oraz

koniugaty nierozszczepialne. Zakładano, że parasole molekularne zapewnią transport cząsteczki aktywnej przez błonę komórkową grzybów, a wewnątrz nastąpi uwolnienie tej cząsteczki. Badania jednak wykazały, że jedynie związek K-Umb-11 (rozszczepialny łącznik TML, cispentacyna jako związek aktywny) jest aktywny względem komórek grzybowych w badanych zakresach stężeń. Żaden z koniugatów zawierających rozszczepialne wiązanie disiarczkowe lub nierozszczepialny łącznik nie wykazał aktywności przeciwgrzybowej w badanym zakresie stężeń w bogatym podłożu RPMI symulującym warunki w organizmie ludzkim. Analiza chromatograficzna ujawniła, że koniugaty posiadające w swojej strukturze TML (m.in. K-Umb-13 oraz K-Umb-10 i K-Umb-11) ulegają hydrolizie enzymatycznej w obecności ekstraktu bezkomórkowego. Jednak mimo, że badane koniugaty ulegają hydrolizie enzymatycznej, w kolejnym badaniu okazało się, że dodatek L-izoleucyny nie wpływa na aktywność przeciwgrzybową koniugatu K-Umb-11, zawierającego cis-pentacynę, co by oznaczało, że aktywność tego związku nie wynika z działania uwolnionej cis-pentacyny. Ponadto, obserwacje mikroskopowe wykazały, że związki te nie wnikają do wnętrza komórek grzybowych. Można przypuszczać, że parasol może być przeszkodą we wnikanii związków do komórek grzybowych, szczególnie przez barierę ściany komórkowej, oraz rodzajem zawady przestrzennej w przypadku hydrolizy enzymatycznej związków.

Podsumowując, należy zauważyć, że w literaturze znane są przykłady badań wskazujących na to, że parasole molekularne są w stanie transportować ATP i AMP oraz glutation przez sztuczne błony fosfolipidowe (badania opisane bardziej szczegółowo w rozdziale 2.2.2.) [60-64]. Inne badania Mohameda Mehiri i współpracowników wskazują, że ośmiościenne parasole molekularne są w stanie pokonać błonę komórkową komórek z linii HeLa oraz Ca Ski [66]. Jednak z badań przedstawionych w niniejszej pracy można wnioskować, że parasole molekularne nie są w stanie pokonać bariery ściany lub błony komórkowej komórek grzybowych. Ich ewentualna aktywność może wynikać z wysokiego stężenia związku zastosowanego w eksperymencie.

3. Kolejną grupą związków były koniugaty o charakterze lipidowym z FMDP i cispentacyną. W ich przypadku wykazano, że związki K-Lip-3 oraz K-Lip-6 wykazują aktywność przeciwgrzybową. Oba związki zawierają w swojej strukturze łańcuch lipidowy oraz łącznik w postaci TML. W K-Lip-3 znajduje się FMDP, a K-Lip-6 cispentacyna. Analiza widm masowych oraz chromatogramów koniugatu K-Lip-1, który pełnił rolę reprezentanta tej grupy, wykazała, że tego typu związki ulegają hydrolizie pod wpływem ekstraktu bezkomórkowego. Dalsze badania wykazały, że dodatek N-acetylo-glukozaminy (w przypadku związku z FMDP) oraz L-izoleucyny (w przypadku związku z cispentacyną) nie wpływa na aktywność przeciwgrzybową badanych związków. Oznacza to, że obecność cząsteczki aktywnej może nie mieć wpływu na mechanizm działania koniugatów. Obserwacje mikroskopowe ujawniły, że związek K-Lip-8, który jest analogiem K-Lip-3 i K-Lip-6 znakowanym fluoresceiną, gromadzi się w błonie komórkowej, ale nie wnika do wnętrza komórek grzybowych. Z powyższych badań można wnioskować, że związki uwalniają cząsteczkę aktywną, jeżeli znajdą się w cytozolu, ale nie

są w stanie pokonać błony komórkowej grzybów, ponieważ ulegają w niej samoorganizacji i agregacji.

Podsumowując badania dotyczące koniugatów lipidowych, okazuje się, że dwa związki K-Lip-3 i K-Lip-6 wykazują aktywność przeciwgrzybową, ale nie wynika ona z obecności cząsteczki aktywnej w strukturze koniugatu. Te dwa aktywne związki na tle innych związków z tej grupy wyróżniają się najdłuższym łańcuchem lipidowym (spośród przebadanych związków). Z doniesień literaturowych przedstawionych również w niniejszej pracy (rozdział 2.2.3.) wiadomo, że związki z łańcuchami alifatycznymi wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe [74-81]. W związku z tym można przypuszczać, że działanie K-Lip-3 i K-Lip-6 wynika z obecności w strukturze łańcucha węglowodorowego.

4. Ostatnią grupą związków były koniugaty parasoli molekularnych z dołączoną amfoterycyną B lub nystatyną. Amfoterycyna B i nystatyna należą do grupy makrolidowych antybiotyków polienowych, które znane są ze swojej efektywności, ale również toksyczności. Ich toksyczność wiąże się z ich agregacją w środowisku wodnym. Dołączenie parasola do antybiotyku ma za zadanie zapobiegnięcie agregacji, a tym samym zmniejszeniu toksyczności przy jednoczesnym zachowaniu efektów terapeutycznych. Założenie to oparte było na danych zamieszczonych w publikacji [67], w której wykazano, że koniugat parasola molekularnego z AmB, z łącznikiem o długości $n = 6$ (związek K-Amb-6 w tej pracy) wykazuje znacznie polepszoną wobec AmB selektywną toksyczność. W przeciwieństwie do poprzednich grup związków, w tym przypadku łącznik pomiędzy cząsteczką aktywną a nośnikiem miał charakter sztywny i nie uwalniał cząsteczki aktywnej w określonych warunkach środowiska. Z badań przedstawionych w niniejszej pracy wynika, że koniugaty parasoli molekularnych z amfoterycyną B lub nystatyną wykazują aktywność przeciwgrzybową w badanym zakresie stężeń. Szczególnie dobre właściwości przeciwgrzybowe wykazują koniugaty z amfoterycyną B, w tym koniugat K-Amb-6 (parasol cholowy, łącznik o długości 6 węgli, amfoterycyna B). Ponadto, okazało się, że są one również mniej cytotoksyczne i mają słabsze właściwości hemolityczne niż amfoterycyna B. Jednakże wykazano, że poprawa ich właściwości nie wynika ze zmiany krytycznego stężenia agregacji. Potwierdzono, że badane koniugaty wiążą się z ergosterolem, ale korelacja pomiędzy powinowactwem do ergosterolu a aktywnością przeciwgrzybową zachodzi nieznacznie. Zauważono również istotną różnicę pomiędzy koniugatami amfoterycyny B oraz nystatyny. Koniugaty amfoterycyny B wykazały dużo lepszą selektywną toksyczność niż natywna amfoterycyna B. W przypadku związków z nystatyną, efekt był odwrotny.

Podsumowując, w niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące czterech grup koniugatów o działaniu przeciwgrzybowym. Część z nich wykazała pożądane właściwości terapeutyczne. Koniugaty z peptydami penetrującymi (w tym przypadku z TP10) cechują się aktywnością biologiczną, ale należałoby dobrać w ich przypadku nośnik tak, aby nie wykazywał on cytotoksyczności względem komórek ssaczych. Drugą grupą związków, które również charakteryzują się korzystnymi cechami terapeutycznymi są koniugaty lipidowe. W ich przypadku należałoby zadbać

o to, aby nośniki nie powodowały akumulacji związków w błonie komórkowej. Dalsze rozszerzenie badań na temat opisanych koniugatów może umożliwić otrzymanie związku przeciwwgrzybowego, który będzie jednocześnie skuteczny i nietoksyczny dla zakażonego pacjenta.

WYKAZ LITERATURY

- [1] Number of people (all ages) living with HIV Estimates by WHO region, World Health Organization (ostatnia aktualizacja: 11.07.2018)
- [2] Chmara H., Andruszkiewicz R., Borowski E., *Inactivation of glucosamine-6-phosphate synthetase from Salmonella typhimurium Lt2 by fumaroyl diaminopropanoic acid-derivatives, a novel group of glutamine analogs*, Biochimica et Biophysica Acta, 1986, 870, 357–66
- [3] Bates C.J., Adams W.R., Handschumacher R.E., *Control of the formation of uridine diphospho-N-acetyl-hexosamine and glycoprotein synthesis in rat liver*, The Journal of Biological Chemistry, 1966, 241, 1705–1712
- [4] Milewski S., Chmara H., Borowski E., *Antibiotic tetaine — a selective inhibitor of chitin and mannoprotein biosynthesis in Candida albicans*, Archives of Microbiology, 1986, 145, 234–240
- [5] Andruszkiewicz R., Chmara H., Milewski S., Borowski E., *Synthesis and biological properties of N-3-(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid dipeptides, a novel group of antimicrobial agents*, Journal of Medicinal Chemistry, 1987, 30, 1715–9
- [6] Milewski S., Andruszkiewicz R., Kasprzak L., Mazerski J., Mignini F., Borowski E., *Mechanism of action of anticandidal dipeptides containing inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1991, 35, 36–43
- [7] Konishi M., Nishio M., Saitoh K., Miyaki T., Oki T., Kawaguchi H., *Cispenitacin, a new antifungal antibiotic. I. Production, isolation, physico-chemical properties and structure*, The Journal of antibiotics, 1989, 12, 1749-1755
- [8] Sanders C., Sanders WE., Goering RV, Werner V., *Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, 1 - lactams, and aminoglycosides with special reference to cross-resistance between unrelated drug classes*, Antimicrobial agents and chemotherapy, 1984, 26, 797-801
- [9] Michea-Hamzehpour M., Auckenthaler R., Regamey P., Pachere J.-C., *Resistance occurring after fluoroquinolone therapy of experimental Pseudomonas aeruginosa peritonitis*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1987, 31, 1803-1808
- [10] Piddock, L. J. V., Wijnands W. J. A., Wise R., *Quinolone/ureidopenicillin cross-resistance*, Lancet, 1987, 2, 907
- [11] Robillard R. A., Scarpa A. L., *Genetic and physiological characterization of ciprofloxacin resistance in Pseudomonas aeruginosa PAO*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1988, 32, 535-539

- [12] Hall MM., Finnoff JT., Smith J., *Musculoskeletal Complications of Fluoroquinolones: Guidelines and Precautions for Usage in the Athletic Population*, American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation, 2011, 3, 132-142
- [13] Janout V., Lanier M., Regen S.L., *Design and Synthesis of Molecular Umbrellas*, Journal of the American Chemical Society, 1997, 119, 640–647
- [14] Lindgren M., Hallbrink M., Prochiantz A., Langel U., *Cell-penetrating peptides*, Trends in Pharmacological Sciences, 2000, 21, 99-103
- [15] Skwarecki A.S., Milewski S., Schielmann M., Milewska M. J., *Antimicrobial molecular nanocarrier–drug conjugates*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2016, 12, 2215–2240
- [16] Levine M., N., Raines R. T., *Trimethyl lock: a trigger for molecular release in chemistry, biology, and pharmacology*, Chemical Science, 2012, 8, 2412 – 2420
- [17] Adeyi O., Klahn P., *Trimethyl Lock: A Multifunctional Molecular Tool for Drug Delivery, Cellular Imaging, and Stimuli-Responsive Materials*, ChemBioChem, 2018, 19, 1668 -1694
- [18] Shan D., Nicolaou M.G., Borchardt R.T., Wang B., *Prodrug strategies based on intramolecular cyclization reactions*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1997, 86, 765 - 767
- [19] Amsberry K.L., Gerstenberger A.E., Borchardt R.T., *Amine Prodrugs Which Utilize Hydroxy Amide Lactonization. II. A Potential Esterase-Sensitive Amide Prodrug*, Pharmaceutical Research, 1991, 8, 445 - 461
- [20] Dillon M. P., Cai H., Maag H., *Application of the —trimethyl lock¹ to Ganciclovir, a pro-prodrug with increased oral bioavailability*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1996, 6, 1653 – 1656
- [21] Greenwald R. B., Choe Y. H., Conover C. D., Shum K., Wu D., Royzen M., *Drug delivery systems based on trimethyl lock lactonization: poly(ethylene glycol) prodrugs of amino-containing compounds*, Journal of Medicinal Chemistry, 2000, 10, 475 – 487
- [22] Wang B., Gangwar S., Pauletti G.M., Siahaan T.J., Borchardt R.T., *Synthesis of a Novel Esterase-Sensitive Cyclic Prodrug System for Peptides That Utilizes a —Trimethyl Lock¹-Facilitated Lactonization Reaction*, The Journal of Organic Chemistry, 1997, 62, 1363-1367
- [23] Ji Ch., Miller M.J., *Chemical syntheses and in vitro antibacterial activity of two desferrioxamine B-ciprofloxacin conjugates with potential esterase and phosphatase triggered drug release linkers*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012, 20, 3828-3836
- [24] Ji Ch. Miller P.A., Miller M.J., *Syntheses and Antibacterial Activity of N-Acylated Ciprofloxacin Derivatives Based on the Trimethyl Lock*, ACS Medical Chemistry Letters, 2015, 66, 707-710

- [25] Torchilin V.P., *Nanoparticles as Drug Carriers*, Imperial Collage Press, 2006
- [26] Green M., Loewenstein P.M., *Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus TAT trans-activator protein*, Cell, 1988, 55, 1179–1188
- [27] Frankel A.D., Pabo C.O., *Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus*, Cell, 1988, 55, 1189–1193
- [28] Park J., *Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells*, Journal of General Virology, 2002, 83, 1173–1181
- [29] Joliot A., Pernelle C., Deagostini-Bazin H., Prochiantz A., *Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88, 1864–1868
- [30] Bechara C., Sagan S., *Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?*, FEBS Letters, 2013, 587, 1693–1702
- [31] Copolovici D.M., Langel K., Eriste E., Langel U., *Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications*, ACS Nano, 2014, 8, 1972–1994
- [32] Wender P.A., Mitchell DJ., Pattabiraman K., Pelkey E.T., Steinman L., Rothbard J.B., *The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97, 13003–13008
- [33] De Coupade C., Fittipaldi A., Chagnas V., Michel M., Carlier S., Tasciotti E., Darmon A., Ravel D., Kearsey J., Giacca M., Cailler F., *Novel human-derived cell-penetrating peptides for specific subcellular delivery of therapeutic biomolecules*, Biochemical Journal, 2005, 390, 407–418
- [34] Elmquist A., Hansen M., Langel U., *Structure–activity relationship study of the cell-penetrating peptide pVEC*, Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1758, 721–729
- [35] Johansson H.J., El-Andaloussi S., Holm T., Mäe M., Jänes J., Maimets T., Langel U., *Characterization of a novel cytotoxic cell-penetrating peptide derived from p14ARF protein*, Molecular Therapy, 2008, 16, 115–123
- [36] Oehlke, J., Scheller A., Wiesner B., Krause E., Beyermann M., Klauschenz E., Melzig M., Bienert M., *Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically*, Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1414, 127–139

- [37] Taylor, B.N., Mehta R.R., Yamada T., Lekmine F., Christov K., Chakrabarty A.M., Green A., Bratescu L., Shilkaitis A., Beattie C.W., Das Gupta T.K., *Noncationic peptides obtained from azurin preferentially enter cancer cells*, *Cancer Research*, 2009, 69, 537–546
- [38] Rhee, M., Davis, P., *Mechanism of uptake of C105Y, a novel cell-penetrating peptide.*, *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281, 1233–1240
- [39] Gao, C., *A cell-penetrating peptide from a novel pVII–pIX phage-displayed random peptide library.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, 10, 4057–4065
- [40] Guidotti G., Brambilla L., Rossi D., *Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics*, *Trends in Pharmacological Sciences*, 2017, 38, 406-424
- [41] Herce H.D., Garcia A.E., Cardoso M.C., *Fundamental molecular mechanism for the cellular uptake of guanidinium-rich molecules*, *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136, 17459–17467
- [42] Richard J.P., Melikov K., Vives E., Ramos C., Verbeure B., Gait M.J., Chernomordik L.V., Lebleu B., *Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake*, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278, 585–590
- [43] Hitz T., Iten R., Gardiner J., Namoto K., Walde P., Seebach D., *Interaction of alpha-and beta-oligoarginineacids and amides with anionic lipid vesicles: a mechanistic and thermodynamic study*, *Biochemistry*, 2006, 45, 5817–5829
- [44] Wadia J.S., Stan R.V., Dowdy S.F., *Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis*, *Nature Medicine*, 2004, 10, 310–315
- [45] Lo S.L., Wang S., *An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection*, *Biomaterials*, 2008, 29, 2408 – 2414
- [46] Mäe M., El Andaloussi S., Lundin P., Oskolkov N., Johansson H.J., Guterstam P., Langel U., *A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy*, *Journal of Controlled Release*, 2009, 134, 221–227
- [47] Ferreira S, Carneiro H.C., Lara H.A., Alves R.B., Resende J.M., Oliveira H.M., Silva L.M., Santos D.A., Freitas R.P., *Synthesis of a new peptide-coumarin conjugate: a potent agent against cryptococcosis.*, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 6, 271-275
- [48] Brezden A., Mohamed M.F., Nepal M., Harwood J.S., Kuriakose J., Seleem M.N., Chmielewski J., *Dual Targeting of Intracellular Pathogenic Bacteria with a Cleavable Conjugate of Kanamycin and an Antibacterial Cell-Penetrating Peptide*, *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 34, 10945-10949

- [49] Arnusch C.J., Ulm H., Josten M., Shadkchan Y., Osherov N., Sahl H., Shai Y., *Ultrashort Peptide Bioconjugates Are Exclusively Antifungal Agents and Synergize with Cyclodextrin and Amphotericin B*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56, 1-9
- [50] Zasloff M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*, *Nature*, 2002, 415, 389–395
- [51] Yandek L.E., Pokorny A., Floren A., Knoelke K., Langel U., Almeida P.F.F., *Mechanism of the Cell-Penetrating Peptide Transportan 10 Permeation of Lipid Bilayers*, *Biophysical Journal*, 2007, 92, 2434–2444
- [52] Gong Z., Karlsson A.J., *Translocation of cell-penetrating peptides into Candida fungal pathogens*, *Protein Science*, 2017, 26, 1714-1725
- [53] Nekhotiaeva N., Elmquist A., Rajarao G.K., Hallbrink M., Langel U., Good L., *Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell penetrating peptides*, *The FASEB Journal*, 2004, 18, 394-396
- [54] Parenteau, J., Klinck, R., Good, L., Langel, U., Wellinger, R.J., Elml, S.A., *Free uptake of cell-penetrating peptides by fission yeast*, *FEBS Letters*, 2005, 579, 4873–4878
- [55] Eriksson, O.S., Geörg, M., Sjölander, H., Sillard, R., Lindberg, S., Langel, U., Jonsson, A.B., *Identification of Cell-Penetrating Peptides That Are Bactericidal to Neisseria meningitidis and Prevent Inflammatory Responses upon Infection*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57, 3704 –3712
- [56] J. Xie, Y. Gou, Q. Zhao, S. Li, W. Zhang, J. Song, L. Mou, J. Li, K. Wang, B. Zhang, W. Yang, R. Wang, *Antimicrobial activities and action mechanism studies of transportan 10 and its analogues against multidrug-resistant bacteria*, *Journal of Peptide Science*, 2015, 21, 599-607
- [57] Janout, V., Lanier, M., Regen, S.L., *Molecular Umbrellas*, *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118, 1573-1574
- [58] Janout, V., Lanier, M., Regen, S.L., *Design and Synthesis of Molecular Umbrellas*, *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119, 640-647
- [59] Janout, V., Regen, S.L., *Bioconjugate-Based Molecular Umbrellas*, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 20, 183-192
- [60] Shawaphun, S., Janout, V., Regen, S.L., *Chemical Evidence for Transbilayer Movement of Molecular Umbrellas*, *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121, 5860-5864
- [61] Janout, V., Di Giorgio, C., Regen, S.L., *Molecular Umbrella-Assisted Transport of a Hydrophilic Peptide Across a Phospholipid Membrane*, *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122, 2671-2672

- [62] Janout, V., Staina, I. V., Bandyopadhyay, P., Regen, S.L., *Evidence for an Umbrella Mechanism of Bilayer Transport*, Journal of the American Chemical Society, 2001, 123, 9926-9927
- [63] Janout, V., Jing, B., Regen, S.L., *Molecular Umbrella-Assisted Transport of Thiolated AMP and ATP Across Phospholipid Bilayers*, Bioconjugate Chemistry, 2002, 13, 351-356
- [64] Janout, V., Jing, B., Staina, I. V., Regen, S.L., *Selective Transport of ATP across a Phospholipid Bilayer by a Molecular Umbrella*, Journal of the American Chemical Society, 2003, 125, 4436-4437
- [65] Janout, V., Jing, B., Regen, S.L., *Molecular Umbrella-Assisted Transport of an Oligonucleotide across Cholesterol-Rich Phospholipid Bilayers*, Journal of the American Chemical Society, 2005, 127, 15862 – 15870
- [66] Mehiri M., Jing B., Ringhoff D, Janout V., Cassimeris L., Regen S.L., *Cellular Entry and Nuclear Targeting By a Highly Anionic Molecular Umbrella*, Bioconjugate Chemistry 2008, 19, 1510-1513
- [67] Janout V., Schell W.A., Thévenin D., Yu Y., Perfect J.R., Regen S.L., *Taming Amphotericin B*, Bioconjugate Chemistry, 2015, 26, 2021-2024
- [68] Legrand P., Romero E. A., Cohen B. E., Bolard J., *Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1992, 36, 2518-2522
- [69] Couvreur P., Reddy L. H., Mangenot S., Poupaert J. H., Desmaele D., Lepetre-Mouelhi S., Pili B., Bourgaux C., Amenitsch H., Ollivon M., *Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenoylation of an anticancer nucleoside analogue*, Small, 2008, 4, 247-53
- [70] Irby D., Du Ch., Li F., *Lipid-Drug Conjugate for Enhancing Drug Delivery*, Molecular Pharmaceutics, 2017, 14, 1325-1338
- [71] Remenar J. F., *Making the leap from daily oral dosing to longacting injectables: lessons from the antipsychotics*, Molecular Pharmaceutics, 2014, 11, 1739-49
- [72] Olbrich C., Gessner A., Kayser O., Müller R.H., *Lipid-Drug-Conjugate (LDC) Nanoparticles as Novel Carrier System for the Hydrophilic Antitrypanosomal Drug Diminazenediacetate*, Journal of Drug Targeting, 2002, 5, 387-396
- [73] Olbrich C, Gessner A., Schroder W., Kayser O., Muller R.H., *Lipid-drug conjugate nanoparticles of the hydrophilic drug diminazene - cytotoxicity testing and mouse serum adsorption*, Journal of Controlled Release, 2004, 96, 425 – 435

- [74] Bera S., Zhanel G.G., Schweizer F, Design, *Synthesis, and Antibacterial Activities of Neomycin-Lipid Conjugates: Polycationic Lipids with Potent Gram-Positive Activity*, Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 51, 6160–6164
- [75] Burtenshaw, J. M., *The mechanisms of self-disinfection of the human skin and its appendages*. The Journal of Hygiene (Lond.), 1942, 42, 184–209
- [76] Bibel D. J., Miller S.J., Brown B.E., Pandey B.B., Elias P.M, Shinefield H.R., Aly R., *Antimicrobial activity of lipids from normal and essential fatty acid-deficient mice*, Journal of Investigative Dermatology, 1989, 92, 632–638.
- [77] Bibel, D. J., Aly R., Shinefield H.R., *Antimicrobial activity of sphingosines.*, Journal of Investigative Dermatology, 1992, 98, 269–273
- [78] Bibel, D. J., Aly R., Shah S., Shinefield H.R., *Sphingosines: antimicrobial barriers of the skin.*, Acta Dermato-Venereologica, 1993, 73, 407–411.
- [79] Bibel, D. J., Aly R., Shinefield H.R., *Topical sphingolipids in antiseptis and antifungal therapy*, Clinical and Experimental Dermatology, 1995, 20, 395–400
- [80] Payne C. D., Ray T.L., Downing D.T., *Cholesterol sulfate protects Candida albicans from inhibition by sphingosine in vitro*. Journal of Investigative Dermatology, 1996, 106, 549–552
- [81] Drake D.R., Brogden K.A., Dawson D.V., Wertz P.W., *Antimicrobial lipids at the skin surface*, Journal of Lipid Research, 2008, 49, 4-11
- [82] Schielmann M., *Aktywność przeciwgrzybowa koniugatów inhibitorów enzymatycznych z nośnikami peptydowymi*, rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska, 2016
- [83] Milewski S., *Glucosamine-6-phosphate synthase—the multi-facets enzyme*, Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1597, 173 – 192
- [84] Wojciechowski M., Milewski S., Mazerski J., Borowski E., *Glucosamine-6-phosphate synthase, a novel target for antifungal agents. Molecular modelling studies in drug design*, Acta Biochimica Polonica, 2005, 52, 647–653
- [85] Andruszkiewicz R., Milewski S., Zieniawa T., Borowski E., *Anticandidal properties of N³-(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid oligopeptides.*, Journal of Medicinal Chemistry, 1990, 33, 132-135
- [86] Wakieć R., Gabriel I., Prasad R., Becker J.M., Payne J.W., Milewski S., *Enhanced susceptibility to antifungal oligopeptides in yeast strains overexpressing ABC multidrug efflux pumps*, Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2008, 52, 4057-4065
- [87] Milewski S., Andruszkiewicz R., Borowski E., *Substrate specificity of peptide permeases in Candida albicans*, FEMS Microbiology Letters, 1988, 50, 73-78

- [88] Zgódko D., Milewski S., Borowski E., *A diffusible analogue of N(3)-(4-methoxyfumaryl)-L-2,3-diaminopropanoic acid with antifungal activity*, *Microbiology (UK)*, 2001, 147, 1955-1959
- [89] Pawlak D., Schielmann M., Wojciechowski M., Andruszkiewicz R., *Synthesis and biological activity of novel ester derivatives of N3-(4-metoxifyumaroyl)-(S)-2,3-diaminopropanoic acid containing amide and keto function as inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 15, 3586–3589
- [90] Schielmann M., Szweda P., Gucwa K., Kawczynski M., Milewska M. J., Martynow D., Morschhäuser J., Milewski S., *Transport Deficiency Is the Molecular Basis of Candida albicans Resistance to Antifungal Oligopeptides*, *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8, 1-12
- [91] Oki T., Hirano M., Tomatsu K., Numata K., Kamei H., *Cispentacin, a new antifungal antibiotic II. In vitro and in vivo antifungal activities*, *The Journal of antibiotics*, 1989, 12, 1756-1762
- [92] Fedorowicz J., Sączewski J., *Modifications of quinolones and fluoroquinolones: hybrid compounds and dual-action molecules*, *Monatshefte für Chemie*, 2018, 149, 1199–1245
- [93] Aldred K.J., Kerns R.J., Osheroff N., *Mechanism of quinolone action and resistance*, *Biochemistry*, 2014, 10, 1565-1574
- [94] Veselkov D.A., Laponogov I., Pan X., Selvarajah J., Skamrova G.B., Branstrom A., Narasimhan J., Prasad J.V.N.V., Fisher L.M., Sanderson M. R., *Structure of a quinolone-stabilized cleavage complex of topoisomerase IV from Klebsiella pneumoniae and comparison with a related Streptococcus pneumoniae complex*, *Acta Crystallographica*, 2016, 72, 488 – 496
- [95] Gu X-L, Liu H-B, Jia Q-H, Li J-F, Liu Y-L, *Design and synthesis of novel miconazole-based ciprofloxacin hybrids as potential antimicrobial agents*, 2015, 146, 713–720
- [96] Xiao Z.-P., Wang X.-D., Wang P.-F., Zhou Y., Zhang J.-W., Zhang L., Zhu H.-L, *Design, synthesis, and evaluation of novel fluoroquinolone–flavonoid hybrids as potent antibiotics against drug-resistant microorganisms*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 80, 92–100
- [97] Juárez-Hernández R.E., Miller P.A., Miller M.J., *Syntheses of Siderophore-Drug Conjugates Using a Convergent Thiol-Maleimide System*, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 10, 799-803
- [98] Ji C., Miller M.J., *Siderophore-fluoroquinolone conjugates containing potential reduction-triggered linkers for drug release: synthesis and antibacterial activity*, *Biometals*, 2015, 3, 541-551
- [99] Sugar A.M., Liu X.P., Chen R.J., *Effectiveness of Quinolone Antibiotics in Modulating the Effects of Antifungal Drugs*, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 1997, 11, 2518–2521

- [100] Szebesczyk A., Olshvang E., Shanzer A., Carver P.L., Gumienna-Kontecka E., *Harnessing the power of fungal siderophores for the imaging and treatment of human diseases*, Coordination Chemistry Review, 2016, 327, 84-109
- [101] Shu C., Li T., Yang W., Li D., Ji S., Ding L., *Amphotericin B-conjugated polypeptide hydrogels as a novel innovative strategy for fungal infections*, Royal Society Open Science, 2017, 5, 1-12
- [102] Gurudevan S., Francis A. P., Jayakrishnan A., *Amphotericin B-albumin conjugates: Synthesis, toxicity and anti-fungal activity*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 115, 167–174
- [103] Wu W., Wieckowski S., Pastorin G., Benincasa M., Klumpp C., Briand J., Gennaro R., Prato M., Bianco A., *Targeted Delivery of Amphotericin B to Cells by Using Functionalized Carbon Nanotubes*, Angewandte Chemie International Edition, 2005, 44, 6358 – 6362
- [104] Falk R., Domb A.J., Polacheck I., *A Novel Injectable Water-Soluble Amphotericin B Arabinogalactan Conjugate*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 43, 1975–1981
- [105] Halperin A., Shadkchan Y., Pisarevsky E., Szpilman A. M., Sandovsky H., Osherov N., Benhar I., *Novel Water-Soluble Amphotericin B-PEG Conjugates with Low Toxicity and Potent in Vivo Efficacy*, Journal of Medicinal Chemistry, 2016, 59, 1197–1206
- [106] Skwarecki A.S., Skarbek K., Martynow D., Serocki M., Bylińska I., Milewska M.J., Milewski S., *Molecular Umbrellas Modulate the Selective Toxicity of Polyene Macrolide Antifungals*, Bioconjugate Chemistry, 2018, 29, 1454-1465
- [107] Patel J.B., Cockerill F.R., Bradford P.A., Eliopoulos G.M., Hindler J.A., Jenkins S.G., Lewis II J.S., Limbago B., Miller L.A., Nicolau D.P., Powell M., Swenson J.M., Traczewski M.M., Turnidge J.D., Weinstein M.P., Zimmer B.L., *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, Approved Standard—Ninth Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, January 2012, 32, 2
- [108] Rex J.H., Alexander B.D., Andes D., Arthington-Skaggs B., Brown S.D., Chaturvedi V., Ghannoum M.A., Espinel-Ingroff A., Knapp C.C., Ostrosky-Zeinher L., Pfaller M.A., Sheehan D.J., Walsh T.J., *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, Approved Standard—Third Edition, 2008, 22, 15
- [109] Janout V., Bienvenu C., Schell W., Perfect J.R., Regen S.L., *Molecular umbrella–Amphotericin B conjugates*, Bioconjugate Chemistry, 2014, 25, 1408–1411
- [110] Yamashita K., Janout V., Bernard E.M., Armstrong D., Regen S.L., *Micelle/monomer control over the membrane-disrupting properties of an amphiphilic antibiotic*, Journal of American Chemistry Society, 1995, 117, 6249-6253

- [111] Coutinho A., Prieto M., *Self-association of the polyene antibiotic nystatin in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles: a time-resolved fluorescence study*, Biophysical Journal, 1995, 69, 2541-2557
- [112] Ptaszynska N., Gucwa K., Olkiewicz K., Łęgowska A., Okonska J., Ruczynski J., Gitlin-Domagalska A., Debowski D., Milewski S., Rolka K., *Antibiotic-Based Conjugates Containing Antimicrobial HLOpt2 Peptide: Design, Synthesis, Antimicrobial and Cytotoxic Activities*, ACS Chemical Biology, 2019, 14, 2233-2242
- [113] Ptaszynska N., Gucwa K., Legowska A., Debowski D., Gitlin-Domagalska A., Lica J., Heldt M., Martynow D., Olszewski M., Milewski S., Bun Ng T., Rolka K., *Antimicrobial activities of chimera peptides composed of human neutrophil peptide 1 (HNP-1) truncated analogues and bovine lactoferrampin*, Bioconjugate Chemistry, 2018, 29, 3060-3071
- [114] Ptaszyńska N., Olkiewicz K., Okońska J., Gucwa K., Łęgowska A., Gitlin-Domagalska A., Dębowski D., Lica J., Heldt M., Milewski S., Bun Ng T., Rolka K., *Peptide conjugates of lactoferricin analogues and antimicrobials—Design, chemical synthesis, and evaluation of antimicrobial activity and mammalian cytotoxicity*, Peptides, 2019, 117, 1-13
- [115] Purkayastha N., Capone S., Beck A.K., Seebach D., *Antibacterial activity of enrofloxacin and ciprofloxacin derivatives of β -octaarginine*. Chemistry & Biodiversity, 2015, 12, 179-193.