

Grzybice wewnątrzustrojowe stanowią poważne zagrożenie życia pacjentów, w szczególności w związku z transplantacją organów oraz wobec obniżenia odporności, w tym nabytego braku odporności związanego z pandemią HIV. Antybiotyk polienowy amfoterycyna B (AmB) stanowi złoty standard w leczeniu grzybic systemowych, co klasyfikuje ten farmaceutyk do grupy antybiotyków ratujących życie. Lek ten jest znany i stosowany już nieomalże od 60 lat, pomimo wyjątkowo silnych efektów ubocznych, włącznie z nierzadkimi przypadkami śmierci pacjentów. Pomimo prowadzonych intensywnie prac badawczych, szczegółowe mechanizmy molekularne odpowiedzialne za pożądane efekty farmakologiczne AmB oraz toksyczne efekty uboczne antybiotyku, nie są w pełni poznane. W ramach niniejszego projektu badawczego zaplanowane zostały zadania, których realizacja i uzyskane wyniki przyczynią się do poznania mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za spontaniczną organizację cząsteczek AmB w środowiskach o znaczeniu biologicznym, w tym w wodzie, w błonach lipidowych oraz w kompleksach z białkami. Taki kierunek badań wiąże się bezpośrednio z faktem, iż to właśnie specyficzna organizacja cząsteczek antybiotyku uznawana jest powszechnie jako wyznacznik jego aktywności farmakologicznej oraz toksyczności dla pacjentów. Wyniki badań wstępnych wskazują na samoorganizację molekuł AmB do form dimerycznych (czyli par cząsteczek), które następnie mogą asocjować do tetramerów (czyli związanych dwóch par molekuł). Proces ten jest o tyle istotny, iż w świetle teoretycznej analizy strukturalnej, tetramery AmB są autonomicznymi strukturami mogącymi wbudowywać się do błon biologicznych, na zasadzie perforujących membrany kanałów jonowych. Struktury te mogą więc zaburzać fizjologiczny, transmembranowy transport jonów, prowadząc do śmierci komórki. W naszej opinii, mechanizm ten stanowi zasadniczy element odpowiedzialny za toksyczne efekty uboczne antybiotyku. Zaplanowane badania prowadzili będziemy technikami obrazowania mikroskopowego, sprzężonymi z metodami spektroskopii molekularnej. Przykładem takiej techniki jest FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy), czyli technika mikroskopowa pozwalająca na obrazowanie obiektów biologicznych w oparciu o zjawisko fluorescencji, ze szczególnym wykorzystaniem jej unikalnej charakterystyki fizycznej, jaką są czasy życia fluorescencji. Fluorescencja jest procesem, który zanika w charakterystycznych czasach rzędu wielkości nanosekund (miliardowych części sekundy) i w związku z wyposażeniem naszego laboratorium w lasery pikosekundowe (tysięczna część nanosekundy) oraz w laser femtosekundowy (tysięczna część pikosekundy), posiadamy pełne możliwości techniczne do badań antybiotyku AmB, opierających się na tym właśnie zjawisku. Badania te realizowane będą również w odniesieniu do pojedynczych molekuł białka, skompleksowanych z AmB. Nasze badania wstępne pokazują, iż kompleksy takie dostarczać mogą do błon komórkowych antybiotyk w formie pojedynczych, niezasocjowanych, molekuł. Cząsteczki takie mogą następnie oddziaływać ze sterolami błonowymi, w szczególności z ergosterolem, składnikiem błon komórkowych grzybów. Jest to powszechnie uznawany, zasadniczy mechanizm molekularny, na którym opiera się aktywność farmakologiczna AmB. Ważne jest, iż forma dostarczania antybiotyku zapobiega tworzeniu tetramerów, wyeliminowane powinny zostać w takim układzie toksyczne efekty uboczne. Sprawdzenie poprawności tego rozumowania, w oparciu o szczegółowe badania eksperymentalne oraz teoretyczne, prowadzone na poziomie molekularnym, stanowi jedno z głównych wyzwań poznawczych niniejszego projektu. Wyniki zaplanowanych badań wpłyną na kierunki aktywności zespołów naukowych, zmierzających do opracowania formuły farmakologicznej antybiotyku amfoterycyny B, posiadającej wysoką skuteczność terapeutyczną przy zminimalizowanych toksycznych efektach ubocznych dla pacjentów.