

Ewa Rząd

Oddziaływania fotosensybilizatorów makrocząsteczkowych z modelowymi dwuwarstwami lipidowymi, polimerowymi i błonami komórkowymi wybranych szczepów bakterii

Rozpowszechnienie się wieloopornych lub wręcz panrezystentnych szczepów bakteryjnych jest jednym z największych zagrożeń zdrowia publicznego. Obecne czasy określane są końcem ery antybiotykowej, zaś walka z bakteriami jest jednym z ważniejszych klinicznych wyzwań przed którymi stoi świat nauki. Patogeny z tak zwanej grupy "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterobacter spp.*) stanowią szczególne zagrożenie ze względu na ich oporność na większość antybiotyków. Istnieje zatem konieczność poszukiwania nowych, skutecznych i bezpiecznych metod walki z infekcjami bakteryjnymi, które pozwoliłyby uniknąć rozwoju oporności bakterii lub innych mikroorganizmów. Jednym z obiecujących podejść wydaje się być antybakteryjna terapia fotodynamiczna (aPDT). Metoda ta wykorzystuje lek (zwany uczulaczem lub fotosensybilizatorem (PS)), tlen obecny w komórkach oraz światło. aPDT jest obiecującą metodą walki z infekcjami bakteryjnymi, jednakże możliwość jej stosowania zależna jest od dostępności odpowiednich fotosensybilizatorów. Fotosensybilizatory stosowane obecnie w tradycyjnej terapii fotodynamicznej (PDT) nie są odpowiednie do eliminacji zakażeń bakteryjnych, szczególnie w infekcjach wywołanych bakteriami Gram (-), co spowodowane jest to specyficzną budową tych patogenów. W odróżnieniu od bakterii Gram (+), posiadają one zewnętrzną błonę, zbudowaną głównie z lipopolisacharydów (LPS), pełniącą funkcję nieprzepuszczalnej bariery (naładowanej ujemnie), która ogranicza oddziaływania pomiędzy komórkami bakteryjnymi, a cząsteczkami fotouczulacza. W związku z tym konieczne jest użycie PS zdolnych do pokonywania tej bariery.

Głównym celem mojej pracy doktorskiej było zaprojektowanie, zsyntetyzowanie, określenie właściwości fizykochemicznych nowych, kationowych makrocząsteczkowych fotosensybilizatorów zawierających kowalencyjnie związaną fotoaktywną molekułę porfiryny oraz ocenę ich efektywności i mechanizmu działania jako fotouczulaczy w przeciwbakteryjnej terapii fotodynamicznej (aPDT).

Pierwszym etapem badań, realizowanych w ramach pracy doktorskiej, była synteza kationowych polimerowych fotosensybilizatorów w wyniku kowalencyjnego przyłączenia cząsteczki protoporfiryny IX (Pp IX) do łańcucha polikationu (rozgałęziona polietylenoimina,

bPEI, o różnych średnich masach cząsteczkowych). Otrzymano, z dobrą wydajnością, dwie nowe pochodne polikationu, rozpuszczalne w wodzie-Pp-PEI₁₀ oraz Pp-PEI₆₀. Omawiane związki wykazują właściwości spektralne charakterystyczne dla porfiryn - wykazują charakterystyczne dla porfiryn widmo absorpcyjne – absorbują promieniowanie w zakresie "okna terapeutycznego".

Kolejnym etapem moich badań była analiza oddziaływań zsyntezowanych związków z liposomami stanowiącymi układy modelowe dla błon komórkowych/bakteryjnych. Liposomy to struktury zbudowane z fosfolipidów. Ze względu na ich budowę i właściwości znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, między innymi w nanomedycynie jako nośniki substancji terapeutycznych oraz uproszczone modele błon biologicznych. W celu lepszego zrozumienia oddziaływań fotosensybilizator-liposomy określono kinetykę wnikania, wyznaczono wartości stałych przyłączania chromoforu do liposomów oraz śledzono procesy wygaszania fluorescencji porfiryny w roztworze wodnym oraz zamkniętego w liposomach fotosensybilizatora z wykorzystaniem hydrofilowego wygaszacza Cu²⁺ przy pomocy metod absorpcyjnych oraz fluorescencyjnych. Wnikanie Pp IX do błony lipidowej zobrazowano z wykorzystaniem laserowej skaningowej mikroskopii konfokalnej. Wykazano, że porfiryne przyłączona kowalencyjnie do PEI wnika do dwuwarstwy lipidowej .

W skład bakteryjnej błony biologicznej bakterii wchodzi głównie: 1-palmitoilo-2-oleilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) oraz 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) (DPPG). Wykorzystując technikę wagi Langmuira zbadano naturę oddziaływań monowarstwy lipidowej z fotosensybilizatorem kationowym (porfiryne-polietylenoimina). Otrzymano także pęcherzyki liposomalne z mieszaniny POPE/DPPG i wyznaczono parametry termodynamiczne ich oddziaływań z koniugatami porfirynowymi przy użyciu skaningowej mikrokalorymetrii różnicowej (mikroDSC). Potwierdzono oddziaływania fotouczulaczy z lipidami występującymi w błonie bakteryjnej. Wykazano, że oddziaływania te miały charakter elektrostatyczny.

Przeprowadzono szereg badań biologicznych z wykorzystaniem szczepów bakteryjnych (Gram (-) oraz Gram (+)) mających na celu wyznaczenie efektywności działania w procesie aPDT zsyntezowanych polikationowych fotouczulaczy. Zbadano wychwyty fotouczulaczy przez komórki bakteryjne oraz przez 7-dniowy biofilm bakteryjny. Przeprowadzono modelowy eksperyment aPDT w opisanych układach oraz zbadano wpływ analizowanych związków na komórki fibroblastów mysich. W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań można stwierdzić, że otrzymane nowe fotouczulacze są efektywne w procesie fotodestrukcji bakteryjnych komórek planktonicznych, zarówno Gram-dodatnich

jak i Gram-ujemnych. Pp-PEI₆₀ wykazuje ponadto zdolność do niszczenia biofilmów bakteryjnych. Efektywność makrocząsteczkowych PS porównano z protoporfiryną IX. Otrzymane wyniki potwierdzają zasadność przyłączenia Pp IX do kationowego polimeru ponieważ niskocząsteczkowa Pp IX jest nieskutecznym fotouczulaczem w walce z bakteriami planktonicznymi oraz z biofilmem bakteryjnym utworzonym przez bakterie zarówno szczepów Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich. Badane fotouczulacze nie są toksyczne względem komórek fibroblastów mysich, co stwarza szanse na aplikacyjne zastosowanie otrzymanych fotouczulaczy.

Celem wyjaśnienia mechanizmu działania w aPDT kationowych makrocząsteczkowych fotosensybilizatorów przeprowadzono badania porównawcze stosując jako fotosensybilizatory fotoaktywne koniugaty niejonowe - porfiryne przyłączone kowalencyjnie do łańcucha poli(glikolu etylenowego) (Po-PEG) oraz anionowe (w warunkach fizjologicznego pH), porfiryne przyłączone kowalencyjnie do łańcucha poli(kwasu metakrylowego) (Po-PMA). Analizowane makrocząsteczkowe anionowe i niejonowe fotouczulacze wykazują ograniczoną efektywność w procesie niszczenia komórek planktonicznych bakterii. Nie wykazują one efektu cytotoksycznego w stosunku do badanych linii komórkowych (jedynie Po względem wykazuje toksyczność względem MEF). Prowadzone eksperymenty potwierdziły hipotezę dotyczącą kluczowej roli oddziaływań elektrostatycznych makrocząsteczkowego fotouczulacza z błoną komórek bakteryjnych w procesie aPDT.

W kolejnej części pracy podjęto badania nad nanostrukturalnymi nośnikami fotosensybilizatorów. Celem tych badań było określenie możliwości zwiększenia efektywności dostarczania fotouczulaczy do komórek bakteryjnych i obniżenia ich toksyczności ciemnej. Skupiono się na otrzymywaniu liposomów, pęcherzyków z kopolimerów amfifilowych, tzw. polimerosomów oraz miceli polimerowych. Polimerosomy stanowią bardziej trwałe polimerowe odpowiedniki liposomów. Pęcherzyki polimerowe otrzymywano w procesie odparowywania faz odwróconych (REV). W metodzie tej kopolimer amfifilowy w lotnym rozpuszczalniku organicznym emulguje się z roztworem wodnym. Kolejno odparowuje się rozpuszczalnik organiczny i pozostałość rehydratuje poprzez dodanie kolejnej porcji wody. W rezultacie otrzymuje się monodispersyjne pęcherzyki polimerowe. Zmierzone rozmiary oraz potencjał zeta badanych układów. Wykorzystano krio-TEM oraz mikroskopię sił atomowych do zobrazowania powstałych struktur. Przebadano wpływ pH na wielkości i potencjał zeta miceli polimerowych. Ostatnim etapem pracy było określenie możliwości aplikacyjnych omawianych układów poprzez przeprowadzenie badań

biologicznych. W celu potwierdzenia skuteczności fotouczulaczy makrocząsteczkowych przeprowadzono badania na szczepach bakterii Gram (-) (*E. coli* oraz *P. aeruginosa*) oraz Gram (+) (*S. aureus* oraz *E. faecalis*). Badania prowadzono na komórkach planktonicznych. Określono również cytotoksyczność badanych związków w stosunku do komórek linii mysich zarodkowych fibroblastów oraz ludzkich fibroblastów.

Dla bakterii *E. faecalis* enkapsulowanie fotouczulacza Pp-PEI₁₀ w nanonośnikach znacząco zmniejszyło jego toksyczność w fazie ciemnej. Najbardziej efektywnym nośnikiem były liposomy. Zaobserwowano również znaczący wpływ formulacji polimerosomalnych i micelarnych Pp-PEI₁₀ na redukcję liczebności mikroorganizmów. Dla układów zawierających Pp-PEI₆₀ największy efekt fototoksyczny zarejestrowano dla układu micelarnego. Wszystkie użyte nośniki zmniejszają toksyczność ciemną fotouczulacza. Dla układu z Pp IX najbardziej efektywnym układem jest formuacja liposomalna, zwiększająca znacząco efektywność w eksperymencie aPDT, w porównaniu do samego roztworu Pp IX (redukcja około 5 rzędów wielkości).

Ciekawe obserwacje poczyniono dla bakterii Gram-ujemnych. Fotouczulacz Pp-PEI₁₀ zamknięty w liposomach wykazał się większą toksycznością w porównaniu do jego roztworu wodnego. Takich wyników nie otrzymano dla fotouczulaczy zamkniętych w polimerosomach i micelach polimerowych, dla których liczebność mikroorganizmów była podobna jak dla próbki kontrolnej. Jedynie dla układu polimerosomalnego zauważono efekt fototoksyczny w trakcie eksperymentu aPDT. Dla układów z Pp-PEI₆₀ -liposomy nieznacznie redukują toksyczność ciemną samego fotouczulacza, większy efekt w zmniejszeniu toksyczności jest obserwowany dla miceli i polimerosomów, zaś efekt fototoksyczny jest na tym samym poziomie dla miceli i polimerosomów. Dla układu traktowanego Pp IX, podobnie jak dla *E. faecalis*, najbardziej efektywnym jest układ liposomalny, warto zaznaczyć, iż formuacje micelarne i polimerosomalne są toksyczne dla tych bakterii w fazie ciemnej. Zaskakującym wynikiem jest również redukcja organizmów w trakcie naświetlania układu bakterii Gram-ujemnych traktowanego roztworem Pp IX.

Podobne wyniki uzyskano dla *S. aureus*. Dla Pp-PEI₁₀ formuacja liposomalna jest toksyczna w fazie ciemnej, redukując znacząco liczebność organizmów, podobnie jak układ micelarny. Najbardziej efektywnym nośnikiem w aPDT jest układ polimerosomów z zamkniętym fotouczulaczem. Dla układu Pp-PEI₆₀ formuacja liposomalna nie wpływa znacząco na zmianę toksyczności PS. Polimerosomy i micelle polimerowe również nieznacznie zmniejszają toksyczność PS w fazie ciemnej. Po naświetleniu są mniej efektywne w porównaniu do formuacji liposomalnej i samego roztworu fotouczulacza. Dla układu

Pp IX żaden z badanych fotosensybilizatorów nie jest toksyczny w fazie ciemnej, a efekt fototoksyczności jest nieznaczny we wszystkich tych układach.

Badane fotouczulacze nie są cytotoksyczne, mogą zatem być rozważane jako potencjalnie użyteczne układy w procesach aPDT. Wyniki przeprowadzonych wstępnych badań mających na celu znalezienie efektywnego nośnika makrocząsteczkowych, kationowych fotouczulaczy w kontekście ich wydajnego i bezpiecznego stosowania w aPDT są obiecujące lecz wymagają pogłębienia. W szczególności należy zbadać mechanizmy wychwytu przez komórki bakteryjne fotosensybilizatorów znajdujących się w tych nośnikach. Należałoby także zoptymalizować dobór materiałów, z których te nośniki są otrzymywane.