



UMCS

UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
W Lublinie

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Dziedzina: **Nauki Ścisłe i Przyrodnicze**

Dyscyplina: **Nauki biologiczne**

Sebastian Janik

nr albumu: 274515

**Badania mechanizmów molekularnych
związanych z aktywnością biologiczną
antybiotyku amfoterycyny B**

**(Study of molecular mechanisms associated with the
biological activity of the antibiotic amphotericin B)**

Rozprawa doktorska przygotowywana pod kierunkiem naukowym

dra hab. Wojciecha Grudzińskiego, prof. UMCS (Instytut Fizyki)

Promotor pomocniczy:

dr Sylwia Stączek (Instytut Nauk Biologicznych)

LUBLIN, 2024

Na przestrzeni lat mojej pracy nad tą rozprawą otrzymałem nieocenione wsparcie, za które chciałbym z całego serca podziękować.

Na początku pragnę wyrazić swoją najgłębszą wdzięczność mojej ukochanej żonie Edycie. Twoja cierpliwość, zrozumienie i nieustające wsparcie emocjonalne pozwoliły mi przetrwać najbardziej wymagające chwile. Dziękuję, że zawsze wierzyłaś we mnie, nawet wtedy, gdy sam traciłem wiarę.

Szczególne podziękowania kieruję również do mojej rodziny. Moim rodzicom Barbarze oraz Zbigniewowi, dziękuję za to, że od najmłodszych lat wpajaliście mi wartość edukacji, wspieraliście moje ambicje i zawsze byliście ze mną, niezależnie od okoliczności. Wasza wiara we mnie i Wasze nieustające wsparcie dały mi siłę, by podążać tą ścieżką.

Chciałbym również podziękować moim przyjaciołom, którzy towarzyszyli mi na różnych etapach tej drogi. Wasze słowa otuchy, konstruktywna krytyka oraz wspólne chwile wytchnienia pozwalały mi na chwilę oderwania się od pracy, a jednocześnie dodawały energii do kontynuowania tego przedsięwzięcia. Dziękuję Wam za zrozumienie i za to, że zawsze mogłem na Was liczyć.

Wyjątkowo dziękuję całej ekipie Katedry Biofizyki, która tworzy wspaniałą i niepowtarzalną atmosferę. Dzięki wam praca w labie była przyjemnością.

Bardzo duże podziękowania składam kolegom z Warsztatu Mechanicznego za wiele drobnych i większych projektów, które przyspieszyły i ułatwiły moją pracę nad doktoratem.

Na koniec, chciałbym złożyć szczególne podziękowania moim promotorom: dr hab. Wojciechowi Grudzińskiemu oraz dr Sylwii Stączek. Dziękuję za Państwa cenne wskazówki, nieocenioną pomoc i cierpliwość na każdym etapie pracy nad tą rozprawą. Dziękuję za inspirujące rozmowy, zaangażowanie i czas, który poświęciliście, bym mógł osiągnąć ten ważny krok w mojej karierze naukowej.

Bez Waszej pomocy i wsparcia ta praca nie byłaby możliwa.

Dziękuję Wam z całego serca.

Wykaz prac naukowych stanowiących cykl

- 1 Janik Sebastian, Grela Ewa, Stączek Sylwia, Zdybicka-Barabas Agnieszka, Luchowski Rafał, Gruszecki Wiesław Ignacy, Grudziński Wojciech. Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes. *Molecules*, 2023 Jun; 28(12):4687.
doi: 10.3390/molecules28124687.
Punkty MNiSzW: 140 i Impact Factor: 4.2
- 2 Janik Sebastian, Luchowski Rafał, Grela Ewa, Grudziński Wojciech, Gruszecki Wiesław Ignacy. How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2024 Apr; 15(18):4823-4827.
doi: 10.1021/acs.jpcelett.4c00496.
Punkty MNiSzW: 200 i Impact Factor: 4.8

Prace nie wchodzące do cyklu publikacji

- 1 Ewa Grela, Stączek Sylwia, Nowak Monika, Pawlikowska-Pawłęga Bożena, Zdybicka-Barabas Agnieszka, Janik Sebastian, Cytryńska Małgorzata, Grudziński Wojciech, Gruszecki Wiesław Ignacy, Luchowski Rafał. Enhanced Antifungal Activity of Amphotericin B Bound to Albumin: A “Trojan Horse” Effect of the Protein. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2023 Apr; 127 (16):3632-3640.
doi: 10.1021/acs.jpce.3c01168.
Punkty MNiSzW: 140 i Impact Factor: 2.8

Spis treści

Wykaz prac naukowych stanowiących cykl	1
Wykaz skrótów	4
Streszczenie i słowa kluczowe	6
Summary and keywords	7
1 Wstęp	8
1.1 Motywacja	8
1.2 Zarys prac	10
2 Wprowadzenie	12
2.1 Zakażenia spowodowane <i>Candida albicans</i>	12
2.2 Antybiotyki polienowe	14
2.3 Błony komórkowe	18
2.4 Dwuwarstwy lipidowe	19
2.5 Modelowe błony lipidowe	21
3 Metody eksperymentalne	23
3.1 Mikroskopia konfokalna	23
3.2 Mikroskopia Ramana	25
3.3 Mikroskopia czasów życia fluorescencji	27
3.4 Mikroskopia sił atomowych	30
3.5 Technika Langmuir-Blodgett	32
4 Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes	34
5 How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?	56
6 Dyskusja	78
7 Podsumowanie i Wnioski	81

Spis treści

8	Bibliografia.....	83
9	Źródła internetowe.....	91
10	Naukowe <i>Curriculum vitae</i>	92
11	Oświadczenia współautorów publikacji.....	95

Wykaz skrótów

ABCD -	Koloidalna dyspersja amfoterycyny B (ang. Amphotericin B Colloidal Dispersion)
ABLCL -	Kompleks lipidowy amfoterycyny B (ang. Comparison of Amphotericin B Lipid Complex)
AFM -	Mikroskopia sił atomowych (ang. Atomic Force Microscopy)
AmB -	Amfoterycyna B (ang. Amphotericin B)
AmB-Ag -	Nanocząstki Amfoterycyny B ze srebrem
ATP -	Adenozynotrifosforan (ang. adenosine triphosphate)
CCD -	Matryca światłoczuła (ang. Charge-Coupled Device)
DMPC -	1,2-dimirystoilo-fosfatydylocholina (ang. 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)
DOPC -	1,2-dioleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina (ang. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)
Ergo -	Ergosterol
FISH -	Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (ang. Fluorescence In Situ Hybridization)
FLIM -	Mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (ang. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)
FRET -	Rezonansowy Transfer Energii typu Förstera (ang. Förster Resonance Energy Transfer)
GUV -	Olbrzymie jednowarstwowe liposomy (ang. Giant Unilamellar Vesicles)
HPLC -	Wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. High-Performance Liquid Chromatography)
HS-AFM -	Szybka mikroskopia sił atomowych (ang. High-Speed Atomic Force Microscope)

Wykaz skrótów

LB -	Warstwy Langmuir–Blodgett
LUV -	Duże jednowarstwowe liposomy (ang. Large Unilamellar Vesicles)
SERS -	Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia ramanowska (ang. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy)
SIM-FLIM-	Technika FLIM oparta na mikroskopii z wykorzystaniem światła strukturalizowanego (ang. Structured Illumination Microscopy - Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)
STED -	Mikroskopia Wymuszonego Wygaszania Emisji (ang. Stimulated Emission Depletion)
SUV -	Małe jednowarstwowe liposomy (ang. Small (or Sonicated) Unilamellar Vesicles)
TCSPC -	Metoda skorelowanego czasowo zliczania pojedynczych fotonów (ang. Time-Correlated Single-Photon Counting)

Streszczenie i słowa kluczowe

Praca doktorska koncentruje się na badaniu mechanizmów działania amfoterycyny B (AmB), popularnego antybiotyku przeciwgrzybiczego, ze szczególnym uwzględnieniem jego interakcji z błonami komórkowymi. Głównym celem badań było szczegółowe wyjaśnienie molekularnych podstaw aktywności AmB oraz analiza potencjału przeciwgrzybowego hybrydowych nanocząstek AmB ze srebrem (AmB-Ag). Wykorzystując zaawansowane techniki spektroskopii molekularnej i obrazowania, w tym czasowo rozdzielczą mikroskopię fluorescencyjną (FLIM) oraz spektroskopię ramanowską, poddano analizie interakcje nanocząstek AmB-Ag z komórkami grzyba *Candida albicans*. W badaniach wykazano, że nanocząstki AmB-Ag wykazują wyjątkowo wysoką skuteczność przeciwgrzybiczą przy jednoczesnej niskiej toksyczności dla komórek ludzkich. Kluczowym odkryciem było wykazanie, że AmB wnika do błon lipidowych tylko w obecności ergosterolu, głównego sterolu błon komórkowych grzybów. W błonach zawierających ergosterol, AmB tworzy różne struktury molekularne, w tym wewnątrz błonowe skupiska o średnicy 20-50 nm oraz pory o średnicy około 15 nm. Badania potwierdziły, że AmB nie występuje w błonach jako monomer, lecz przyjmuje bardziej złożone formy organizacji molekularnej, w których podstawową jednostką są dimery. Niniejsza praca dostarcza nowych informacji na temat molekularnego mechanizmu działania amfoterycyny B, wskazując na rolę dezintegracji błony komórkowej jako kluczowego czynnika w jej aktywności przeciwgrzybiczej. Wykorzystanie nanocząstek AmB-Ag okazało się skutecznym sposobem na zwiększenie efektywności dostarczania antybiotyku do komórek grzybów. Wyniki badań mają istotne znaczenie dla zrozumienia złożonych mechanizmów działania AmB i mogą przyczynić się do opracowania skuteczniejszych i bezpieczniejszych formułacji tego leku w przyszłości, co jest szczególnie ważne w kontekście rosnącej oporności grzybów na leki przeciwgrzybicze.

Słowa kluczowe: Amfoterycyna B, Nanocząstki AmB-Ag, Błony lipidowe, Infekcje grzybicze, *Candida albicans*

Summary and keywords

The doctoral thesis focuses on investigating the mechanism of action of amphotericin B (AmB), a popular antifungal antibiotic, with particular emphasis on its interactions with cell membranes. The main goal of the research was to better understand the molecular basis of AmB activity and the potential of AmB-silver hybrid nanoparticles (AmB-Ag) in enhancing antifungal efficacy. Using advanced molecular spectroscopy and imaging techniques, including time-resolved fluorescence microscopy (FLIM) and Raman spectroscopy, I analysed the interactions of AmB-Ag nanoparticles with *Candida albicans* fungal cells at the nanometre level. The studies showed that AmB-Ag nanoparticles exhibit exceptionally high antifungal efficacy while having low toxicity to human cells. A key finding was demonstrating that AmB penetrates lipid membranes only in the presence of ergosterol, the main sterol of fungal cell membranes. In ergosterol-containing membranes, AmB forms various molecular structures, including intramembrane clusters 20-50 nm in diameter and pores about 15 nm in diameter. The studies confirmed that AmB does not exist in membranes as a monomer, but takes on more complex forms of molecular organization in which dimers are the basic unit. The work provides new information on the molecular mechanism of action of amphotericin B, highlighting the role of cell membrane disintegration as a key factor in its antifungal activity. The use of AmB-Ag nanoparticles proved to be an effective way to increase the efficiency of antibiotic delivery to fungal cells. The results have significant implications for understanding the complex mechanisms of AmB action and may contribute to the development of more effective and safer formulations of this drug in the future, which is particularly important in the context of increasing fungal resistance to antifungal drugs.

Key words: Amphotericin B, AmB-Ag nanoparticles, lipid membranes, Fungal infections, *Candida albicans*

1 Wstęp

Infekcje grzybicze stały się w ostatnich dziesięcioleciach coraz częstszym i poważniejszym problemem zdrowotnym. Powszechne stosowanie antybiotyków, a także rosnąca populacja osób z obniżoną odpornością, stworzyły środowisko sprzyjające rozprzestrzenianiu się różnych gatunków grzybów patogennych dla człowieka. Antybiotyki, choć kluczowe w leczeniu infekcji bakteryjnych, mogą zaburzać delikatną równowagę ludzkiego mikrobiomu, umożliwiając rozwój oportunistycznych patogenów grzybowych.

Jednym z głównych czynników zwiększających częstość występowania infekcji grzybiczych jest powszechne stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania^{1,2}. Antybiotyki mogą eliminować pożyteczne bakterie, które w warunkach fizjologicznych utrzymują populacje grzybów pod kontrolą, uniemożliwiając nadmierne namnażanie się grzybów oportunistycznych, m.in. z rodzaju *Candida*. Kandydoza związana z antybiotykami, stanowi coraz większy problem, szczególnie w warunkach szpitalnych u pacjentów z obniżoną odpornością, w tym chorych na nowotwory. Ponadto, podatność na infekcje grzybicze zwiększa stosowanie leków immunosupresyjnych, m.in. u biorców przeszczepów³.

Wpływ chorób grzybiczych na zdrowie człowieka jest znaczący, ale często niedoceniany. Inwazyjne infekcje grzybicze, takie jak aspergiloza, kryptokokoza i zygomikoza, mogą zagrażać życiu, szczególnie u osób z osłabionym układem odpornościowym^{1,3,4}. *C. albicans* odpowiada za 70% przypadków grzybic inwazyjnych, których śmiertelność wynosi ok. 40%⁵.

1.1 Motywacja

Motywacja do badań nad amfoterycyną B wynika z kilku kluczowych czynników. Mimo wieloletniego stosowania w medycynie i wysokiej skuteczności przeciwko infekcjom grzybiczym, dokładne mechanizmy działania biologicznego AmB nie były dotychczas w pełni wyjaśnione i pozostawały przedmiotem dyskusji⁶. Jest to paradoksalne, biorąc pod uwagę, że lek ten jest stosowany od kilkadziesiąt lat i uważany za "złoty standard" w leczeniu inwazyjnych infekcji grzybiczych⁷. Istnieje kilka proponowanych mechanizmów działania AmB, w tym destabilizacja błon, sekwestracja steroli i tworzenie kanałów jonowych. Jednak nie jest jasne, który z tych mechanizmów jest głównie odpowiedzialny za efekty przeciwgrzybicze^{8,9}. Ta niepewność zmotywowała mnie do dalszych badań, aby

wyjaśnić molekularne podstawy działania leku. Zrozumienie precyzyjnych interakcji molekularnych między AmB a błonami lipidowymi jest kluczowe dla opracowania ulepszonych formułacji leku o zmniejszonych toksycznych skutkach ubocznych dla pacjentów¹⁰. W tym celu wykorzystałem hybrydowe nanocząstki AmB-Ag (**publikacja 1**). AmB jest szeroko stosowanym antybiotykiem przeciwgrzybiczym, jednak jego stosowanie wiąże się z poważnymi skutkami ubocznymi. Dążyłem do znalezienia sposobu na zwiększenie skuteczności AmB przy jednoczesnym zmniejszeniu jego toksyczności. Wykorzystanie hybrydowych nanocząstek AmB-Ag miało na celu poprawę właściwości fizykochemicznych i biologicznych antybiotyku poprzez zapobieganie agregacji antybiotyku, co przekładało się na zwiększenie selektywności względem komórek grzybowych i zwierzęcych. Celem moich badań była ocena, czy nanocząstki AmB-Ag mogą skuteczniej pokonywać barierę ściany komórkowej grzybów w porównaniu do nie związanej AmB i dostarczać antybiotyk bezpośrednio do błony komórkowej. Zastosowanie zaawansowanych technik mikroskopowych i spektroskopowych umożliwiło bezpośrednią obserwację interakcji AmB z błonami lipidowymi na poziomie pojedynczych cząsteczek. W badaniach wykorzystałem szereg zaawansowanych technik, w tym mikroskopię obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM), mikroskopię emisji fluorescencji, mikroskopię Ramana, obrazowanie mikroskopowe pęcherzyków lipidowych oraz testy żywotności komórek. Technika FLIM pozwoliła na śledzenie dystrybucji i dynamiki AmB w komórkach w czasie rzeczywistym, co jest kluczowe dla zrozumienia mechanizmu działania antybiotyku^{11,12}. Podobnie, spektroskopia emisji fluorescencji, która umożliwiła analizę stanu agregacji AmB^{13,14}. Mikroskopia Ramana pozwoliła na identyfikację i lokalizację AmB w komórkach bez konieczności jej znakowania^{15,16}. Obrazowanie mikroskopowe pęcherzyków lipidowych umożliwiło bezpośrednią obserwację oddziaływań AmB z modelowymi błonami lipidowymi które są kluczowymi narzędziami w badaniach nad strukturą i funkcją błon biologicznych¹⁶. Pozwalają one na analizę złożonych procesów zachodzących w błonach komórkowych. Testy żywotności komórek *C. albicans* były kluczowe dla oceny skuteczności przeciwgrzybowej AmB i AmB-Ag^{17,18}. Synteza hybrydowych nanocząstek amfoterycyny B ze srebrem jest innowacyjnym podejściem do zwiększenia skuteczności przeciwgrzybiczej AmB. Tutaj i współpracownicy (2015) dokonali kompleksowej charakterystyki fizykochemicznej i biologicznej nanocząstek AmB-Ag¹⁹. Każda z wykorzystanych przeze mnie technik badawczych dostarczyła unikalnych informacji, które umożliwiły zrozumienie mechanizmu działania AmB i ocenę potencjału terapeutycznego nanocząstek AmB-Ag. AmB, mimo swojej skuteczności, jest znana

z poważnych efektów ubocznych, co ogranicza jej stosowanie. Dlatego badania nad mechanizmem jej działania mogą przyczynić się do opracowania bezpieczniejszych terapii. Złożona struktura molekularna AmB prowadzi do różnych interakcji w środowisku błonowym, które przejawiają się różnie w zależności od zastosowanych technik badawczych. Ta złożoność wymaga wieloaspektowego podejścia, aby w pełni wyjaśnić mechanizmy działania leku (**Publikacja 2**). Zaawansowane techniki obrazowania, takie jak mikroskopia sił atomowych i mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji, pozwala na wizualizację różnorodnych interakcji AmB z modelowymi pojedynczymi błonami lipidowymi w wysokiej rozdzielczości w obrębie jednego badanego preparatu. Wyjaśnienie, w jaki sposób AmB wnika do błon i jaki jest późniejszy wpływ na strukturę i funkcję błon, może dostarczyć cennych informacji służących optymalizacji istniejących schematów leczenia grzybic układowych.

1.2 Zarys prac

Amfoterycyna B od ponad 60 lat pozostaje kluczowym antybiotykiem w leczeniu inwazyjnych zakażeń grzybowych²⁰. Jednakże, jej toksyczność, zwłaszcza nefrotoksyczność, stanowi poważne ograniczenie w terapii. Najnowsze badania skupiają się na opracowaniu nowych formułacji i strategii podawania leku^{21,22}, które mogłyby zminimalizować działania niepożądane przy zachowaniu skuteczności przeciwgrzybiczej¹⁰. Ponadto, rosnąca oporność na leki przeciwgrzybicze stanowi globalne zagrożenie dla zdrowia publicznego²³. W tym kontekście, badania nad nowymi zastosowaniami amfoterycyny B, w tym jej potencjałem w leczeniu infekcji wirusowych i pasożytniczych, otwierają fascynujące perspektywy^{24,25}. W poniższych punktach przedstawiłem etapy badań dotyczących mechanizmów działania amfoterycyny B, w oparciu o modelowe błony lipidowe oraz komórki *Candida albicans*.

Artykuł 1. Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes.

Cel pracy:

- Analiza oddziaływania hybrydowych nanocząstek amfoterycyny B ze srebrem (AmB-Ag) z komórkami *Candida albicans*;
- Analiza mechanizmu działania AmB-Ag na błony komórkowe grzybów.

Metody badawcze:

- Technika mikroskopii i spektroskopii molekularnej, w tym obrazowanie czasów życia fluorescencji (FLIM) i spektroskopia ramanowska.

Wyniki i wnioski:

- AmB-Ag skutecznie przenika przez ścianę komórkową i dostarcza cząsteczki antybiotyku do błon komórkowych;
- Dezintegracji błon komórkowych następuje w ciągu kilku minut po ekspozycji na AmB-Ag;
- AmB-Ag wykazuje większą skuteczność grzybobójczą w porównaniu do wolnej AmB w badaniu przeżywalności komórek *C. albicans*. AmB-Ag w stężeniu 0,031 $\mu\text{g/ml}$ wykazuje 2,74-krotnie wyższą aktywność, natomiast w stężeniu 0,062 $\mu\text{g/ml}$ aż 74,3-krotnie wyższą.

Artykuł 2. How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?.

Cel pracy:

- Analiza procesu wnikania AmB do modelowych błon lipidowych zawierających ergosterol.

Techniki badawcze:

- Monowarstwy fosfolipidowe jako modelu błon grzybów;
- Mikroskopia sił atomowych (AFM) i mikroskopia czasów życia fluorescencji (FLIM) wykorzystana do analizy organizacji molekularnej AmB w błonach.

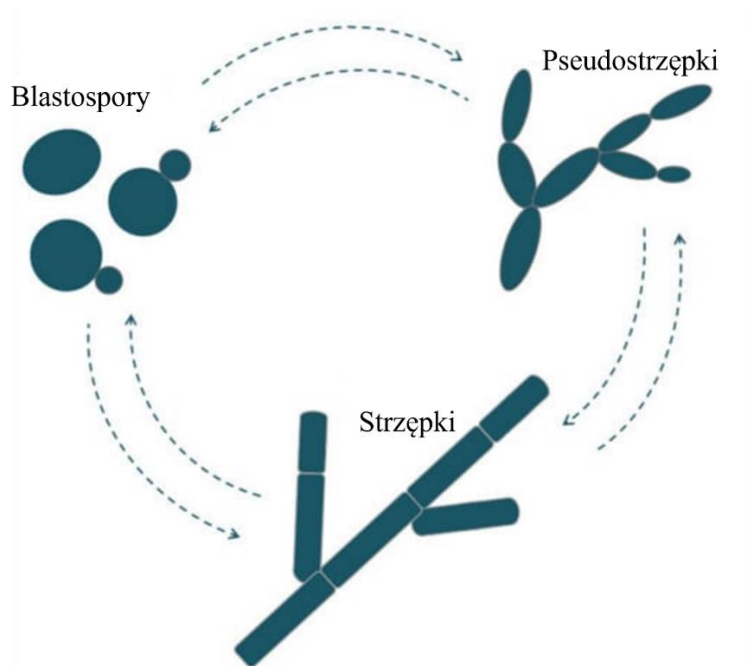
Wyniki i wnioski:

- Formowanie wewnątrzłonowych skupisk AmB o różnych rozmiarach oraz porów błonowych w obrębie pojedynczej próbki;
- Identyfikacja różnych form organizacji molekularnej AmB w błonach (dimery, małe agregaty).

2 Wprowadzenie

2.1 Zakażenia spowodowane *Candida albicans*

Candida albicans jest grzybem komensalnym, który może powodować infekcje oportunistyczne u ludzi. Jest głównym patogenem odpowiedzialnym za różne formy kandydozy, od powierzchownych infekcji błon śluzowych po zagrażające życiu choroby inwazyjne²⁶. Wyróżnić można trzy formy morfologiczne *C. albicans*: komórki drożdżopodobne (blastospory, ang. yeast cells), strzępki i pseudostrzępki [Ryc. 1]⁵.



Ryc. 1 *Candida albicans* formy występowania w postaci strzępek, pseudostrzępek oraz blastospor. Na podstawie ⁵

***C. albicans* posiada wiele czynników wirulencji, które przyczyniają się do jej patogenności^{26,27}:**

- Adhezja: dzięki adhezynom *C. albicans* może przylegać do komórek gospodarza i urządzeń medycznych, ułatwiając ich kolonizację;
- Biofilm: grzyb *C. albicans* może tworzyć biofilmy na tkankach gospodarza i urządzeniach medycznych, co czyni go odpornym na środki przeciwgrzybicze i obronę immunologiczną gospodarza;
- Pleomorfizm: *C. albicans* może tworzyć różne formy morfologiczne: komórki drożdżopodobne, pseudostrzępki i strzępki, przy czym strzępki są bardziej inwazyjne i zdolne do penetracji tkanek;

- Wydzielanie enzymów hydrolitycznych: *C. albicans* wydziela enzymy, takie jak proteazy, fosfolipazy i lipazy, które ułatwiają inwazję i pozyskiwanie składników odżywczych z tkanek gospodarza;

Objawy kliniczne spowodowane zakażeniem *C. albicans*^{5,28}

- Kandydoza jamy ustnej

C. albicans jest głównym czynnikiem wywołującym kandydozę jamy ustnej, która może objawiać się w postaci rzekomobłoniastej (pleśniawki), rumieniowej lub hiperplastycznej. Czynniki ryzyka obejmują stosowanie protez zębowych, kserostomię, antybiotykoterapię i immunosupresję.

- Kandydoza przewodu pokarmowego

Przewód pokarmowy jest głównym rezerwuarem *C. albicans*. Infekcje mogą wystąpić z powodu dysbiozy, dysfunkcji immunologicznej lub zaburzenia bariery śluzówkowej, prowadząc do stanów, takich jak kandydoza przełyku, kandydoza żołądka i inwazyjna kandydoza.

- Kandydemia i inwazyjna kandydoza

C. albicans jest główną przyczyną kandydemii i inwazyjnej kandydozy, która może obejmować różne narządy, takie jak nerki, wątroba, śledziona, mózg i serce. Infekcje te wiążą się z wysoką śmiertelnością, szczególnie u osób z obniżoną odpornością.

- Kandydoza sromu i pochwy

C. albicans jest odpowiedzialny za większość przypadków kandydozy sromu i pochwy, powszechnej infekcji u kobiet w wieku rozrodczym. Czynniki ryzyka obejmują ciążę, cukrzycę i stosowanie antybiotyków.

- Kandydoza skórna

C. albicans może powodować różne infekcje skórne, w tym przewlekłą kandydozę śluzówkowo-skórną czy wyprzenia drożdżakowe, szczególnie u osób z upośledzoną odpornością komórkową oraz towarzyszyć m.in. pieluszkowemu zapaleniu skóry.

Skuteczne leczenie zakażeń *C. albicans* obejmuje wczesną diagnostykę, odpowiednią terapię przeciwgrzybiczą i eliminację podstawowych czynników predysponujących do rozwoju zakażeń. Oporność na środki przeciwgrzybicze i dodatkowo obecność gatunków

Candida innych niż *C. albicans* stanowią kolejne wyzwania w leczeniu tych zakażeń. Lekami przeciwgrzybiczymi stosowanymi w drugim rzucie w przypadku zakażeń spowodowanych *C. albicans* są antybiotyki z grupy polienów²⁹.

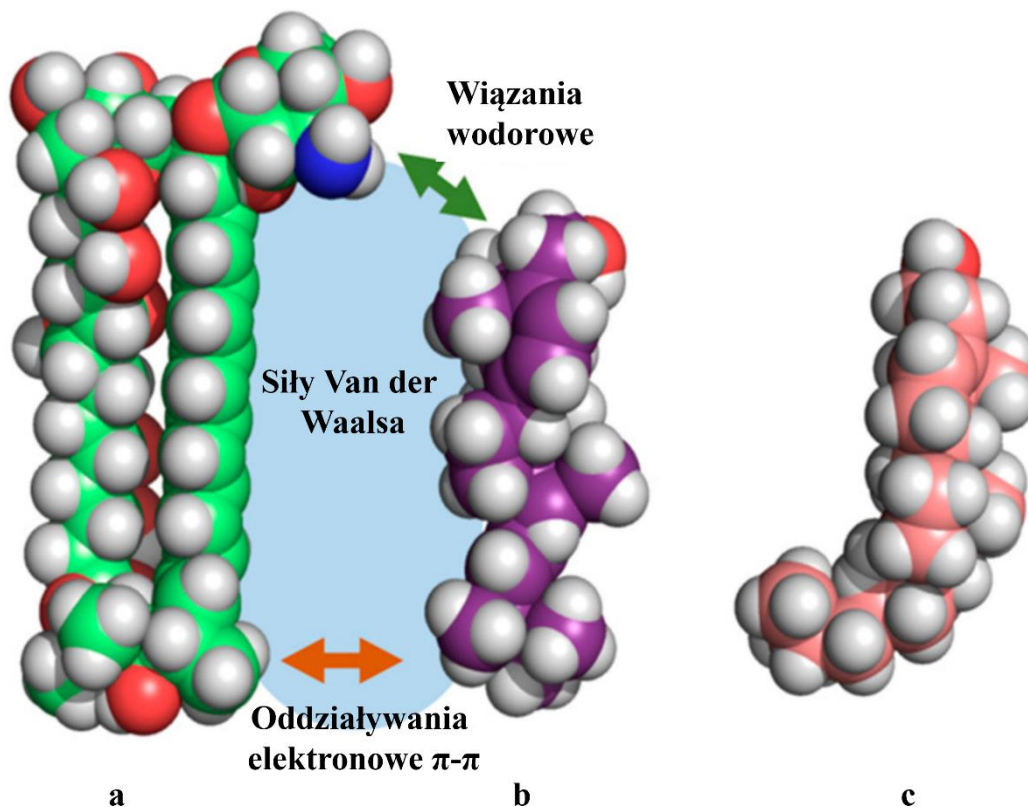
2.2 Antybiotyki polienowe

Antybiotyki polienowe, takie jak amfoterycyna B, to klasa środków przeciwgrzybiczych, które są szeroko stosowane w leczeniu różnych zakażeń grzybiczych.

Działanie

Działanie przeciwgrzybicze antybiotyków polienowych jest warunkowane przez wiązanie się z ergosterolem, głównym składnikiem błony komórkowej grzybów. Wiązanie to prowadzi do powstawania porów transmembranowych, co skutkuje wypływem składników komórkowych i ostatecznie powoduje śmierć komórki^{30,31}. Struktura polienowa, charakteryzująca się szeregiem sprzężonych wiązań podwójnych, ma kluczowe znaczenie dla tego mechanizmu działania. W szczególności hydrofobowy region polienowy, który oddziałuje z dwuwarstwą lipidową zawierającą ergosterol, podczas gdy regiony hydrofilowe znajdujące się wewnątrz tworzonej struktury tworzą pory. Amfoterycyna B jako antybiotyk polienowy może powodować zmiany w przepuszczalności błon, co z kolei powoduje zaburzenia równowagi osmotycznej. W niskich stężeniach antybiotyku, w których tworzenie struktur molekularnych AmB nie jest możliwe, cząsteczki antybiotyku są zorientowane poziomo w stosunku do płaszczyzny błony i sprawiają, że błona jest bardziej zwarta i mniej przepuszczalna dla jonów. Kolejna z hipotez działania amfoterycyny opiera się na destabilizacji biomembran realizowanej poprzez sekwestrację ergosterolu z warstw lipidowych⁹. Specyficzność terapeutycznych polienów względem ergosterolu wynika z faktu, że ergosterol ma odmienną strukturę trójwymiarową w porównaniu do cholesterolu ssaków, która umożliwia lepsze wiązanie do hydrofobowej „kieszeni” polienów, takich jak AmB [Ryc. 2]. W wiązaniu AmB i ergosterolu odgrywają rolę trzy siły: siły Van der Waalsa, które są najsilniejsze, gdy obie cząsteczki są zorientowane współpłaszczyznowo i równoległe; sieć wiązań wodorowych między grupą 3 β -OH sterolu i polarną grupą mykozaminy AmB oraz π - π oddziaływania elektronowe między łańcuchem bocznym ergosterolu i polienowym „ogonem” AmB. Ten ostatni, istotny „punkt przyłączenia” nie występuje, gdy AmB wiąże się z cholesterolem. Co więcej, interakcje Van Der Waalsa są słabsze między cholesterolem a AmB, ze względu na sigmoidalną konformację łańcucha bocznego sterolu³¹.

Specyficzne wiązanie, oraz wyższy stosunek ergosterolu do fosfolipidów w błonach komórkowych grzybów, w porównaniu do stosunku cholesterolu do fosfolipidów w komórkach ssaków, wyjaśnia selektywność większości polienów do komórek grzybów³¹.



Ryc. 2 Trójwymiarowy model amfoterycyny B (a) z cylindrycznym ergosterolem (b) i sigmoidalnym cholesterolem (c). Trzy rodzaje niekowalencyjnych oddziaływań między amfoterycyną B i ergosterolem. Na podstawie³¹

Zastosowanie

Amfoterycyna B jest jednym z najczęściej stosowanych antybiotyków polienowych i jest uważana za złoty standard w leczeniu ciężkich ogólnoustrojowych zakażeń grzybiczych, w tym:

- inwazyjnej kandydozy;
- kryptokokowego zapalenia opon mózgowych;
- inwazyjnej aspergilozy;
- mukormykozy;
- endemicznych grzybic (np. histoplazmozy, blastomykozy, kokcydioidomykozy).

Inne antybiotyki polienowe, takie jak nystatyna i natamycyna, są stosowane głównie w miejscowych zakażeniach grzybiczych skóry, jamy ustnej i oczu³¹.

Przykłady antybiotyków polienowych

- amfoterycyna B;
- nystatyna;
- natamycyna (pimarycyna);
- kandydyna;
- trichomycyna.

Amfoterycyna B jest najczęściej stosowana w ogólnoustrojowych zakażeniach grzybiczych ze względu na jej szerokie spektrum działania i rzadką oporność patogenów^{30,31}.

Pochodzenie

Antybiotyki polienowe są naturalnie wytwarzane przez różne gatunki bakterii z rodzaju *Streptomyces*^{30,31}:

- amfoterycyna B - *Streptomyces nodosus*;
- nystatyna - *Streptomyces noursei*;
- natamycyna - *Streptomyces natalensis*;
- kandydyna - *Streptomyces griseus*;
- trichomycyna - *Streptomyces hachijoensis*.

Antybiotyki te zostały odkryte podczas badania próbek gleby pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej, co doprowadziło do izolacji i oczyszczenia tych związków z płynów pochodzących odpowiednich gatunków *Streptomyces*^{31,32}.

Chociaż antybiotyki polienowe, takie jak amfoterycyna B, są wysoce skuteczne w zwalczaniu patogenów grzybowych, ich stosowanie wiąże się ze znaczną toksycznością, zwłaszcza nefrotoksycznością. Wynika to z ich zdolności do wiązania się z cholesterolem w błonach komórkowych ssaków, co prowadzi do tworzenia porów w błonie, ale również aktywacji mechanizmów prowadzących do sekwestracji steroli oraz zaburzeń przepuszczalności błony komórkowej przez jej uszczelnienie, a w efekcie uszkodzenie komórek. Aby złagodzić te niekorzystne skutki, opracowano preparaty lipidowe, takie jak liposomalna amfoterycyna B (np. AmBisome, Abelcet), oferujące lepsze profile bezpieczeństwa przy jednoczesnym zachowaniu skuteczności przeciwgrzybiczej³³⁻³⁵.

Inne strategie mające na celu zmniejszenie toksyczności obejmują opracowanie kompleksu lipidowego amfoterycyny B (ABLCL) i koloidalnej dyspersji amfoterycyny B

(ABCD). Wykazano, że preparaty te zmniejszają nefrotoksyczność i reakcje związane z infuzją w porównaniu do konwencjonalnego dezoksychołanu amfoterycyny B^{36,37}.

Mechanizmy oporności

Podobnie, jak w przypadku innych leków o działaniu przeciwgrzybowym, *C. albicans* może wykazywać oporność również na antybiotyki polienowe. Mechanizmy opornościowe są związane z^{31,38-40}:

- zmianą w procesie biosyntezy ergosterolu lub składu błon, zmniejszającą powinowactwo do wiązania polienów - mutacja w genach kodujących ergosterol skutkuje zamianą ergosterolu w błonie na inne sterole, np. lanosterol;
- modyfikacją ściany komórkowej, polegającą głównie na zwiększeniu ilości β -1,3-glukanu w ścianie komórkowej, zmniejszającą dostępność polienów do ich celu;
- dezaktywacją lub degradacją cząsteczek polienów poprzez mechanizmy enzymatyczne;
- mechanizm oporności związany z regulacją stresu oksydacyjnego. Grzyby, u których stwierdzono wyższy poziom enzymów antyoksydacyjnych, np. katalazy były bardziej odporne na działanie AmB ze względu na zdolność redukcji stresu oksydacyjnego wywołanego przez AmB, który mógłby doprowadzić do śmierci komórki;
- udziałem białek szoku cieplnego Hsp90.

Oporność na antybiotyki polienowe jest coraz większym problemem, szczególnie w przypadku gatunków *Candida* innych niż *C. albicans* i *Aspergillus fumigatus*, co podkreśla potrzebę rozsądnego stosowania i opracowywania nowych środków przeciwgrzybiczych⁴¹.

Amfoterycyna B oddziałuje w inny sposób z cholesterolem w błonach komórkowych ssaków w porównaniu do jej interakcji z ergosterolem w błonach komórkowych grzybów⁴². Wiązanie AmB z cholesterolem w błonach komórkowych ssaków prowadzi do powstawania porów lub kanałów transbłonowych. Tworzenie porów zakłóca integralność błony i powoduje niekontrolowany wypływ składników komórkowych, przyczyniając się do toksyczności AmB u ludzi^{42,43}. Powinowactwo wiązania AmB do cholesterolu jest niższe niż jego powinowactwo do ergosterolu. Ta różnica wynika z rozbieżności strukturalnych

między cholesterolem a ergosterolem, tj. w cząsteczce ergosterolu występuje dodatkowe wiązanie podwójne i grupa metylowa^{44,45}. Symulacje dynamiki molekularnej wykazały, że cząsteczki AmB mogą łatwiej agregować i tworzyć kanały w obecności ergosterolu niż w obecności cholesterolu⁴⁶. Tworzenie tych kanałów jest ułatwione przez specyficzne interakcje między AmB i ergosterolem^{44,45}. W błonach zawierających cholesterol, AmB ma tendencję do przyjmowania bardziej wydłużonej konformacji, która jest mniej korzystna dla tworzenia kanałów w porównaniu do jej konformacji w błonach zawierających ergosterol^{44,45}. Obecność cholesterolu może modyfikować dynamikę i orientację AmB w błonie, wpływając na jej zdolność do tworzenia stabilnych porów lub kanałów⁴⁷. Niższe powinowactwo AmB do cholesterolu i mniejsza tendencja do tworzenia kanałów w błonach zawierających cholesterol przyczyniają się do niższej toksyczności AmB wobec komórek ssaków, w porównaniu z jej aktywnością przeciwgrzybiczą wobec komórek grzybów zawierających ergosterol^{44,45,47}.

Pomimo, że AmB może oddziaływać z cholesterolem i zaburzać funkcjonowanie błony w komórkach ssaków, jego selektywność wobec błon grzybowych zawierających ergosterol jest kluczowym czynnikiem w jego terapeutycznym zastosowaniu jako środka przeciwgrzybiczego. Zrozumienie molekularnych interakcji AmB z różnymi sterolami ma kluczowe znaczenie dla opracowania strategii poprawy jego selektywności i zmniejszenia toksyczności^{45,47}.

2.3 Błony komórkowe

Błony komórkowe są fundamentem życia komórki, pełniąc kluczowe funkcje ochronne, transportowe, sygnalizacyjne oraz metaboliczne. Są one wysoce zorganizowanymi strukturami, składającymi się głównie z lipidów, białek i węglowodanów, co nadaje im m.in. właściwości półprzepuszczalne. Ta właściwość pozwala komórce na kontrolowaną wymianę substancji z otoczeniem, co jest niezbędne dla utrzymania homeostazy⁴⁸.

Podstawowym składnikiem błon komórkowych są fosfolipidy, takie jak fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloseryna i fosfatydyloinozytol, oraz sterole, takie jak cholesterol, który jest kluczowy dla stabilizacji błony oraz regulacji jej płynności⁴⁹. Cholesterol zwiększa szczelność błony, co utrudnia przenikanie małych cząsteczek i jonów, jednocześnie nadając błonie elastyczność i odporność na zmiany temperatury. Dwuwarstwa ta jest dynamiczna, co umożliwia przemieszczanie się lipidów

i białek w płaszczyźnie błony. To właśnie model mozaiki płynnej, zaproponowany przez Singera i Nicolsona⁵⁰, najlepiej opisuje tę strukturę. Białka błonowe, zarówno integralne, jak i peryferyjne, pełnią różnorodne funkcje, od transportu cząsteczek, przez katalizę reakcji chemicznych, po przekazywanie sygnałów z otoczenia komórki⁴⁹.

Ważnym aspektem funkcjonowania błon komórkowych jest ich płynność, która zależy od składu lipidowego i temperatury. Płynność błony wpływa na funkcje białek błonowych, co jest istotne dla procesów takich jak endocytoza, egzocytoza, czy fuzja błon⁴⁹. Zmiany w składzie lipidowym błon mogą przyczyniać się do rozwoju zmian chorobowych, takich jak miażdżyca, choroba Alzheimera, nowotwory czy choroby zakaźne co podkreśla znaczenie badań nad biochemią błon komórkowych⁴⁹.

Błony komórkowe są również kluczowe dla sygnalizacji międzykomórkowej. Receptory na powierzchni błon komórkowych mogą wiązać się z ligandami, co inicjuje kaskady sygnalizacyjne wewnątrz komórki, prowadzące do odpowiednich reakcji biologicznych. Przykładem takiego mechanizmu jest sygnalizacja za pośrednictwem receptorów sprzężonych z białkami G, które odgrywają istotną rolę w licznych procesach fizjologicznych, w tym w regulacji pracy serca, funkcji immunologicznych oraz percepcji bodźców zmysłowych⁵¹.

Komórki eukariotyczne posiadają różnorodne organella otoczone błonami, takie jak jądro, mitochondria, retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego, co umożliwia oddzielenie różnych procesów metabolicznych w określonych obszarach komórki⁵². Na przykład mitochondria, otoczone dwiema błonami lipidowymi, są miejscem zachodzenia procesów oddychania komórkowego i produkcji ATP, a chloroplasty w komórkach roślinnych przeprowadzają fotosyntezę.

Rola błon komórkowych w komunikacji między komórkami i adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych jest nie do przecenienia. Specjalne domeny błonowe, takie jak tratwy lipidowe, są zaangażowane w segregację i organizację komponentów błonowych, co wpływa na skuteczność przekazywania sygnałów⁵³.

2.4 Dwuwarstwy lipidowe

Dwuwarstwy lipidowe są fundamentalnymi strukturami błon komórkowych, umożliwiającymi komórkom przetrwanie i funkcjonowanie w dynamicznym środowisku. Struktury te są zbudowane głównie z fosfolipidów, które charakteryzują się amfipatyczną

budową – posiadają hydrofilowe "głowy" i hydrofobowe "ogony"⁵⁴. Dzięki tej budowie, fosfolipidy spontanicznie organizują się w środowisku wodnym w dwuwarstwę, z hydrofobowymi ogonami skierowanymi do wnętrza i hydrofilowymi głowami zwróconymi na zewnątrz, tworząc barierę oddzielającą wnętrze komórki od jej otoczenia⁵⁰.

Dwuwarstwy lipidowe cechują się dużą płynnością. Płynność ta pozwala na lateralną dyfuzję lipidów i białek w płaszczyźnie błony, co jest istotne dla funkcji takich jak transport substancji, sygnalizacja komórkowa i fuzja błon⁵⁵. Na płynność błony wpływa skład lipidowy oraz temperatura otoczenia. Na przykład, cholesterol, obecny w błonie, może stabilizować dwuwarstwę lipidową, wpływając na jej płynność⁴⁹. Fosfolipidy, takie jak fosfatydylocholina i fosfatydyloseryna, są najczęściej występującymi lipidami w błonach eukariotycznych, podczas gdy glikolipidy i sfingolipidy pełnią szczególną rolę w sygnalizacji komórkowej i tworzeniu domen lipidowych⁵⁶.

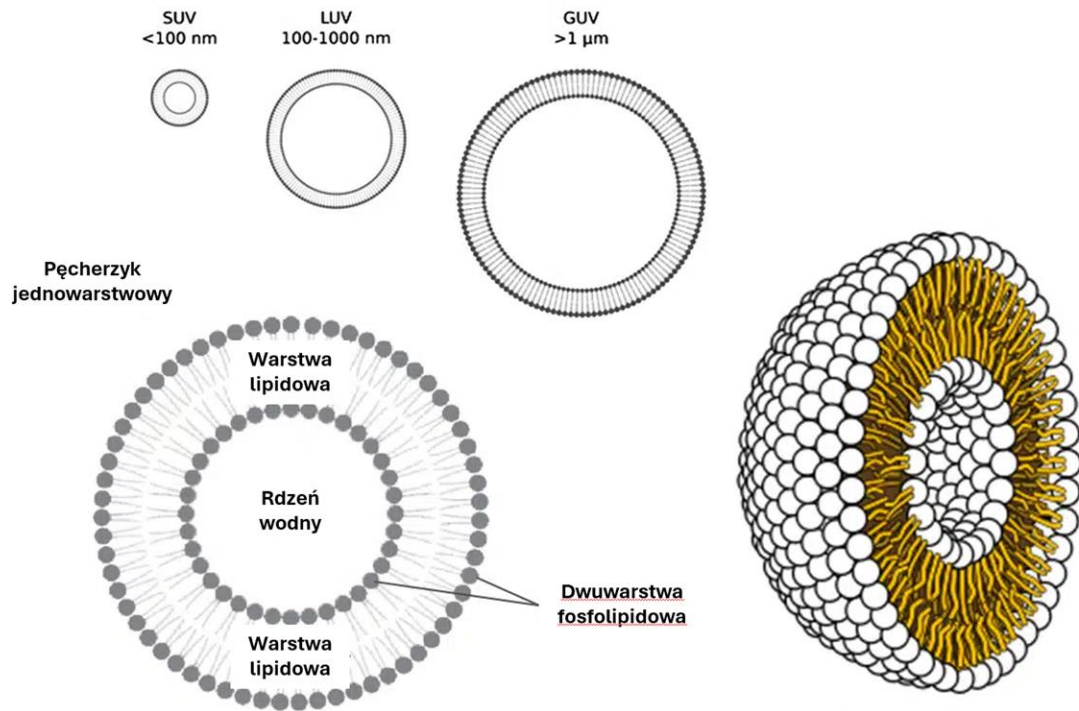
Dwuwarstwy lipidowe integrują białka błonowe, które odgrywają kluczową rolę w transporcie cząsteczek przez błonę, katalizowaniu reakcji biochemicznych oraz przekazywaniu sygnałów. Białka integralne, pełniące role kanałów jonowych i receptorów, wbudowane są w dwuwarstwę lipidową, co umożliwia im interakcję zarówno z wewnętrznym, jak i zewnętrznym środowiskiem komórki⁵⁷. Białka te mogą poruszać się w płaszczyźnie błony, co jest istotne dla ich funkcji w procesach takich jak przekazywanie sygnałów i transport substancji.

Współczesne badania nad dwuwarstwami lipidowymi podkreślają ich dynamiczny i heterogeniczny charakter. Badania z wykorzystaniem technik obrazowania o wysokiej rozdzielczości, takich jak mikroskopia fluorescencyjna, wykazały, że dwuwarstwy lipidowe mogą mieć złożoną architekturę, którą tworzą różne domeny o odmiennych właściwościach fizykochemicznych^{58,59}. Te odkrycia otwierają nowe perspektywy w zrozumieniu funkcji błon komórkowych i ich roli zarówno w prawidłowo funkcjonującym organizmie jak i chorobowo zmienionym.

Przykładem mogą być tratwy lipidowe, które są bogate w sfingolipidy i cholesterol, tworzą mikrodomeny⁵⁶. Zaburzenia w organizacji tych mikrodomen mogą prowadzić do chorób neurodegeneracyjnych i kardiologicznych⁶⁰. Ponadto, dwuwarstwy lipidowe uczestniczą w procesach takich jak endocytoza i egzocytoza, które są kluczowe dla transportu makromolekuł i komunikacji międzykomórkowej⁶¹.

2.5 Modelowe błony lipidowe

Modelowe systemy membranowe są kluczowymi narzędziami w badaniach nad strukturą i funkcją błon biologicznych. Pozwalają one na analizę złożonych procesów zachodzących w błonach komórkowych w uproszczonym i kontrolowanym środowisku. Jednym z podstawowych typów modelowych systemów membranowych są dwuwarstwy lipidowe. Mogą one występować w formie płaskich, osadzonych na podłożu dwuwarstw lub sferycznych pęcherzyków (liposomów). Systemy te umożliwiają badanie interakcji lipid-lipid, płynności błon oraz zachowania fazowego⁶². Pęcherzyki lipidowe (liposomy) są szczególnie przydatne do analizy krzywizny błon, procesów fuzji oraz zachowania białek błonowych. Mogą one występować w różnych rozmiarach, od małych jednowarstwowych pęcherzyków (SUV), przez średniej wielkości (LUV), do olbrzymich jednowarstwowych pęcherzyków (GUV) [Ryc. 3]⁶³. Dużą zaletą modelowych systemów membranowych jest możliwość odtworzenia asymetrii lipidowej charakterystycznej dla naturalnych błon komórkowych. Jak podkreślają Scott i współpracownicy, asymetria ta jest kluczowa dla wielu procesów biologicznych, ale jej odtworzenie w systemach modelowych stanowi wciąż duże wyzwanie⁶⁴. Modelowe systemy membranowe znajdują szerokie zastosowanie w badaniach nad interakcjami lek-błona. Pozwalają one na analizę mechanizmów działania leków przeciwdrobnoustrojowych oraz przewidywanie ich farmakokinetyki⁶². Symulacje komputerowe stanowią cenne uzupełnienie tych badań. Umożliwiają one analizę dynamiki błon na poziomie molekularnym. Pomimo ogromnego postępu w tej dziedzinie, modelowe systemy membranowe wciąż mają pewne ograniczenia. Jednym z głównych wyzwań jest odtworzenie pełnej złożoności naturalnych błon biologicznych, w tym obecności różnorodnych białek błonowych i innych składników^{63,64}. Modelowe systemy membranowe stanowią nieocenione narzędzie w badaniach nad biologią błon komórkowych. Dalszy rozwój tych systemów, w kierunku coraz lepszego odwzorowania złożoności naturalnych błon, pozwoli na jeszcze głębsze zrozumienie procesów komórkowych i może przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych⁶⁵.



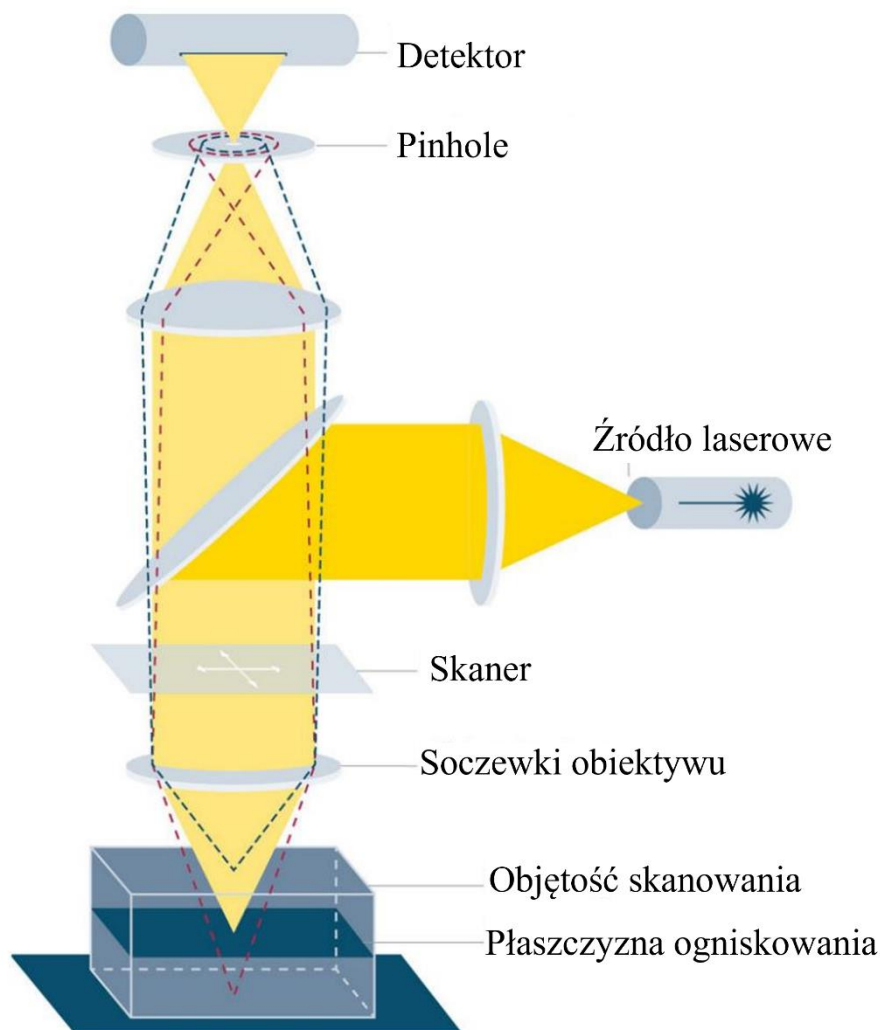
Ryc. 3 Struktura jednowarstwowych liposomów. Na podstawie ^{66,67}

3 Metody eksperymentalne

3.1 Mikroskopia konfokalna

Mikroskopia konfokalna to zaawansowana technika obrazowania, która zrewolucjonizowała badania biologiczne, oferując znaczącą poprawę rozdzielczości i kontrastu w porównaniu do tradycyjnej mikroskopii świetlnej⁶⁸. Zasada działania mikroskopu konfokalnego opiera się na selektywnym oświetleniu i detekcji światła z pojedynczej płaszczyzny ogniskowej próbki. W mikroskopie konfokalnym światło lasera jest skupiane przez obiektyw na małym obszarze próbki. Kluczowym elementem jest zastosowanie przesłony konfokalnej (pinhole) zarówno w ścieżce oświetlenia, jak i detekcji [Ryc. 4]. Przesłona w ścieżce oświetlenia zapewnia, że tylko mały punkt próbki jest oświetlany w danym momencie. Światło emitowane lub odbite od tego punktu jest następnie zbierane przez ten sam obiektyw i kierowane przez drugą przesłonę konfokalną do detektora. Ta druga przesłona odgrywa kluczową rolę, blokując światło pochodzące spoza płaszczyzny ogniskowej, co skutkuje eliminacją sygnału tła i poprawą rozdzielczości osiowej⁶⁹. Obraz całej próbki jest tworzony poprzez skanowanie wiązki laserowej punkt po punkcie w płaszczyźnie XY. Po zeskanowaniu jednej płaszczyzny, płaszczyzna ogniskowa jest przesuwana w osi Z, co umożliwia uzyskanie trójwymiarowych rekonstrukcji badanych obiektów⁷⁰. Najpopularniejszym jest tryb fluorescencyjny, gdzie próbka jest znakowana fluoroforami lub wykorzystywane są naturalne fluorofory występujące w badanym układzie, które po wzbudzeniu emitują światło o określonej długości fali. Innym trybem jest obrazowanie w świetle odbitym, przydatne w badaniach materiałów nieprzezroczystych. Rozdzielczość mikroskopu konfokalnego jest ograniczona dyfrakcyjnie, ale dzięki eliminacji światła spoza płaszczyzny ogniskowej, osiąga się znacznie lepszą rozdzielczość niż w mikroskopii szerokokopułowej, szczególnie w osi Z. Przy użyciu obiektywu o wysokiej aperturze numerycznej teoretyczna rozdzielczość lateralna (XY) mikroskopu konfokalnego wynosi około 0,2 μm , a rozdzielczość osiowa (Z) około 0,5 μm ⁷¹. Zastosowanie mikroskopii konfokalnej w biologii jest niezwykle szerokie. Technika ta umożliwia obrazowanie żywych komórek i tkanek z wysoką rozdzielczością przestrzenną i czasową, co jest kluczowe w badaniach dynamiki procesów komórkowych⁷². Ponadto, pozwala na analizę lokalizacji i interakcji białek w komórkach, dzięki zastosowaniu technik immunofluorescencji i białek fuzyjnych z fluorescencyjnymi znacznikami⁷³. Mikroskopia konfokalna jest również niezastąpiona w badaniu struktury i funkcji organelli komórkowych, takich jak

mitochondria, aparat Golgiego czy jądro komórkowe⁷⁴. W biologii rozwoju, umożliwia obserwację procesów rozwojowych organizmów modelowych, np. embriogenezy *Drosophila melanogaster* czy *Danio rerio*⁷⁵. W badaniach roślin, technika ta znajduje zastosowanie w analizie struktury i funkcji tkanek roślinnych, w tym w badaniach nad transportem międzykomórkowym i reakcjami na stres środowiskowy⁷⁶. Mikroskopia konfokalna jest również wykorzystywana w badaniach nad organizacją przestrzenną genomu w jądrze komórkowym poprzez techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH), a także w monitorowaniu zmian poziomu jonów wewnątrzkomórkowych, takich jak wapń, z wykorzystaniem fluorescencyjnych sond jonowych^{77,78}. Jedną z kluczowych zalet mikroskopii konfokalnej jest możliwość obrazowania próbek biologicznych o dużej grubości bez konieczności ich fizycznego cięcia. Pozwala to na zachowanie integralności strukturalnej badanych obiektów i umożliwia obserwacje *in vivo*⁷⁹. Rozwój technik mikroskopii konfokalnej, takich jak skanowanie wielopunktowe (ang. spinning disk confocal microscopy)⁸⁰ czy mikroskopia konfokalna z super-rozdzielczością (np. STED - Stimulated Emission Depletion)^{81,82}, jeszcze bardziej rozszerza możliwości badawcze w biologii. Mikroskopia konfokalna stała się nieodzownym narzędziem w nowoczesnych badaniach biologicznych, umożliwiając naukowcom głębsze zrozumienie struktury i funkcji komórek oraz tkanek na poziomie submikronowym. Jej ciągły rozwój i integracja z innymi technikami obrazowania otwierają nowe perspektywy w badaniach nad funkcjonowaniem organizmów żywych oraz ich oddziaływaniem ze środowiskiem zewnętrznym⁸³.

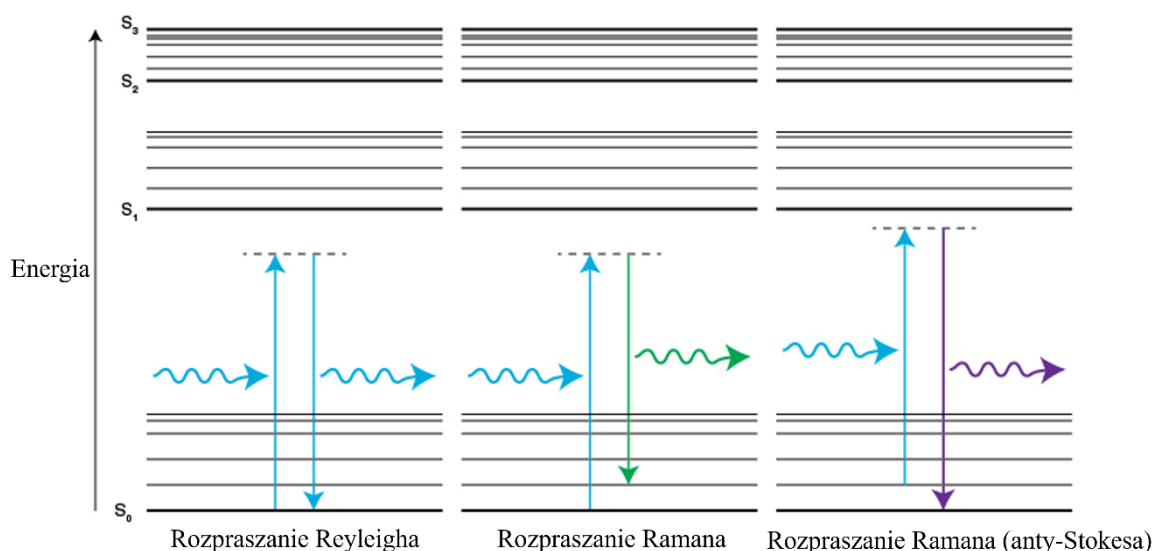


Ryc. 4 Schemat działania konfokalnego mikroskopu świetlnego w którym znajduje się dodatkowa przesłona (pinhole). Na podstawie materiałów promocyjnych ZEISS (1).

3.2 Mikroskopia Ramana

Mikroskopia Ramana jest zaawansowaną metodą analityczną, która łączy tradycyjną mikroskopię optyczną ze spektroskopią Ramana, umożliwiając identyfikację chemiczną i analizę próbek na poziomie mikroskopowym. Technika ta oparta jest na zjawisku rozpraszania Ramana, odkrytym przez C.V. Ramana w 1928 roku, pozwala na badanie obiektów o rozmiarach $0,5 \mu\text{m}^{84}$. Zjawisko rozpraszania Ramana polega na nieelastycznym rozpraszaniu światła przez próbkę, gdzie niewielka część fotonów (około 1 na 10^6 - 10^7) zmienia swoją energię w sposób charakterystyczny dla określonych wiązań chemicznych i struktur molekularnych. Kiedy foton oddziałuje z cząsteczką, mogą wystąpić trzy scenariusze: rozpraszanie elastyczne (rozpraszanie Rayleigha), gdzie foton nie zmienia swojej energii po oddziaływaniu z cząsteczką i jest rozpraszany elastycznie; rozpraszanie

Stokesa, gdzie foton traci część swojej energii na rzecz cząsteczki, co skutkuje niższą energią fotonu rozproszonego i wzbudzonym stanem wibracyjnym cząsteczki; oraz rozpraszanie anti-Stokesa, gdzie foton zyskuje energię od cząsteczki znajdującej się w stanie wzbudzonym, co skutkuje wyższą energią fotonu rozproszonego⁸⁵. Różnice energii między fotonem padającym a rozproszonym odpowiadają energiom przejść wibracyjnych w cząsteczkach, co umożliwia identyfikację związków chemicznych i badanie ich struktury⁸⁶ [Ryc. 5]. Typowy układ mikroskopu Ramana składa się ze źródła światła laserowego, mikroskopu optycznego, może to również być układ konfokalny, monochromatora lub spektrografu, detektora (zwykle CCD) oraz systemu komputerowego służącego do analizy i interpretacji danych. Światło laserowe jest skupiane na próbce przez obiektyw mikroskopu, a rozproszone światło jest zbierane przez ten sam obiektyw i analizowane, dostarczając szczegółowych informacji o składzie chemicznym i strukturze badanego materiału⁸⁷.



Ryc. 5 Diagram Jabłońskiego pokazuje zmiany energii podczas rozpraszania Rayleigha i Ramana. S_0 , S_1 , S_2 to typowe elektrony poziomy energetyczne, z poziomami wibracyjnymi o wyższej energii. Na podstawie (2).

Współczesna mikroskopia Ramana jest często stosowana w naukach biologicznych ze względu na jej łagodne działanie na próbkę (dzięki czułym detektorom intensywność światła laserowego może być zminimalizowana) i możliwość dostarczania szczegółowych informacji molekularnych bez konieczności użycia zewnętrznych znaczników lub barwników. Mikroskopia Ramana umożliwia analizowanie składu chemicznego pojedynczych komórek i ich organelli, umożliwiając badanie procesów biochemicznych w komórkach, identyfikację różnych typów komórek oraz obserwację zmian w komórkach w różnych warunkach⁸⁷. Technika ta pozwala również na śledzenie *in vivo* obecności

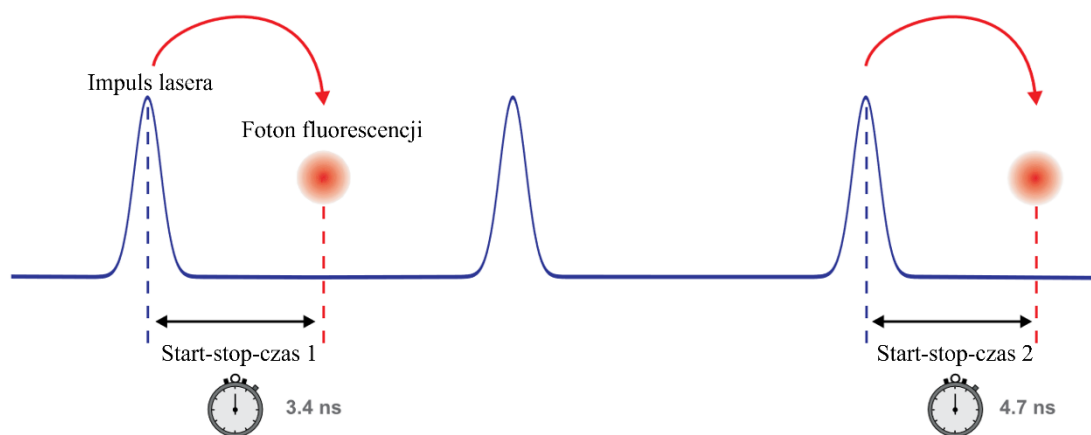
metabolitów w żywych organizmach, dostarczając informacji o szlakach metabolicznych i reakcjach komórek na różne bodźce⁸⁸. Mikroskopia Ramana jest także użyteczna w diagnostyce chorób umożliwiając identyfikację specyficznych sygnatur molekularnych związanych ze stanami patologicznymi, na przykład, pozwala odróżnić zdrowe tkanki od tkanek zmienionych nowotworowo na podstawie ich widm Ramana⁸⁹. Technika ta jest również wykorzystywana do badania białek, kwasów nukleinowych, lipidów i innych biomolekuł, pomagając w zrozumieniu ich struktury, interakcji i funkcji w kontekście biologicznym⁸⁶.

Jedną z głównych zalet mikroskopii Ramana jest zachowanie natywnego stanu badanej próbki, ponieważ metoda ta nie wymaga wstępnego przygotowania (znakowania) mogącego zmienić jej właściwości. Technika ta eliminuje potrzebę używania barwników lub znaczników, co redukuje możliwość powstania artefaktów, a także zapewnia stosunkowo wysoką rozdzielczość przestrzenną, umożliwiając szczegółowe mapowanie przestrzenne próbki na poziomie mikroskopowym. Mikroskopia Ramana umożliwia analizę próbki w różnych stanach skupienia (stałym, ciekłym, gazowym) i warunkach środowiskowych (temperatura, ciśnienie). Jednym z głównych wyzwań jest zakłócenie (tło) fluorescencyjne, które może sprawić, że sygnał Ramana jest trudny do detekcji gdy intensywność fluorescencji jest zbyt duża, utrudniając interpretację danych. Jednak techniki, takie jak SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) oraz stosowanie różnych (w szczególności bardziej długofalowych) długości fal laserowych mogą zniwelować ten problem⁹⁰. Rozpraszanie Ramana jest ze swojej natury mało wydajne, co wymaga czułych detektorów i zoptymalizowanych ustawień, aby zwiększyć wykrywalność sygnału. Nowoczesne mikroskopy Ramana są wysoce zautomatyzowane, umożliwiając szybkie przełączanie między laserami, automatyczne dostosowywanie filtrów i siatek oraz ciągłą kalibrację dla precyzyjnych pomiarów. Zaawansowane oprogramowanie umożliwia kompleksową analizę danych i tworzenie map chemicznych, co ułatwia szczegółowe i dokładne badania biologiczne⁸⁴.

3.3 Mikroskopia czasów życia fluorescencji

Mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) to zaawansowana technika mikroskopowa, która umożliwia badanie procesów zachodzących w próbkach biologicznych poprzez pomiar czasu życia fluorescencji. Zasada działania FLIM opiera się na pomiarze czasu, przez jaki cząsteczki pozostają w stanie wzbudzonym przed powrotem do stanu podstawowego. Czas życia fluorescencji (τ) definiuje się jako średni czas, w którym

intensywność fluorescencji emitera spada do poziomu $1/e$ po jego wzbudzeniu. Wzbudzenie próbki realizowane jest za pomocą krótkich impulsów świetlnych, najczęściej generowanych przez laser femtosekundowy lub pikosekundowy. Do detekcji stosuje się metodę skorelowanego czasowo zliczania pojedynczych fotonów (TCSPC), która rejestruje profile zaniku intensywności fluorescencji dla każdego piksela próbki. Analiza danych polega na tworzeniu mapy rozkładu długości czasu życia fluorescencji w badanej próbce¹² [Ryc. 6].



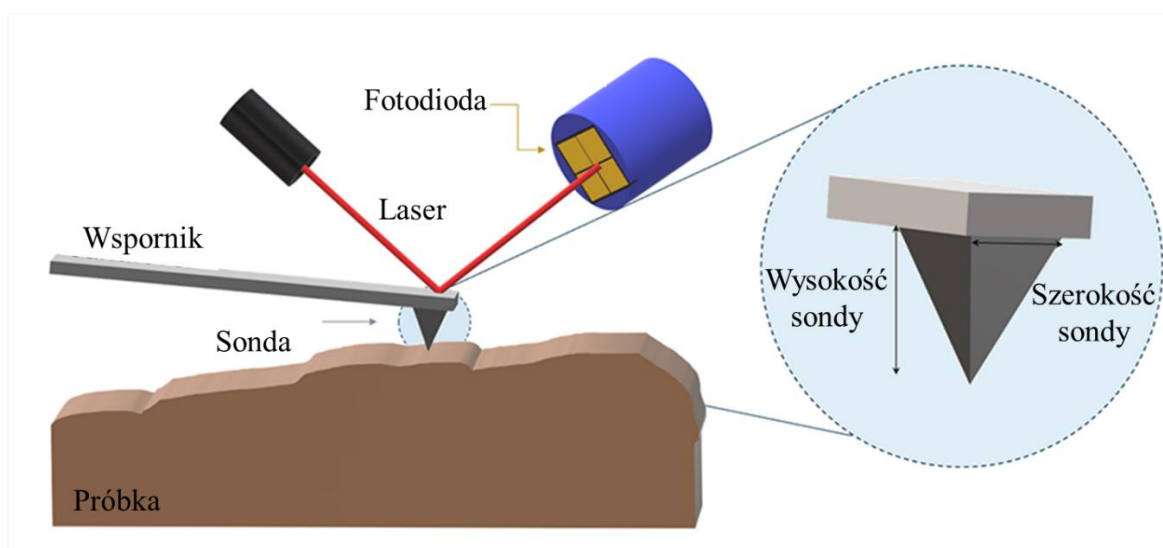
Ryc. 6 Pomiar czasów start-stop w pomiarze fluorescencji z rozdzielczością czasową za pomocą TCSPC. Na podstawie⁹¹.

Technika FLIM znajduje szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach nauki i medycyny. W badaniach biologicznych umożliwia analizę procesów zachodzących w żywych komórkach i tkankach, co jest niezwykle cenne dla zrozumienia funkcjonowania organizmów na poziomie molekularnym¹². W diagnostyce medycznej technika FLIM może być wykorzystywana do wykrywania zmian patologicznych w tkankach, co ma potencjał w rozwoju nowych metod diagnostycznych⁹². Technika ta jest szczególnie przydatna w badaniach interakcji molekularnych, zwłaszcza z wykorzystaniem metody opartej o FRET (Förster Resonance Energy Transfer), gdyż pozwala na badanie oddziaływań między białkami z wysoką precyzją przestrzenną i czasową¹¹. Ponadto, FLIM umożliwia analizę mikrośrodowiska, ponieważ czas życia fluorescencji zależy od warunków środowiskowych, takich jak pH, temperatura czy obecność jonów, co pozwala na ocenę tych parametrów w próbkach biologicznych⁹³. FLIM oferuje szereg zalet w porównaniu do tradycyjnych technik mikroskopii fluorescencyjnej. Jedną z kluczowych cech jest niezależność (w większości przypadków) długości czasu życia fluorescencji od zmian intensywności oświetlenia czy rozpraszania światła, co przekłada się na większą dokładność i powtarzalność pomiarów. Dzięki temu FLIM staje się coraz bardziej popularnym narzędziem w zaawansowanych

badaniach biologicznych i medycznych. Technika ta umożliwia nie tylko wizualizację struktur komórkowych, ale także dostarcza informacji o dynamice procesów molekularnych zachodzących w czasie rzeczywistym. W kontekście badań biomedycznych, FLIM znalazła zastosowanie w analizie procesów apoptozy, badaniach metabolizmu komórkowego oraz w ocenie skuteczności terapii przeciwnowotworowych⁹⁴. W dziedzinie neuronauki, FLIM wykorzystywana jest do badania funkcji synaps i dynamiki neurotransmiterów, co przyczynia się do lepszego zrozumienia procesów zachodzących w mózgu⁹⁵. Warto podkreślić, że FLIM może być łączona z innymi technikami mikroskopowymi, takimi jak mikroskopia konfokalna czy wielofotonowa, co dodatkowo rozszerza możliwości badawcze. Połączenie FLIM z mikroskopią super-rozdzielczą otwiera nowe perspektywy w badaniach struktur subkomórkowych z niespotykaną dotąd precyzją^{92,96}. W ostatnich latach obserwuje się również rozwój technik FLIM opartych na mikroskopii z wykorzystaniem siatki modyfikującej wiązkę lasera (ang. Structured Illumination Microscope) (SIM-FLIM), co pozwala na uzyskanie obrazów o wysokiej rozdzielczości przestrzennej przy jednoczesnym zachowaniu informacji o czasach życia fluorescencji⁹⁷. Postęp technologiczny w dziedzinie detektorów i źródeł światła przyczynia się do ciągłego doskonalenia techniki FLIM. Nowe generacje kamer FLIM umożliwiają coraz szybszą akwizycję danych, co jest kluczowe dla badania dynamicznych procesów biologicznych. Rozwój laserów femtosekundowych i pikosekundowych pozwala na precyzyjniejsze wzbudzenie próbek, co przekłada się na lepszą jakość uzyskiwanych danych. Ponadto, postęp w dziedzinie analizy danych i uczenia maszynowego otwiera nowe możliwości w interpretacji złożonych zestawów danych FLIM, umożliwiając automatyczną klasyfikację tkanek czy detekcję subtelnych zmian w mikrośrodkowisku komórkowym⁹⁸. Wyzwaniem w stosowaniu techniki FLIM pozostaje interpretacja uzyskanych danych, szczególnie w przypadku złożonych systemów biologicznych, gdzie na czas życia fluorescencji może wpływać wiele czynników. Dlatego też, równoległe z rozwojem samej techniki, prowadzone są badania nad nowymi metodami analizy danych i modelowania matematycznego, które pozwalają na lepsze zrozumienie obserwowanych zjawisk⁹⁹. Mimo tych wyzwań, FLIM pozostaje jedną z najbardziej obiecujących technik w dziedzinie obrazowania biomedycznego, oferując unikalne możliwości w badaniach nad funkcjonowaniem organizmów żywych na poziomie molekularnym.

3.4 Mikroskopia sił atomowych

Mikroskopia sił atomowych (AFM - Atomic Force Microscopy) to technika obrazowania powierzchni materiałów z rozdzielczością na poziomie atomowym. Metoda ta opracowana w 1986 roku przez Gerd Binniga, Calvina Quate'a i Christopa Gerbera, stanowi przełom w dziedzinie nanotechnologii i badań powierzchni¹⁰⁰. AFM umożliwia trójwymiarowe obrazowanie topografii powierzchni z niezwykłą precyzją, a także badanie właściwości mechanicznych, elektrycznych i magnetycznych materiałów w skali nanometrowej. Zasada działania AFM opiera się na pomiarze sił oddziaływania między ostrym zakończeniem sondy (zwanym ostrzem lub tipem) a powierzchnią badanej próbki. Ostrze, zazwyczaj wykonane z krzemu lub azotku krzemu, jest zamontowane na elastycznej dźwigni (cantilever). Podczas skanowania powierzchni próbki, siły działające między ostrzem a powierzchnią powodują ugięcie dźwigni. To ugięcie jest mierzone za pomocą precyzyjnego układu detekcji, najczęściej wykorzystującego odbicie wiązki laserowej od powierzchni dźwigni. Zmiany położenia odbitej wiązki lasera są rejestrowane przez fotodiodę, co pozwala na określenie topografii powierzchni z dokładnością do ułamków nanometra¹⁰¹[Ryc. 7].



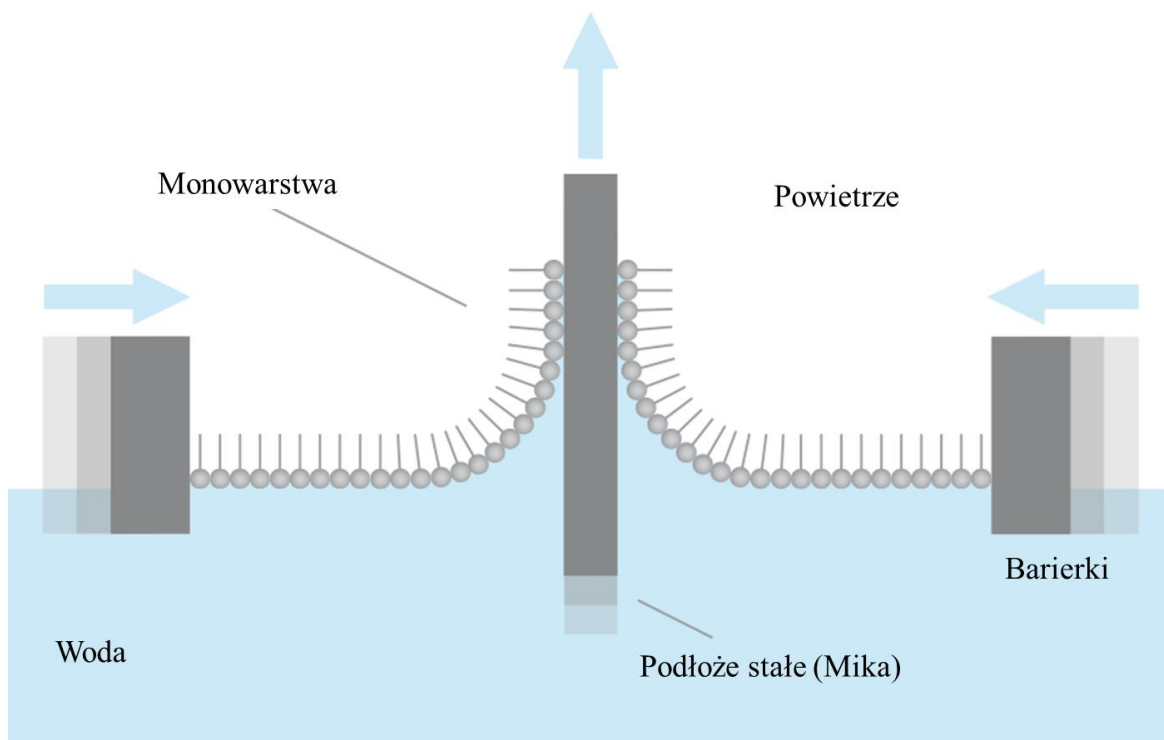
Ryc. 7 Zasada działania mikroskopu sił atomowych. Podczas skanowania próbki silowniki piezoelektryczne działają w elektronicznej pętli sprzężenia zwrotnego, tak aby przesunąć końcówkę sondy (lub próbkę) bliżej lub dalej od siebie, w taki sposób aby utrzymać względną odległość końcówka sondy - próbka na stałej, zadanej wartości. Na podstawie (3).

AFM może pracować w różnych trybach, z których najważniejsze to tryb kontaktowy, bezkontaktowy i przerywanego kontaktu (tapping mode). W trybie kontaktowym ostrze pozostaje w stałym kontakcie z powierzchnią, co umożliwia uzyskanie wysokiej rozdzielczości, ale może prowadzić do uszkodzenia delikatnych próbek lub sondy

pomiarowej. Tryb bezkontaktowy polega na utrzymywaniu ostrza w niewielkiej odległości od powierzchni, co minimalizuje ryzyko uszkodzenia próbki, ale może skutkować niższą rozdzielczością. Tryb przerywanego kontaktu stanowi kompromis między tymi dwoma podejściami, oferując dobrą rozdzielczość przy jednoczesnym zmniejszeniu ryzyka uszkodzenia próbki¹⁰¹. Zastosowania AFM są niezwykle szerokie i obejmują wiele dziedzin nauki i technologii. W biologii molekularnej i biochemii AFM wykorzystywane jest do badania struktur białek, kwasów nukleinowych i błon komórkowych z rozdzielczością nanometrową¹⁰². W nauce o materiałach AFM umożliwia charakteryzację powierzchni polimerów, metali, ceramiki i nanomateriałów, dostarczając informacji o ich topografii, chropowatości i właściwościach mechanicznych¹⁰³. Jedną z kluczowych zalet AFM jest możliwość prowadzenia badań w różnych środowiskach, w tym w powietrzu, próżni i cieczech. Ta ostatnia cecha jest szczególnie istotna dla badań biologicznych, umożliwiając obserwację procesów zachodzących w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. AFM pozwala również na manipulację pojedynczymi atomami i cząsteczkami, co otworzyło nowe możliwości w dziedzinie nanotechnologii i inżynierii molekularnej¹⁰⁴. W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny rozwój technik AFM. Wprowadzenie wysokoczęstotliwościowego AFM (HS-AFM) umożliwiło obrazowanie dynamicznych procesów biologicznych w czasie rzeczywistym, takich jak zmiany konformacyjne białek¹⁰⁵. Połączenie AFM z innymi technikami, takimi jak spektroskopia Ramana (AFM-Raman) czy mikroskopia fluorescencyjna (AFM-FLIM), pozwala na jednoczesne uzyskiwanie informacji o topografii i właściwościach chemicznych badanych próbek¹⁰⁶. Wyzwaniem w stosowaniu AFM pozostaje interpretacja uzyskanych danych, szczególnie w przypadku złożonych systemów biologicznych czy zaawansowanych nanomateriałów. Dlatego równoległe z rozwojem samej techniki prowadzone są badania nad nowymi metodami analizy danych i modelowania, które pozwalają na lepsze zrozumienie obserwowanych zjawisk na poziomie atomowym i molekularnym¹⁰⁷. Mikroskopia sił atomowych stanowi potężne narzędzie badawcze, które zrewolucjonizowało nasze możliwości obrazowania i manipulacji materią na poziomie nanometrowym. Dzięki ciągłemu rozwojowi technologicznemu i metodologicznemu, AFM pozostaje kluczową techniką w naukach o materiałach, biologii molekularnej, nanotechnologii i wielu innych dziedzinach, przyczyniając się do postępu w zrozumieniu fundamentalnych procesów zachodzących w skali atomowej i molekularnej.

3.5 Technika Langmuir-Blodgett

Technika Langmuir-Blodgett (LB) jest cennym narzędziem w badaniach biologicznych, umożliwiającym tworzenie i analizę modelowych błon biologicznych. Metoda ta pozwala na otrzymywanie uporządkowanych monowarstw lipidowych o ściśle kontrolowanym składzie i orientacji cząsteczek. Zasada działania techniki LB opiera się na właściwościach cząsteczek amfifilowych, które posiadają zarówno hydrofilową, jak i hydrofobową część. Proces tworzenia monowarstw rozpoczyna się od przygotowania roztworu amfifilowych cząsteczek (najczęściej lipidów) w lotnym rozpuszczalniku organicznym. Następnie roztwór nanosi się kroplami na powierzchnię wody w specjalnej wannie Langmuira. Po odparowaniu rozpuszczalnika, cząsteczki pozostają na powierzchni wody. Kolejnym etapem jest kompresja monowarstwy za pomocą ruchomych barierki, które powoli zmniejszają dostępną dla badanych cząstek powierzchnię, co prowadzi do zagęszczenia i samoistnego uporządkowania cząsteczek. Proces ten monitoruje się poprzez pomiar ciśnienia powierzchniowego. Ostatnim etapem jest przeniesienie uporządkowanej monowarstwy na stałe podłoże (np. szkło, krzem, mika) poprzez jego pionowe zanurzenie i wynurzenie. Proces ten można powtarzać, tworząc struktury wielowarstwowe¹⁰⁸ [Ryc. 8].



Ryc. 8 Warstwy Langmuira osadzają się na powierzchni podłoża stałego poprzez pionowe zanurzenie stałego podłoża z fazy gazowej do fazy ciekłej (lub odwrotnie). Na podstawie materiałów promocyjnych Biolin Scientific (4).

Zastosowania techniki LB w biologii są liczne i różnorodne. Jednym z głównych obszarów jest modelowanie błon biologicznych, co umożliwia badanie wpływu składu lipidowego na właściwości błon, analizę interakcji między różnymi klasami lipidów oraz tworzenie asymetrycznych błon modelowych, odzwierciedlających naturalne błony komórkowe¹⁰⁹. Technika ta jest również niezastąpiona w badaniu interakcji lipid-białko, pozwalając na analizę mechanizmów wiązania białek peryferyjnych do błon, badanie wpływu białek na organizację lipidów w błonie oraz określanie roli specyficznych lipidów w funkcjonowaniu białek błonowych¹¹⁰. LB umożliwia także szczegółową analizę właściwości fizykochemicznych błon, w tym badanie przejść fazowych, określanie wpływu cholesterolu na płynność i uporządkowanie błon oraz analizę właściwości elektrycznych i mechanicznych monowarstw lipidowych¹¹¹. Kolejnym ważnym zastosowaniem jest badanie wpływu czynników zewnętrznych na błony, takich jak analiza oddziaływania leków z błonami lipidowymi, badanie wpływu peptydów antybakteryjnych na integralność błon czy określanie mechanizmów działania toksyn i innych czynników zaburzających błony¹¹². Technika LB znajduje również zastosowanie w konstruowaniu biosensorów, umożliwiając tworzenie układów do detekcji specyficznych cząsteczek, projektowanie czujników do monitorowania interakcji lek-błona oraz rozwój platform do badań przesiewowych nowych leków¹¹³. Technika LB jest również cennym narzędziem w badaniu procesów fuzji błon, umożliwiając analizę mechanizmów łączenia się błon lipidowych, badanie roli specyficznych lipidów w procesach fuzji oraz modelowanie procesów egzo- i endocytozy¹¹⁴. Dzięki swojej wszechstronności i precyzji, technika Langmuir-Blodgett pozostaje kluczowym narzędziem w badaniach nad błonami biologicznymi, umożliwiając nie tylko tworzenie uproszczonych modeli błon, ale także badanie złożonych interakcji molekularnych w kontrolowanych warunkach. Połączenie tej techniki z zaawansowanymi metodami analitycznymi, takimi jak mikroskopia sił atomowych (AFM) czy spektroskopia fluorescencyjna, otwiera nowe możliwości w zrozumieniu fundamentalnych procesów biologicznych zachodzących na poziomie błon komórkowych.

4 Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes

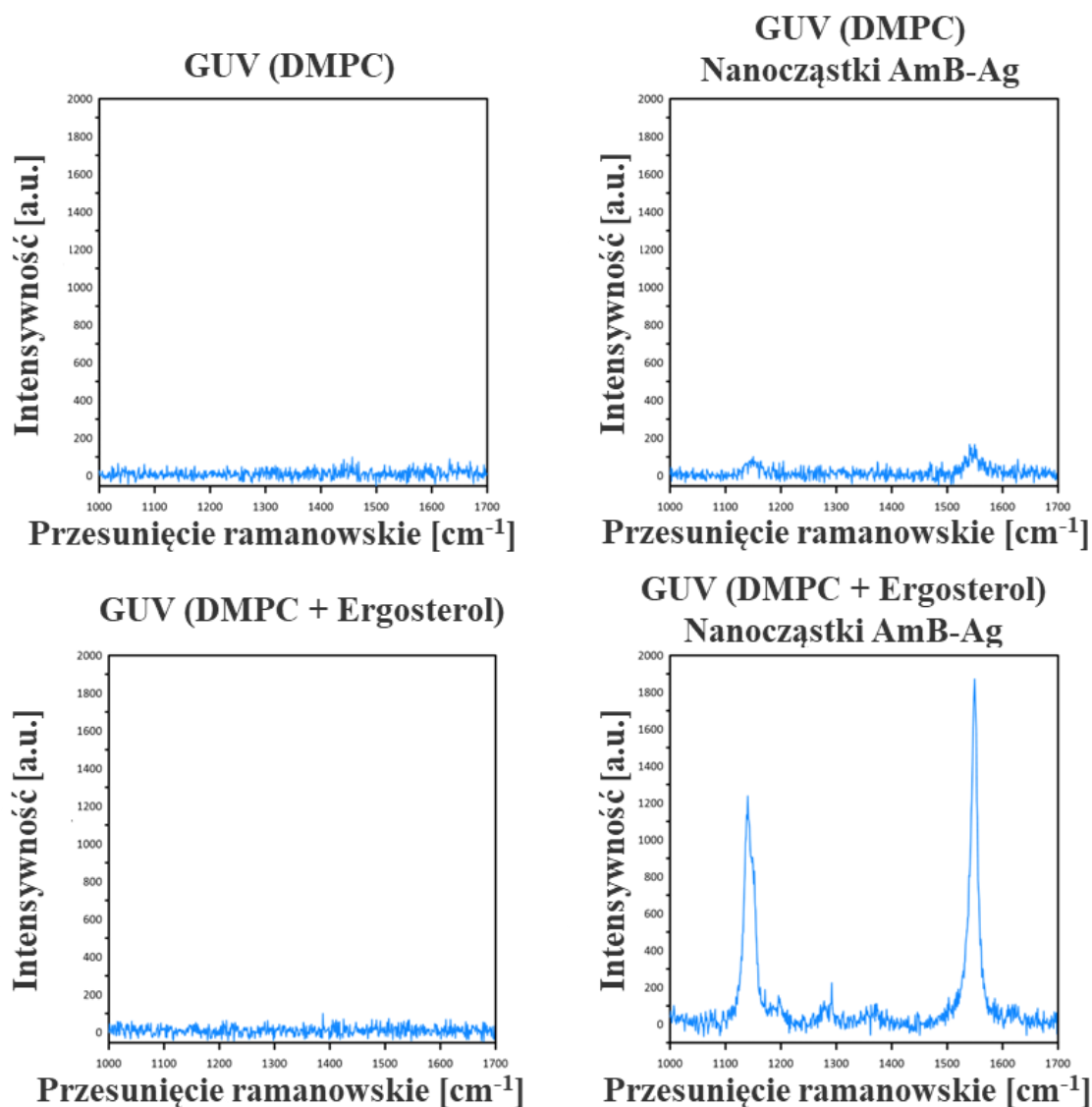
Amfoterycyna B (AmB) jest powszechnie stosowanym antybiotykiem przeciwgrzybiczym, który od dziesięcioleci ratuje życie pacjentom z ciężkimi infekcjami grzybiczymi. Mimo długiej historii stosowania, dokładny mechanizm działania AmB na poziomie molekularnym wciąż pozostaje przedmiotem dyskusji naukowych. Wśród najczęściej rozważanych mechanizmów wymienia się tworzenie kanałów jonowych w błonach komórkowych oraz sekwestrację steroli błonowych. Zrozumienie tych mechanizmów ma kluczowe znaczenie nie tylko poznawcze, ale przede wszystkim praktyczne - pozwoliłoby na opracowanie skuteczniejszych i bezpieczniejszych form leku, ograniczając jego toksyczne działania niepożądane. W ostatnich latach uwagę naukowców przyciągnęły hybrydowe nanocząstki AmB ze srebrem (AmB-Ag), które wykazują wyjątkowo wysoką skuteczność przeciwgrzybiczą przy jednoczesnym zmniejszeniu toksyczności dla komórek ludzkich. Mechanizm działania tych nanocząstek nie został jednak w pełni wyjaśniony. Celem niniejszej pracy było zgłębienie molekularnych podstaw aktywności biologicznej AmB-Ag w odniesieniu do komórek *Candida albicans*. Zaawansowane techniki spektroskopii molekularnej i obrazowania, w tym mikroskopia fluorescencyjna z rozdzielczością czasową (FLIM) oraz mikrospektroskopia ramanowska, pozwoliły na analizę interakcji nanocząstek AmB-Ag z komórkami grzyba na poziomie nanometrowym. Badania te mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia mechanizmu działania AmB oraz optymalizacji jego form farmaceutycznych, co może przyczynić się do opracowania skuteczniejszych i bezpieczniejszych terapii przeciwgrzybiczych.

Badania rozpocząłem od syntezy nanocząstek AmB-Ag o średnicy około 7 nm, gdzie amfoterycyna B pełniła podwójną rolę - zarówno czynnika redukującego, jak i stabilizującego. Ta unikalna metoda syntezy pozwoliła na uzyskanie monodispersyjnych nanocząstek o ściśle kontrolowanych właściwościach. W tym celu AmB została oczyszczona dwuetapowo: pierwsza faza polegała na oczyszczaniu na granicy faz woda-chloroform, zaś druga na oczyszczaniu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC ang. High-Performance Liquid Chromatography). Następnie zastosowałem zaawansowane techniki mikroskopowe i spektroskopowe do analizy interakcji AmB-Ag z układem

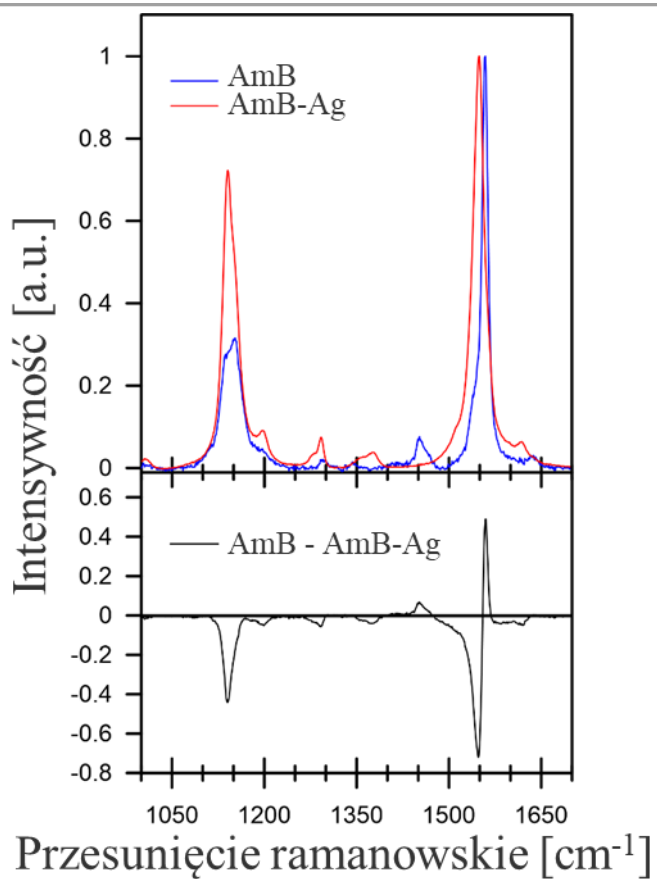
modelowym w postaci GUV wykonanych z DMPC (ang. 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) oraz Ergo (ergosterol).

Badania wstępne

W celu identyfikacji zjawisk zachodzących w układzie pomiarowym wykonałem pomiary kontrolne dla poszczególnych elementów układu pomiarowego w celu weryfikacji widm charakterystycznych dla tych komponentów [Ryc. 9; Ryc.10].

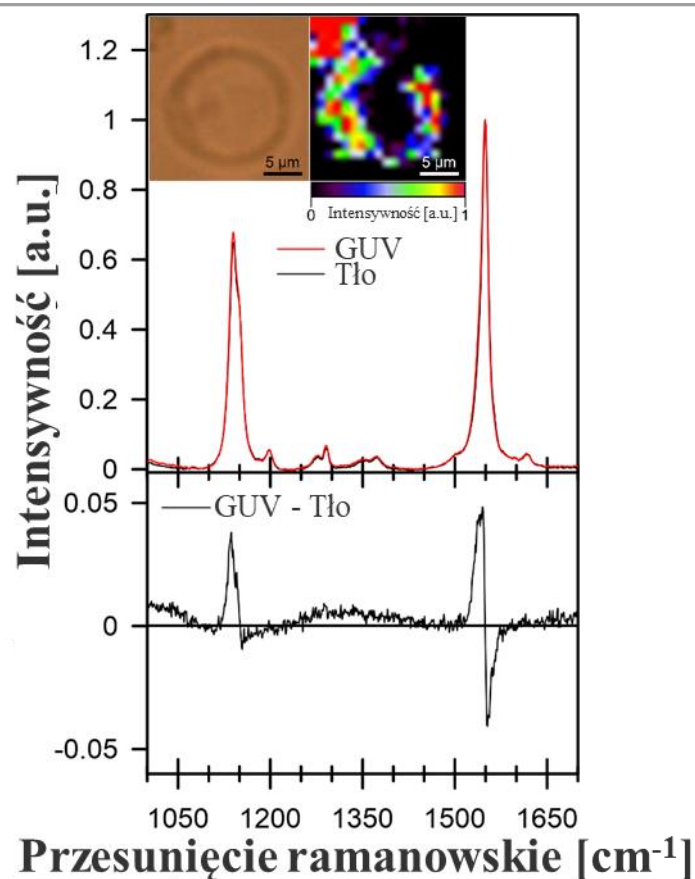


Ryc. 9 Widma Ramana dla pojedynczych elementów układu modelowego. Spektroskopia Ramana przy użyciu lasera 458 nm.



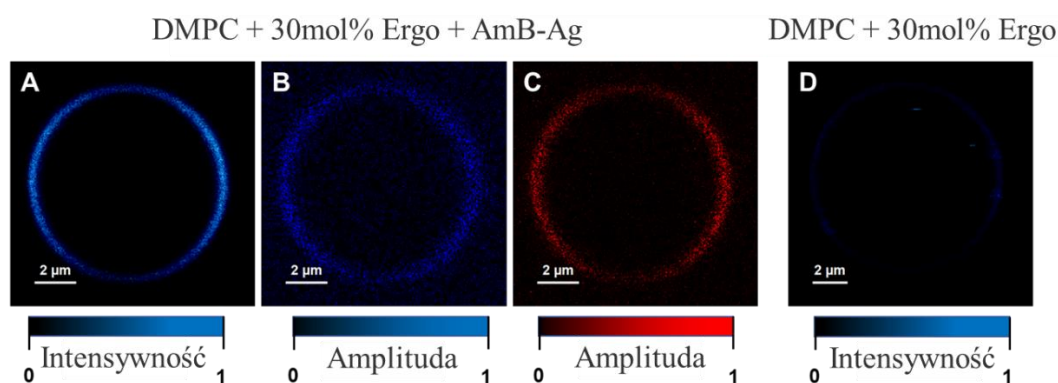
Ryc. 10 Widma Ramana dla AmB oraz noncząstek AmB-Ag wraz z widmem różnicowym w dolnym panelu. Spektroskopia Ramana przy użyciu lasera 458 nm.

W następnym kroku dokonałem pomiarów układu modelowego w kilkudziesięciu powtórzeniach. Poniżej zamieszczam pomiar reprezentatywny [Ryc. 11].



Ryc. 11 Widmo Ramana dla układu modelowego w postaci GUV. Spektroskopia Ramana przy użyciu lasera 458 nm wykazała lokalizację Ag-AmB w warstwie lipidowej, potwierdzając ich silne powinowactwo do ergosterolu. Widmo Ramana dla nanocząstek AmB-Ag charakteryzuje się maksimum 1558cm⁻¹.

Analogicznie zostały wykonane badania wstępne z wykorzystaniem techniki FLIM [Ryc. 12]

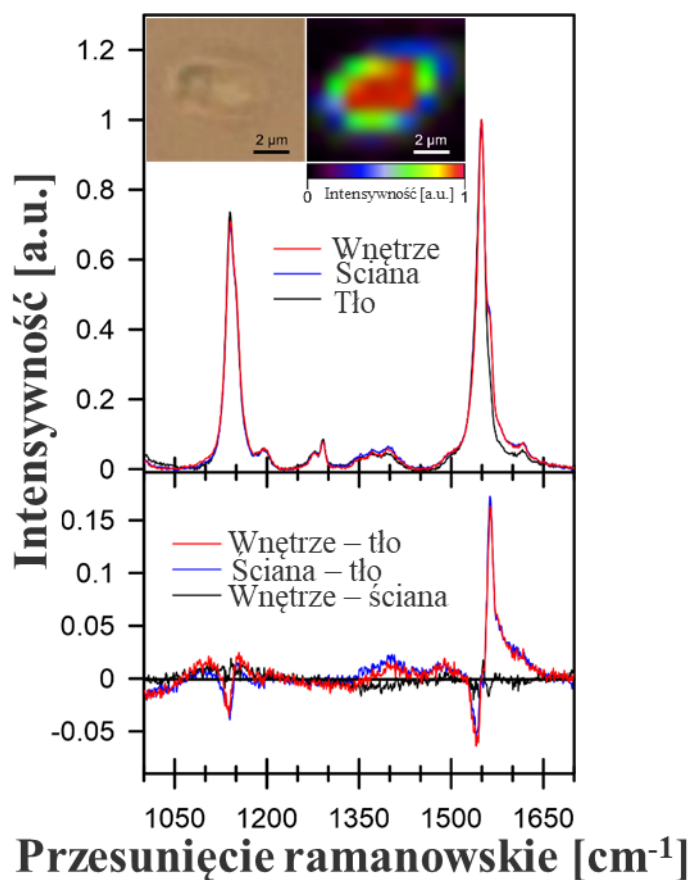


Ryc. 12 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej (FLIM) gigantycznych pęcherzyków jednowarstwowych (GUV) z ergosterolem przed i po dodaniu nanocząstek Ag-AmB skanowano laserem 405 nm. (a) intensywność czasów życia fluorescencji tuż po dodaniu nanocząstek Ag-AmB; (b) intensywność czasów życia fluorescencji dla czasów < 300 ps charakterystycznych dla nanocząstek Ag-AmB; (c) intensywność czasów życia fluorescencji dla czasów 0,45 ns charakterystycznych dla amfoterycyny B. (d) intensywność czasów życia fluorescencji dla GUV bez dodanych nanocząstek Ag-AmB.

Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes

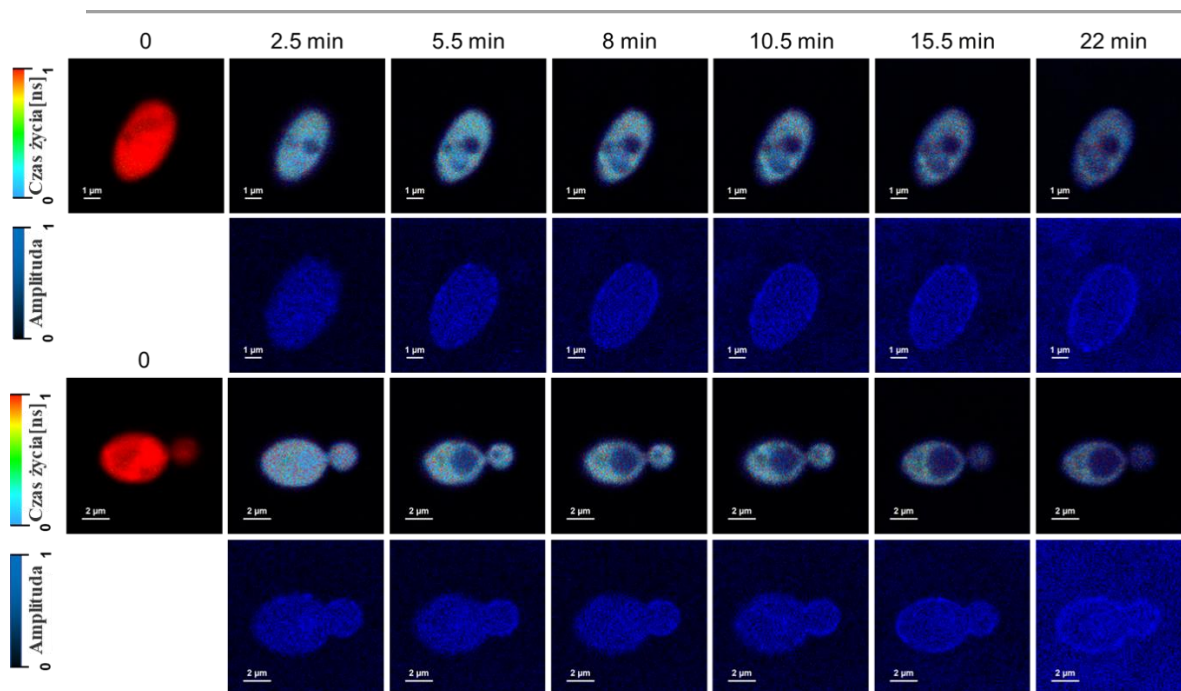
Badania te pozwoliły mi określić lokalizację i orientację cząsteczek AmB w błonie lipidowej.

Kolejnym etapem było wykorzystanie organizmu modelowego *C. albicans* jako naturalnego układu biologicznego. W tym celu drożdże *C. albicans* hodowano w podłożu YPD (1% ekstrakt drożdżowy, 2% pepton, 2% glukoza) w temperaturze 37 °C. W doświadczeniach wykorzystano drożdże w logarytmicznej fazie wzrostu. Następnie przeprowadzono badania mikroskopowe [Ryc. 13; Ryc. 14].



Ryc. 13 Spektroskopia Ramana przy użyciu lasera 458 nm wykazała lokalizację AmB-Ag wewnątrz komórek grzybów, potwierdzając ich silne powinowactwo do ergosterolu. Widmo Ramana dla nanocząstek Ag-AmB charakteryzuje się maksimum 1558cm⁻¹.

Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes



Ryc. 14 Czas życia fluorescencji wykazał, że gdy nanocząstki Ag-AmB zostały dodane do komórek grzybów *Candida albicans*, spowodowało to gwałtowne skrócenie czasu życia (górny panel). Dolny panel pokazuje rozmieszczenie w komórce nanocząstek Ag-AmB o charakterystycznym czasie życia <300 ps i utratę integralności błony komórkowej.

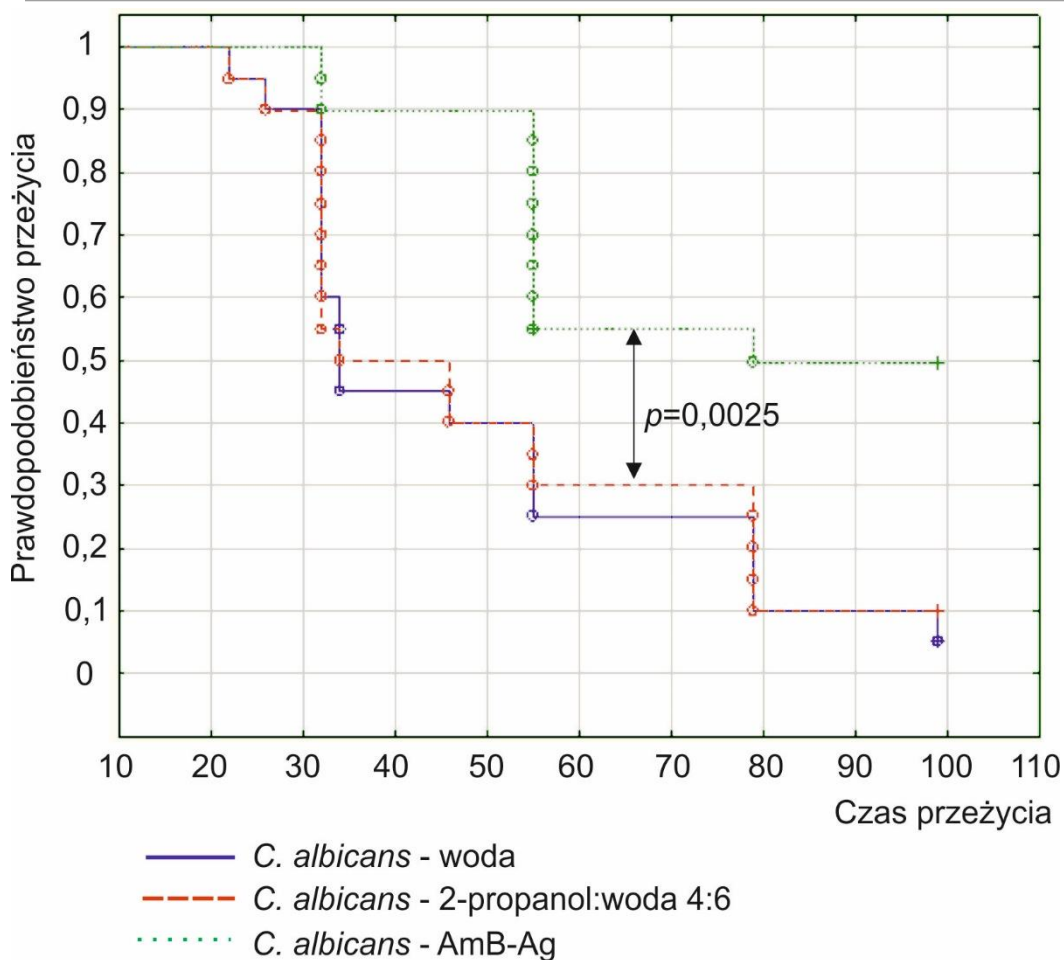
Te komplementarne metody umożliwiły mi obserwację procesu przenikania AmB przez ścianę komórkową grzyba, wiązania się z błoną komórkową i strukturami wewnątrzkomórkowymi, a także monitorowanie dezintegracji błony komórkowej w czasie rzeczywistym. Kluczowym odkryciem było zaobserwowanie, że AmB w formie AmB-Ag może efektywnie pokonać barierę ściany komórkowej grzyba, co jest prawdopodobnie głównym powodem jej wyjątkowo wysokiej aktywności przeciwgrzybiczej. Po dotarciu do błony komórkowej, cząsteczki AmB odłączają się od nanocząstek srebra i wbudowują się w strukturę lipidową błony. Wykazałem, że proces ten zachodzi w ciągu kilku minut od ekspozycji komórek na AmB-Ag. Porównałem również aktywność AmB-Ag z konwencjonalną formą AmB, potwierdzając znacznie wyższą skuteczność hybrydowych nanocząstek w zwalczaniu grzybów. Przeprowadziłem testy przeżywalności komórek *C. albicans* po ekspozycji na różne stężenia obu form antybiotyku, co dostarczyło ilościowych danych potwierdzających przewagę AmB-Ag. Wyniki moich badań jednoznacznie wskazują, że jednym z głównych mechanizmów przeciwgrzybiczego działania AmB jest dezintegracja błony komórkowej. Proces ten zachodzi stosunkowo szybko po ekspozycji komórek na AmB-Ag, co prowadzi do wypływu zawartości komórki i ostatecznie do jej śmierci. Wykazałem, że kluczowym elementem wysokiej skuteczności

AmB-Ag jest zdolność do efektywnego pokonania bariery ściany komórkowej grzyba, a następnie szybkiego zaburzenia integralności błony komórkowej.

Do oceny aktywności przeciwgrzybiczej Ag-Amb *in vivo* wobec grzyba *C. albicans* wybrałem gąsienice mola woskowego, *Galleria mellonella*. powszechnie wykorzystywanego jako organizm modelowy w badaniach patogenezy grzybów *C. albicans*¹¹⁵.

Gąsienicom *G. mellonella* podano w drodze iniekcji żywe komórki *C. albicans* w dawce 5×10^5 , a następnie, po 2 godzinach, AmB-Ag w stężeniu odpowiadającym wartości 10 MIC określonej *in vitro*. Prawdopodobieństwo przeżycia osobników zakażonych grzybem, a następnie poddanych działaniu AmB-Ag było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z larwami kontrolnymi, którym po zakażeniu podano roztwór woda:izopropanol, w którym były zawieszone cząstki AmB-Ag. Analiza przeżywalności wykazała, że prawdopodobieństwo przeżycia 60 h przez gąsienice, którym wstrzyknięto *C. albicans*, a następnie roztwór woda:izopropanol, wynosiło około 30%, natomiast larw, którym podano AmB-Ag około 55%. Prawdopodobieństwo przeżycia 100 h wynosiło około 10% i 50%, odpowiednio dla zakażonych larw traktowanych roztworem woda:izopropanol i AmB-Ag. Wszystkie larwy zainfekowane *C. albicans*, którym następnie wstrzyknięto roztwór woda:izopropanol były martwe pod koniec obserwacji, po ok. 100 h. natomiast w tym samym czasie 50% larw, którym wstrzyknięto AmB-Ag, nadal żyło [Ryc. 15].

Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes



Ryc. 15 Przeciwgrzybicze działanie AmB-Ag na modelu *in vivo* *G. mellonella* zakażonych uprzednio *C. albicans*. Larwom wstrzyknięto zawiesinę zawierającą komórki *C. albicans*, a po 2 godzinach inkubacji podano wodę lub roztwór woda:izopropanol (kontrola) lub AmB-Ag. Oceniono przeżywalność larw, a prawdopodobieństwo przeżycia oszacowano przy użyciu estymatora Kaplana-Meiera. Porównania przeżywalności między grupą kontrolną a badaną dokonano za pomocą testu log-rank. Stwierdzono istotną statystycznie różnicę między grupą kontrolną a grupą badaną. Wykres przedstawia wyniki z trzech niezależnych eksperymentów.

Badania przeżywalności przeprowadzone przy użyciu owadziego organizmu modelowego *G. mellonella* wskazały, że AmB-Ag wykazuje aktywność przeciwgrzybiczą *in vivo* wobec *C. albicans* w stężeniu odpowiadającym wartości 10 MIC określonej *in vitro*. Uzyskane wyniki potwierdzają także użyteczność tego modelu do testowania aktywności przeciwdrobnoustrojowej takich cząsteczek.



Article

Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes

Sebastian Janik, Ewa Grela, Sylwia Stączek, Agnieszka Zdybicka-Barabas, Rafal Luchowski, Wiesław I. Gruszecki and Wojciech Grudzinski

Special Issue

[Inorganic Nanoparticles in Biomedical Applications](#)

Edited by

Dr. Miguel Ángel Morcillo Alonso and Dr. Jorge Rubio-Retama



<https://doi.org/10.3390/molecules28124687>

Article

Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes

Sebastian Janik ¹, Ewa Grela ^{1,2}, Sylwia Stączek ³, Agnieszka Zdybicka-Barabas ³, Rafal Luchowski ¹, Wiesław I. Gruszecki ^{1,*} and Wojciech Grudzinski ^{1,*}

¹ Department of Biophysics, Institute of Physics, Maria Curie-Skłodowska University, 20-031 Lublin, Poland; sebastian.janik96@gmail.com (S.J.); ewagrela123@gmail.com (E.G.); rafal.luchowski@umcs.pl (R.L.)

² Division of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Faculty of Physics, University of Warsaw, 02-093 Warsaw, Poland

³ Department of Immunobiology, Faculty of Biology and Biotechnology, Institute of Biological Sciences, Maria Curie-Skłodowska University, 20-031 Lublin, Poland; sylwia.staczek@mail.umcs.pl (S.S.); agnieszka.zdybicka-barabas@mail.umcs.pl (A.Z.-B.)

* Correspondence: wieslaw.gruszecki@umcs.pl (W.I.G.); wojciech.grudzinski@umcs.pl (W.G.)

Abstract: Amphotericin B is a popular antifungal antibiotic, and despite decades of pharmacological application, the exact mode of its biological activity is still a matter of debate. Amphotericin B-silver hybrid nanoparticles (AmB-Ag) have been reported to be an extremely effective form of this antibiotic to combat fungi. Here, we analyze the interaction of AmB-Ag with *C. albicans* cells with the application of molecular spectroscopy and imaging techniques, including Raman scattering and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. The results lead to the conclusion that among the main molecular mechanisms responsible for the antifungal activity of AmB is the disintegration of the cell membrane, which occurs on a timescale of minutes.

Keywords: amphotericin B; nanoparticles; fungal infections; nanomedicine



Citation: Janik, S.; Grela, E.; Stączek, S.; Zdybicka-Barabas, A.; Luchowski, R.; Gruszecki, W.I.; Grudzinski, W. Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes. *Molecules* **2023**, *28*, 4687. <https://doi.org/10.3390/molecules28124687>

Academic Editors: Miguel Ángel Morcillo Alonso and Jorge Rubio-Retama

Received: 17 May 2023

Revised: 5 June 2023

Accepted: 8 June 2023

Published: 10 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Amphotericin B (AmB) is a life-saving antifungal antibiotic used to treat deep-seated mycotic infections [1,2] (see Figure S1, Supplementary Materials). Paradoxically, despite decades of pharmacological applications of this antibiotic, the exact mode of its biological activity is still a matter of debate [3]. The formation of transmembrane channels disrupting physiological ion transport [4–7] and sequestration of membrane-bound sterols [8] are among the most frequently discussed molecular mechanisms responsible for the antibiotic properties of AmB. The significance of the challenge of understanding the molecular mechanisms responsible for the biological activity of AmB follows from the fact that this is not a purely cognitive problem. Application of the pharmaceuticals based on AmB is associated with side effects that are dramatically toxic to patients [9]. It is believed and expected that the knowledge of the mechanisms and processes underlying the antifungal effect as well as those responsible for the side effects will allow the development of a pharmacological formula and an effective treatment strategy with minimized toxicity for patients. Several pharmacological formulations of AmB have been elaborated and are used in clinical practice in order to reduce severe toxicity to patients, including a preparation containing a surfactant (e.g., Fungizone) and based on liposomes (e.g., AmBisome) [9,10]. In the present work, we address the problem of the biological activity of AmB using a system based on AmB-silver (AmB-Ag) nanoparticles previously developed in our laboratory and showing exceptionally high efficiency in combating fungal cells while being practically nontoxic to human cells at comparable concentrations [10]. The relatively high antifungal activity of AmB preparations based on metal nanoparticles was demonstrated

to be associated with the fact that the antibiotic molecules in such a system can effectively cross the cellular barriers [11,12]. Particularly high antifungal activity of AmB in the form of hybrid nanoparticles with silver was originally interpreted as directly related to the effect of synergy between the antibiotic and antimicrobial activities of Ag^+ ions [10]. On the other hand, the results of our recent studies have shown that the key mechanism in the antifungal activity of AmB is crossing the cell wall barrier, allowing direct contact of the antibiotic molecules with the cell membrane [12–14]. In the current work, we pose the question of whether the particularly high efficiency of AmB-Ag, previously introduced by our team [10], does not result from the unique ability of the antibiotic in the form of hybrid metallic nanoparticles to cross the cell wall barrier. Thanks to the use of molecular spectroscopy and nanoscale imaging techniques, the search for an answer to such a question can take place at the molecular level. This represents a novel approach to in-depth insight into the problem of AmB biological activity.

2. Results and Discussion

Figure 1 (and Figure S2) presents the FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) images of *C. albicans* cells exposed to AmB-Ag nanoparticles. One of the effects of the association of AmB with silver in the form of AmB-Ag hybrid nanoparticles is the effective quenching of the fluorescence signal of the antibiotic (Figure 2). The fact that the FLIM images clearly show the short-lifetime fluorescence signal of AmB (represented by a blue color code) at the top of the long-lifetime autofluorescence of the cells (red color code) implies that the drug molecules were delivered into the cell membranes and intracellular structures in the form of AmB-Ag, but such structures were disassembled in situ so that the antibiotic molecules could effectively bind to biomembranes where the fluorescence signal of AmB is not quenched by contact with the silver nanoparticle. Such a process can be clearly observed in a model lipid membrane system. The exposition of the lipid vesicle formed with a single-lipid bilayer to AmB-Ag nanoparticles results in the binding of the antibiotic molecules to the membranes (see Figure 3). The fact that the fluorescence signal is observed in the membrane but not in the external environment, into which AmB-Ag nanoparticles were injected, implies that upon their interaction with a lipid membrane, the AmB complex with silver disassembles and the antibiotic molecules bind to a lipid environment. Moreover, the fact that the vesicle cross-section image presents a higher fluorescence signal in the right- and left-hand sectors as compared to the low- and high-membrane sectors is a direct manifestation of the fact that the direction of the transition dipole of the AmB molecule (close to the long molecular axis of AmB) is oriented vertically to the membrane plane [13]. Such an effect follows directly from photoselection since the electric vector of scanning laser light is polarized along the horizontal frame of an image [13]. The fact that the membrane-bound AmB is disassembled from the AmB-Ag structures can also be deduced on the basis of the photoselection analysis. The rationale for such a conclusion is that AmB molecules assembled randomly with the surface of silver nanoparticles would give rise to fluorescence intensity distributed homogeneously around the lipid vesicle cross-section, unlike those observed in the image recorded (see Figures 3 and S4). The mechanism according to which AmB-Ag nanoparticles work as a vehicle for delivering molecules of the antibiotic to various destinations within a cell can also be deduced based on the Raman scattering spectroscopy and imaging. Figure 4 presents the results of a micro-spectroscopic Raman analysis of a single *C. albicans* cell exposed to AmB-Ag. As can be seen, the resonance Raman spectrum of AmB recorded in the region of the cell membrane and in the intracellular environment are very similar to each other but different from the spectra recorded in the extracellular environment containing AmB-Ag hybrid nanoparticles. The comparison of the resonance Raman spectra of AmB unbound to metal and present in the form of nanoparticles (Figure S3) leads to the conclusion that, at last, a fraction of molecules of the antibiotic delivered to the cell are disassembled from the complex and bound directly to the structures of cells.

Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes

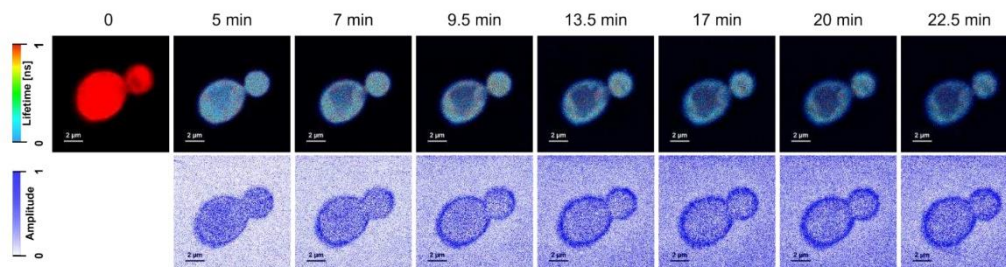


Figure 1. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy images of *C. albicans* cells before (left, 0 min) and after (time in minutes indicated) exposition to AmB-Ag nanoparticles. The upper panels present images based on fluorescence lifetime; below, the same cells are shown imaged with the based on an amplitude of the short-lifetime fluorescence component (<300 ps) assigned to AmB.

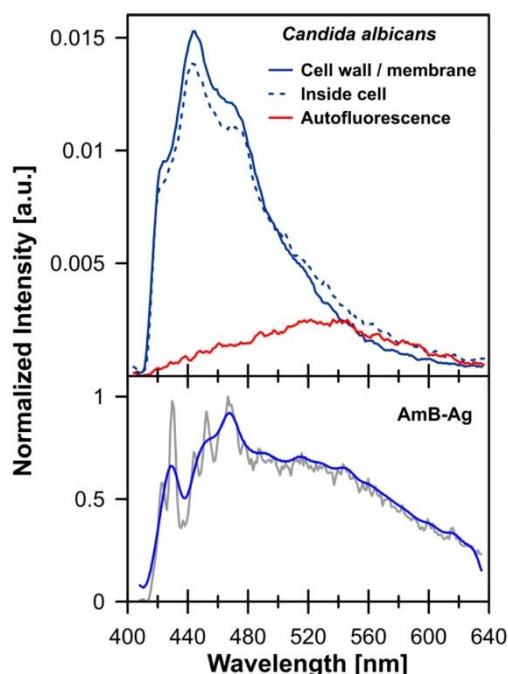


Figure 2. Fluorescence emission spectra recorded from individual areas of the *C. albicans* cell (cell wall/membrane: solid blue line and inside cell area: dotted blue line) and autofluorescence signal: solid red line (upper panel). Spectra of amphotericin B were normalized by the area under the curve, and the autofluorescence emission spectrum was normalized in the region where there is no amphotericin B emission: around 620 nm. In the lower panel, fluorescence emission spectra of AmB-Ag nanoparticles are shown: raw spectrum (solid blue line) and smoothed spectrum (solid gray line). The relatively low signal-to-noise ratio observed in the case of the AmB-Ag sample represents the fact of highly effective fluorescence quenching by the metal surface of a nanoparticle.

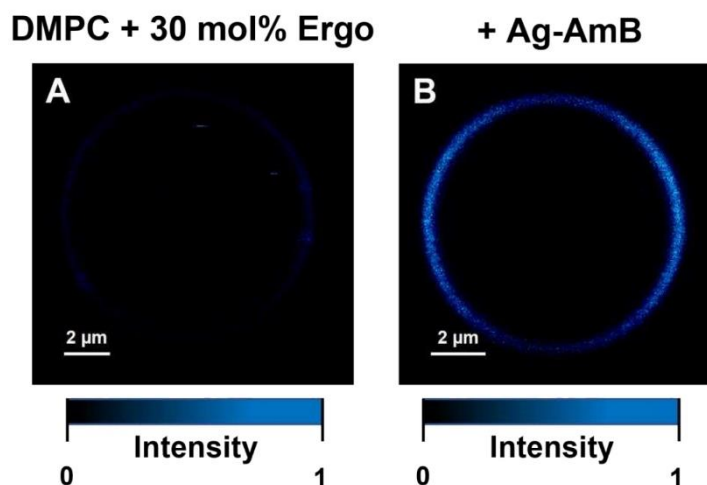


Figure 3. Results of microscopic imaging of single-lipid vesicles composed of DMPC with 30 mol% Ergo (left panel) and with the addition of amphotericin B (right panel). The images are based on fluorescence intensity. The images represent an equatorial vesicle cross-section in the focal plane of the microscope. Maximum fluorescence emission intensities (displayed in blue) on the left and right sides of the liposome represent the fraction of AmB molecules incorporated perpendicular to the membrane plane (vertical orientation).

As can be seen from the analysis of the fluorescence images of *C. albicans* recorded after different time periods, AmB penetrates the cell almost instantly and binds to the cell membrane (Figure 1). On the other hand, a more detailed analysis of the FLIM images leads to the conclusion that a certain fraction of the antibiotic molecules binds to the cell wall, either in the form of AmB-Ag, or more likely detached from a metal nucleus. This can be deduced from the fact that the fluorescence intensity of the peripheral regions of the cell is both relatively high (not quenched by silver) and equally high, without heterogenic distribution characteristic to the AmB molecules incorporated into lipid bilayers (Figures 3 and S4). Further, a detailed analysis of the distribution of fluorescence of AmB reveals that the prolonged incubation of each *C. albicans* cell (the timescale of minutes) results in the disintegration of the cell, manifested by the release of the intracellular matter labeled with the fluorescing molecules of the drug (visible as blue-colored matter in the extracellular environment). This is a clear and straightforward demonstration of the disintegrative activity of AmB, with respect to fungal cells. The association of AmB with nanoparticles made it possible to effectively deliver the antibiotic molecules into the fungal cell structures, passing the cell wall barrier shown to defend fungi against antibiotic activity [14]. This property of the hybrid nanoparticle system is most probably responsible for the exceptionally high antifungal activity of AmB-Ag [10] (see also Figure S5). Importantly, the application of this system unveiled that one of the key modes of the biological activity of AmB toward the cells of fungi is the disintegration of cell membranes and intracellular structures, based most probably on the destabilizing effect of amphiphilic molecules of this antibiotic with respect to the well-organized structure of the lipid bilayer. As demonstrated experimentally, AmB efficiently incorporates into lipid membranes that are rich in sterols (in particular ergosterol, a sterol of fungal cells) [15] and adopts a vertical orientation, with respect to the membrane plane [13]. Minimizing the energy of the system leads to the formation of aggregated AmB structures in which the polyol fragment of the antibiotic molecule is isolated from the hydrophobic core of the membrane, and the polyene fragment is exposed

to it [4,16]. On the other hand, even the separation of intramembrane AmB structures from the lipid phase has a pronounced effect on the structural and dynamic properties of lipid bilayers [17,18]. It is also possible that membrane-bound AmB localizes to the protein-lipid interface and interferes with the functional organization of biomembranes.

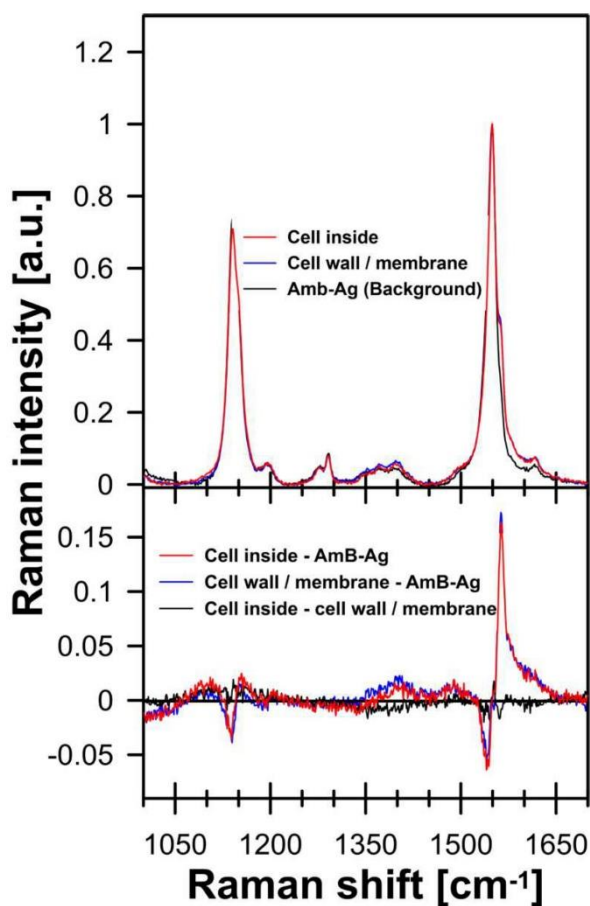


Figure 4. Raman spectra of AmB recorded with the application of a microscopic system from different compartments of *C. albicans* cell. Spectra were recorded with 458 nm laser line. Laser excitation and detection of the Raman scattering signal were focused inside the cell (red line), outside the cell (black line), and in the cell wall/cell membrane region (blue line). The lower panel shows the difference spectra calculated based on the original spectra displayed in the upper panel (see the legend).

The results of the experiments in this work indicate a strong biological activity of AmB consisting of the disintegration of biomembranes, which, together with other modes of action of this antibiotic, leads to the death of fungal cells (see the scheme in Figure 5).

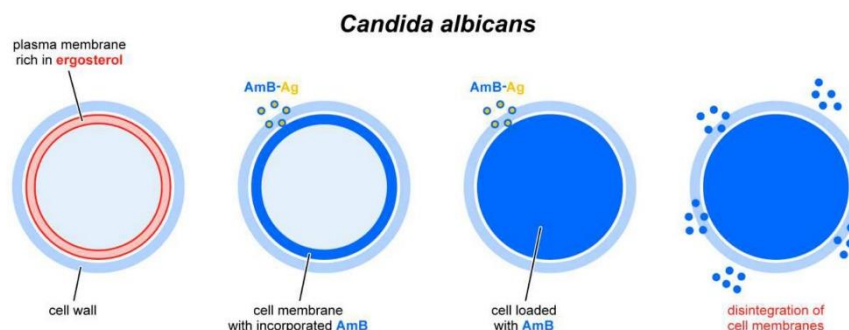


Figure 5. Schematic drawing showing the successive stages of interaction of AmB-Ag nanoparticles with a cell: crossing the cell wall barrier and integration with the cell membrane, penetration into the cytoplasm, disintegration of the cell membrane, and outflow of cell content to the external environment.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Amphotericin B (AmB), ergosterol (Ergo), tricine, and phosphate-buffered saline (PBS) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Silver nitrate (AgNO_3) was acquired from STANLAB (Lublin, Poland). Potassium hydroxide (KOH), potassium chloride (KCl), 2-propanol, ethanol, and chloroform were purchased from POCH (Gliwice, Poland). 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) was obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Water used in experiments was purified by a Milli-Q Millipore system (Merck, Darmstadt, Germany).

3.2. Microorganism Cultivation

The yeast *Candida albicans* (wild-type; kindly gifted by Prof. A. Kędzia, Department of Oral Microbiology, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland) was cultivated in a YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 37 °C. In the experiments, yeast in the logarithmic phase of growth was used.

3.3. Viability Assay

The *C. albicans* survival rate after the treatment with AmB and AmB-Ag was determined using a colony-counting assay, as described before [19]. In brief, the log-phase intact *C. albicans* cells (40 μL ; OD600 = 0.3; approx. 1×10^3 CFU) suspended in PBS were incubated with different concentrations of AmB or AmB-Ag (0.016–16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 0.5 h at 37 °C. Control cells were incubated with 2-propanol:water 4:6 in the same conditions. After incubation, the serial dilutions were prepared and the cells were plated onto a solid YPD medium. Colonies were counted after 24 h of incubation at 37 °C. The results were calculated from three independent experiments performed in triplicate.

3.4. Nanoparticles Synthesis

Amphotericin B-silver hybrid nanoparticles (AmB-Ag) were synthesized according to the original procedure developed in our laboratory and described in detail in an earlier publication [10]. In the synthesis, amphotericin B acts as both a reducing agent and a stabilizing/capping agent. Thanks to alkaline synthesis, aggregation of the resulting nanoparticles was avoided. As a result, the AmB-Ag nanoparticles were monodisperse (PDI = 0.05) and had a diameter of ~7 nm, according to the results of imaging electron microscopy, dynamic light scattering, and molecular spectroscopy measurements [10]. According to the original protocol, nanoparticles were prepared with a molar ratio (AmB:Ag) of 1:11 and an antibiotic concentration of 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ determined spectrophotometrically based on the extinction coefficient $1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in an 2-propanol:water (4:6) solvent mixture.

3.5. Giant Unilamellar Vesicles (GUV) Formation

Liposomes were formed of the DMPC lipid with ergosterol at 30 mol% (with respect to lipid) by the electroformation technique as in detail described previously [20]. Lipids suspended in ethanol and chloroform were placed on two platinum electrodes. Solvents were evaporated in a vacuum for an hour. Next, electrodes were placed in the cuvette with a buffer (20 mM Tricine, 10 mM KCl, pH 7.6) for two hours of electroformation at 30 °C with an applied AC sinusoidal field (10 Hz, 3 V).

3.6. Raman Spectroscopy and Imaging

Raman spectroscopy was carried out using an inVia confocal Raman microscope (Renishaw, Kingswood, UK) with an argon laser (Stellar-REN, Modu-Laser™, Centerville, UT, USA) operating at 457 nm (set at 47 μ W power at the sample), equipped with a 60 \times water-immersed objective (Olympus Plan Apo NA = 1.2). Optical images of AmB-Ag containing GUV and *C. albicans* fungal cells were obtained and analyzed with WiRE 5.5 software (Renishaw, Kingswood, UK). Based on such images, areas of approximately 10 μ m \times 10 μ m for Raman scanning were selected and mapped with 1 μ m spatial resolution. For this study, all the images were recorded with light intensity as low as possible. Raman images were acquired using the Renishaw WiRE 5.5 system in high-resolution mapping mode (HR maps). At each point of the Raman image map, the spectra were recorded with about 1 cm^{-1} spectral resolution (2400 lines/mm grating) in Raman shift spectral region 1000–2500 cm^{-1} using an EMCCD detection camera Newton 970 from Andor, Belfast, UK. The acquisition time for a single spectrum was 0.5 s for GUV and 1.0 s for *C. albicans*. All spectra were pre-processed by cosmic ray removal, noise filtering, and baseline correction using WiRE 5.5 software from Renishaw, Kingswood, UK.

3.7. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)

For analysis, 40 μ L of GUV or *C. albicans* suspension was mixed with 10 μ L AmB-Ag nanoparticles and imaged with the FLIM technique. Data were recorded on a MicroTime 200 confocal system (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) coupled with an inverted microscope (Olympus IX71, Shinjuku City, Tokyo, Japan). Silicon-immersed objective (Olympus NA = 1.3, 60 \times) was used during the measurements. The samples were excited with a 405 nm laser with a 10 MHz repetition rate. The observations were carried out with a 50 μ m diameter pinhole, ZT 405RDC dichroic filter, and 405 nm pass filter (Chroma-AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany). Fluorescence emission spectra were recorded with spectrograph Shamrock 163 connected to the microscopy system. Newton EMCCD DU970P BUF camera (Andor Technology, Belfast, UK) cooled to -50 °C was applied in these measurements. Fluorescence lifetimes and intensities were analyzed using SymPho-Time 64 v. 2.6 software (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany).

4. Conclusions

In this work, it was shown that the biological activity of amphotericin B, a popular antifungal antibiotic, significantly increases when the drug is in the form of hybrid silver nanoparticles. The experimental results show that AmB-Ag can effectively cross the cell wall barrier and deliver antibiotic molecules to cell membranes. Analysis of the molecular imaging data shows that AmB incorporated into the cell membrane induces membrane breakdown within minutes. Such a result clearly shows that the disintegration of fungal cell membranes is one of the main mechanisms operating at the molecular level and responsible for the biological activity of Amphotericin B.

Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28124687/s1>, Figure S1: Chemical structure of amphotericin B and schematic drawing of a AmB-Ag nanoparticle; Figure S2: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy images of *C. albicans* cells exposed to AmB-Ag; Figure S3: Raman spectra of AmB: recorded directly after the purification and in the form of hybrid AmB-Ag nanoparticles; Figure S4: Results of microscopic imaging of single-lipid vesicles composed of DMPC with 30 mol % Ergo with addition amphotericin B; Figure S5: Comparison of the results of *C. albicans* cell viability tests cultured in the presence of AmB and AmB-Ag nanoparticles.

Author Contributions: Conceptualization, W.I.G., W.G. and R.L.; methodology, W.G., R.L. and W.I.G.; formal analysis, W.G., R.L. and W.I.G.; investigation, S.J., E.G., S.S., A.Z.-B., W.G. and R.L.; data curation, W.G., E.G. and R.L.; writing—original draft preparation, W.I.G.; writing—review and editing, W.G., R.L., A.Z.-B. and E.G.; visualization, S.J., W.G., E.G. and R.L.; supervision, W.I.G., W.G. and R.L.; project administration, W.I.G.; funding acquisition, W.I.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by The National Science Center of Poland (NCN) within the project no. 2019/33/B/NZ7/00902.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank Sebastian Gilewski for his help in preparing some of the graphics.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Not applicable.

References

1. Oura, M.; Sternberg, T.H.; Wright, E.T. A New Antifungal Antibiotic, Amphotericin B. *Antibiot. Annu.* **1955**, *3*, 566–573. [PubMed]
2. Cavassin, F.B.; Baú-Carneiro, J.L.; Vilas-Boas, R.R.; Queiroz-Telles, F. Sixty Years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. *Infect. Dis. Ther.* **2021**, *10*, 115–147. [CrossRef] [PubMed]
3. Carolus, H.; Pierson, S.; Lagrou, K.; Van Dijck, P. Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. *JoF* **2020**, *6*, 321. [CrossRef] [PubMed]
4. Zielińska, J.; Wieczór, M.; Chodnicki, P.; Grela, E.; Luchowski, R.; Nierzwicki, Ł.; Bączek, T.; Gruszecki, W.I.; Czub, J. Self-Assembly, Stability and Conductance of Amphotericin B Channels: Bridging the Gap between Structure and Function. *Nanoscale* **2021**, *13*, 3686–3697. [CrossRef] [PubMed]
5. Umegawa, Y.; Yamamoto, T.; Dixit, M.; Funahashi, K.; Seo, S.; Nakagawa, Y.; Suzuki, T.; Matsuoka, S.; Tsuchikawa, H.; Hanashima, S.; et al. Amphotericin B Assembles into Seven-Molecule Ion Channels: An NMR and Molecular Dynamics Study. *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabo2658. [CrossRef] [PubMed]
6. De Kruijff, B.; Demel, R.A. Polyene Antibiotic-Sterol Interactions in Membranes of *Acholeplasma Laidlawii* Cells and Lecithin Liposomes. III. Molecular Structure of the Polyene Antibiotic-Cholesterol Complexes. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* **1974**, *339*, 57–70. [CrossRef] [PubMed]
7. Ermishkin, L.N.; Kasumov, K.M.; Potzeluyev, V.M. Single Ionic Channels Induced in Lipid Bilayers by Polyene Antibiotics Amphotericin B and Nystatin. *Nature* **1976**, *262*, 698–699. [CrossRef] [PubMed]
8. Anderson, T.M.; Clay, M.C.; Cioffi, A.G.; Diaz, K.A.; Hisao, G.S.; Tuttle, M.D.; Nieuwkoop, A.J.; Comellas, G.; Maryum, N.; Wang, S.; et al. Amphotericin Forms an Extramembranous and Fungicidal Sterol Sponge. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 400–406. [CrossRef] [PubMed]
9. Cuddihy, G.; Wasan, E.; Di, Y.; Wasan, K. The Development of Oral Amphotericin B to Treat Systemic Fungal and Parasitic Infections: Has the Myth Been Finally Realized? *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 99. [CrossRef] [PubMed]
10. Tutaj, K.; Szlajak, R.; Szalapatka, K.; Starzyk, J.; Luchowski, R.; Grudzinski, W.; Osinska-Jaroszuk, M.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Szuster-Ciesielska, A.; Gruszecki, W.I. Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles: Synthesis, Properties and Antifungal Activity. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12*, 1095–1103. [CrossRef] [PubMed]
11. Anwar, A.; Siddiqui, R.; Shah, M.; Khan, N. Gold Nanoparticles Conjugation Enhances Anticandida Properties of Nystatin, Fluconazole and Amphotericin B. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *29*, 171–177. [CrossRef] [PubMed]
12. Grela, E.; Stączek, S.; Nowak, M.; Pawlikowska-Pawlega, B.; Zdybicka-Barabas, A.; Janik, S.; Cyttryńska, M.; Grudzinski, W.; Gruszecki, W.I.; Luchowski, R. Enhanced Antifungal Activity of Amphotericin B Bound to Albumin: A “Trojan Horse” Effect of the Protein. *J. Phys. Chem. B* **2023**, *127*, 3632–3640. [CrossRef] [PubMed]

Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes

13. Grela, E.; Wieczór, M.; Luchowski, R.; Zielinska, J.; Barzycka, A.; Grudzinski, W.; Nowak, K.; Tarkowski, P.; Czub, J.; Gruszecki, W.I. Mechanism of Binding of Antifungal Antibiotic Amphotericin B to Lipid Membranes: An Insight from Combined Single-Membrane Imaging, Microspectroscopy, and Molecular Dynamics. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 4202–4213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Grela, E.; Zdybicka-Barabas, A.; Pawlikowska-Pawlega, B.; Cytrynska, M.; Włodarczyk, M.; Grudzinski, W.; Luchowski, R.; Gruszecki, W.I. Modes of the Antibiotic Activity of Amphotericin B against *Candida Albicans*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Neumann, A.; Wieczor, M.; Zielinska, J.; Baginski, M.; Czub, J. Membrane Sterols Modulate the Binding Mode of Amphotericin B without Affecting Its Affinity for a Lipid Bilayer. *Langmuir* **2016**, *32*, 3452–3461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Starzyk, J.; Gruszecki, M.; Tutaj, K.; Luchowski, R.; Szlajak, R.; Wasko, P.; Grudzinski, W.; Czub, J.; Gruszecki, W.I. Self-Association of Amphotericin B: Spontaneous Formation of Molecular Structures Responsible for the Toxic Side Effects of the Antibiotic. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 13821–13832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Fournier, I.; Barwicz, J.; Tancrede, P. The Structuring Effects of Amphotericin B on Pure and Ergosterol- or Cholesterol-Containing Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers: A Differential Scanning Calorimetry Study. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* **1998**, *1373*, 76–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Hereć, M.; Islamov, A.; Kuklin, A.; Gagoś, M.; Gruszecki, W.I. Effect of Antibiotic Amphotericin B on Structural and Dynamic Properties of Lipid Membranes Formed with Egg Yolk Phosphatidylcholine. *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *147*, 78–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sowa-Jasiłek, A.; Zdybicka-Barabas, A.; Stączek, S.; Wydrych, J.; Skrzypiec, K.; Mak, P.; Deryło, K.; Tchórzewski, M.; Cytryńska, M. *Galleria Mellonella* Lysozyme Induces Apoptotic Changes in *Candida Albicans* Cells. *Microbiol. Res.* **2016**, *193*, 121–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Grudzinski, W.; Sagan, J.; Welc, R.; Luchowski, R.; Gruszecki, W.I. Molecular Organization, Localization and Orientation of Antifungal Antibiotic Amphotericin B in a Single Lipid Bilayer. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes

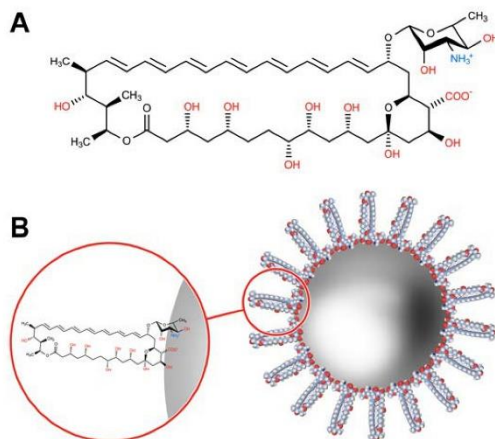


Figure S1. Chemical structure of amphotericin B (panel A) and schematic drawing of the AmB-Ag nanoparticle (panel B).

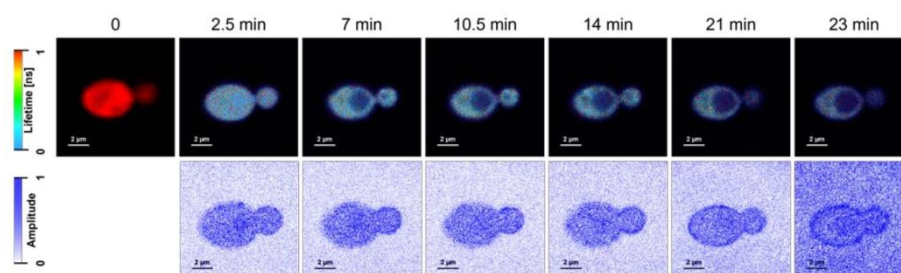


Figure S2. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy images of *C. albicans* cells before (left, 0 min) and after (time in minutes indicated) exposition to AmB-Ag nanoparticles. The upper panels present images based on fluorescence lifetime, below, the same cells are shown imaged based on an amplitude of the short-lifetime fluorescence component (< 300 ps) assigned to AmB. Note the increase of the AmB concentration in the extracellular environment after prolonged incubation. This effect is diagnostic for the disintegration of the cell membrane.

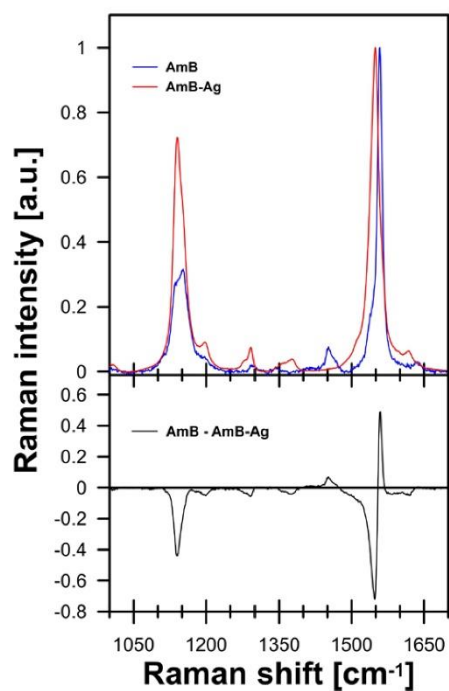


Figure S3. Raman spectra of AmB: recorded directly after the purification with HPLC (blue line) and in the form of hybrid AmB-Ag nanoparticles (red line). Spectra recorded with a 458 nm laser line. The lower panel shows a difference spectrum calculated based on the original spectra displayed in the upper panel.

DMPC + 30 mol% Ergo + Ag-AmB

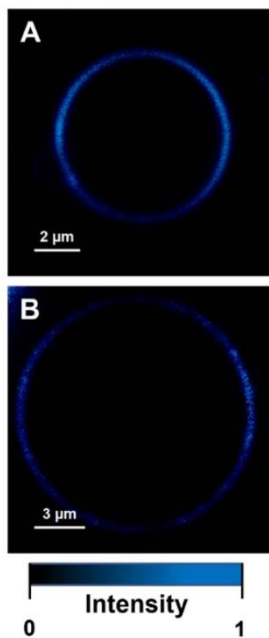


Figure S4. Results of microscopic imaging of a single lipid vesicles composed of DMPC with 30 mol % Ergo with addition amphotericin B. The images are based on fluorescence intensity. The images represent an equatorial vesicle cross-section in the focal plane of the microscope. Maximum fluorescence emission intensities (displayed in blue) on the left and right sides of the liposomes represent the fraction of AmB molecules incorporated perpendicular to the membrane plane (vertical orientation).

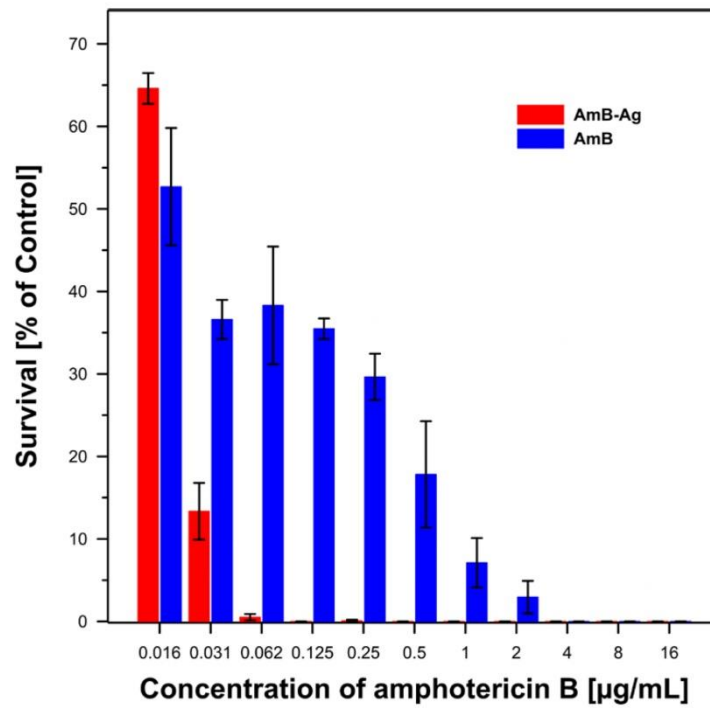
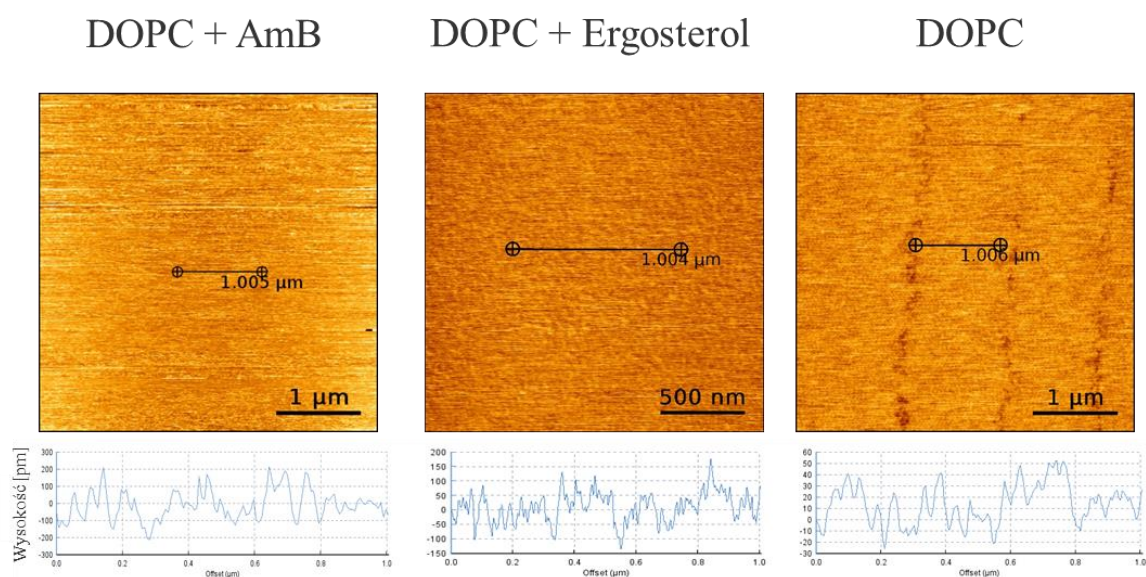


Figure S5. Comparison of the results of *C. albicans* cell viability tests cultured in the presence of AmB and AmB-Ag nanoparticles. Results represent the arithmetic mean \pm SD of three independent experiments performed with three replicates for each sample type.

5 How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

Niniejszy artykuł przedstawia wyniki badań mających na celu wyjaśnienie, w jaki sposób cząsteczki AmB wnikają do błon lipidowych oraz jakie zmiany wywołują w ich strukturze. W tym celu, do analizy monowarstw lipidowych zawierających ergosterol zastosowano innowacyjne podejście, łączące różne techniki obrazowania, w tym mikroskopię sił atomowych i mikroskopię fluorescencyjną z rozdzielczością czasową. Badania te mają kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia złożonych mechanizmów działania przeciwgrzybiczego AmB, co może przyczynić się do opracowania skuteczniejszych i bezpieczniejszych formułacji tego leku w przyszłości. Artykuł rzuca nowe światło na interakcje AmB z błonami lipidowymi, ujawniając wielorakie efekty strukturalne, które mogą leżeć u podstaw jego aktywności farmakologicznej.

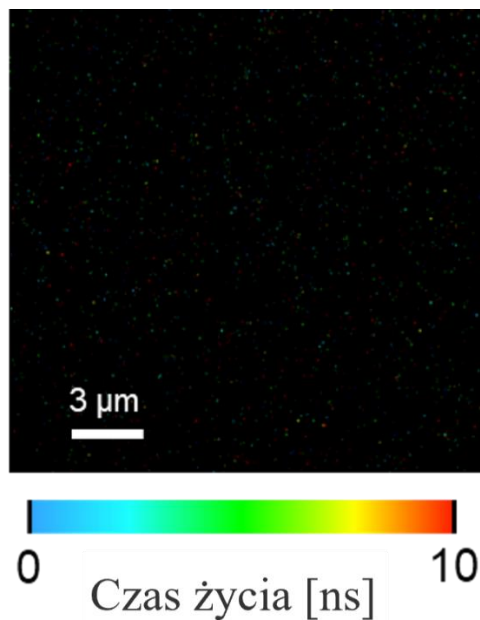
W tym artykule przedstawiłem wyniki badań mechanizmów, dzięki którym amfoterycyna B oddziałuje z błonami lipidowymi, szczególnie tymi zawierającymi ergosterol, kluczowy składnik błon komórkowych grzybów. Pierwszym etapem było scharakteryzowanie układów kontrolnych dla czystej monowarstwy z DOPC (ang. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), ergosterolu oraz AmB za pomocą techniki AFM [Ryc. 16].



Ryc. 16 Obrazy AFM dla układów kontrolnych wykazują brak oddziaływań lipid-AmB.

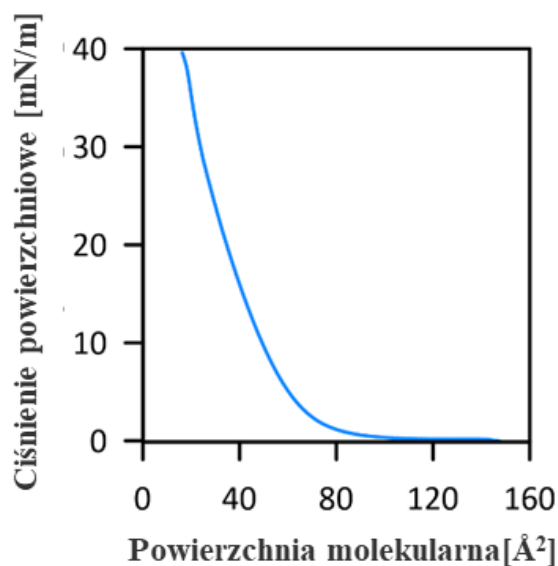
How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

Wyniki obrazowania FLIM również nie wykazywały sygnału w przypadku kontroli złożonej z DOPC+AmB [Ryc. 17].



Ryc. 17 Układ kontrolnej monowarstwy DOPC+AmB w skali czasów życia fluorescencji.

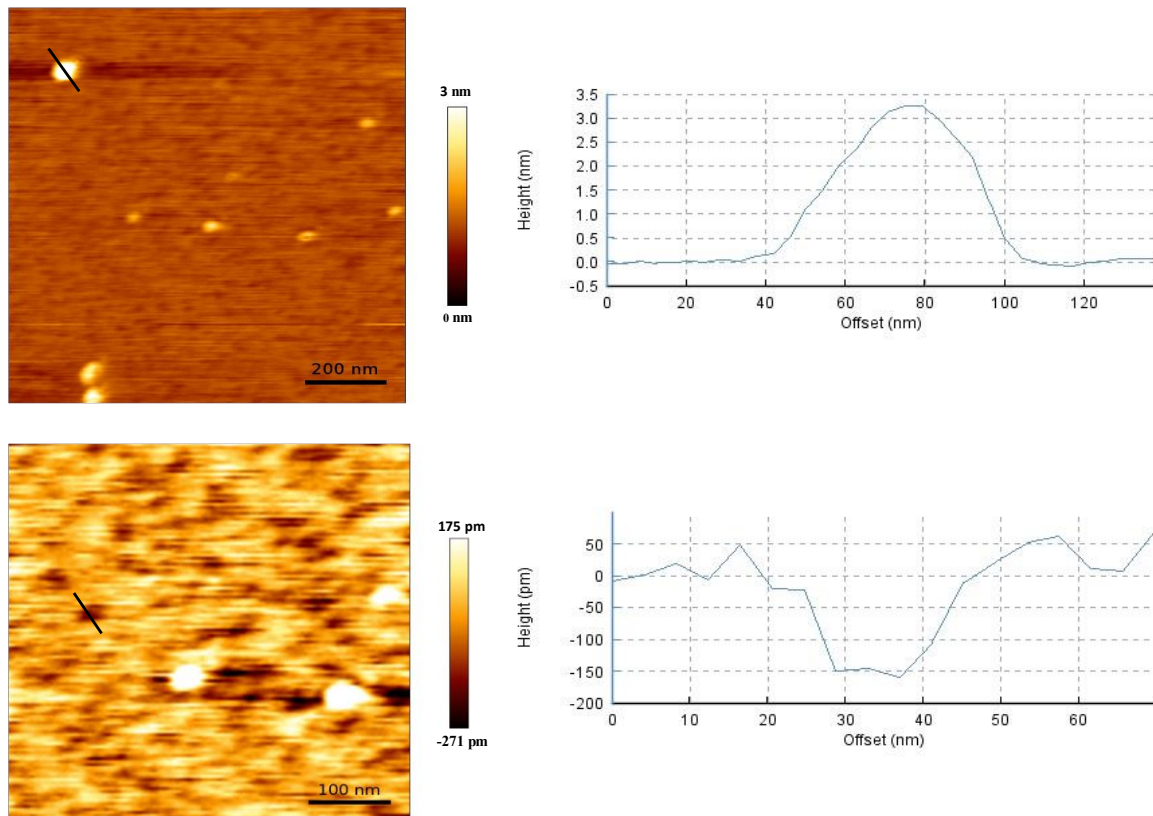
Wszystkie monowarstwy zostały nałożone na podłoże stałe przy ciśnieniu 25 [mN/m] które przyjmuje się za odpowiednik ciśnienia naturalnej błony biologicznej [Ryc. 18].



Ryc. 18 Przebieg izotermy dla mieszaniny DOPC-Ergo w proporcjach 7/3.

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

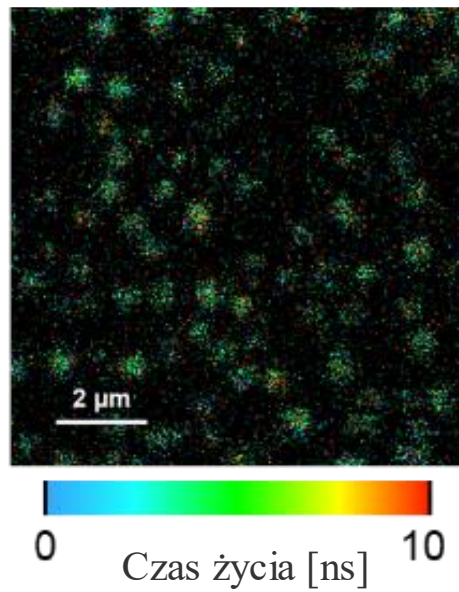
Monowarstwy złożone z DOPC i ergosterolu wykorzystałem jako model błon lipidowych grzybów. Wnikanie AmB do tych błon zachodzi tylko w obecności ergosterolu. Mikroskopia sił atomowych (AFM) i mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) ujawniły tworzenie wewnętrznych klastrów oraz stosunkowo dużych porów błonowych (~15 nm średnicy) [Ryc. 19].



Ryc. 19 Topograficzny obraz AFM monowarstwy złożonej z DOPC i Ergo (7:3) wystawionej na działanie AmB pokazujący klastry (powyżej) i pory (poniżej).

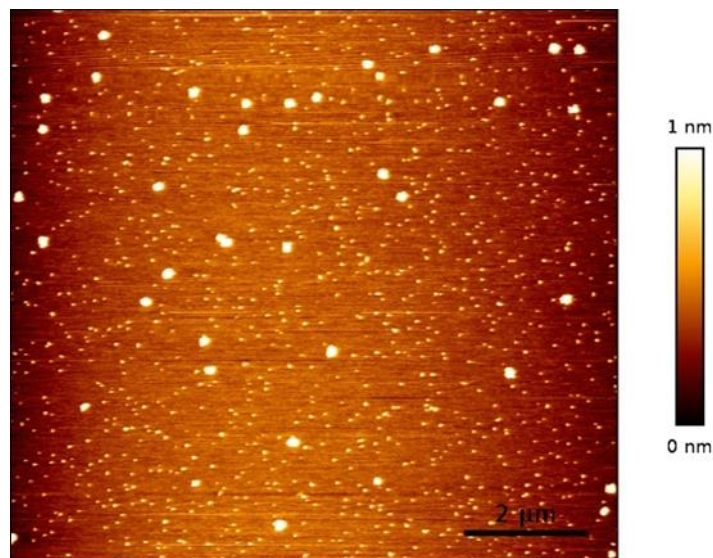
Wyniki moich badań wykazały wiele sposobów działania AmB, w tym destabilizację struktury błon i tworzenie porów transbłonowych działających jako pasywne kanały jonowe. Zastosowanie AFM zapewniło wysoką rozdzielczość przestrzenną, podczas gdy FLIM oferowało czułość na organizację molekularną. Na obrazach FLIM widoczne były struktury w obrębie fazy lipidowej tworzone przez AmB, co sugeruje obecność dimerów i małych agregatów molekularnych [Ryc. 20].

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?



Ryc. 20 Obraz FLIM filmu pojedynczej warstwy złożonej z DOPC i Ergo (7:3) wystawionej na działanie AmB.

Za pomocą obrazowania AFM wykazałem, że monowarstwy lipidowe bogate w ergosterol tworzą odrębne klastry po dłuższym okresie inkubacji w obecności AmB [Ryc. 21].



Ryc. 21 Obraz topograficzny AFM bogatej w ergosterol monowarstwy lipidowej tworzącej wyraźne klastry po dłuższej inkubacji w obecności AmB.

AmB nie występuje jako monomer w błonie, lecz formuje dimery i większe agregaty. Obecność ergosterolu jest kluczowa dla penetracji i tworzenia struktur wielocząsteczkowych przez AmB w błonach lipidowych. Złożona organizacja molekularna AmB znacząco wpływa na właściwości strukturalne i funkcjonalność błon biologicznych. Tworzenie klastrów i porów przez AmB może prowadzić do niekontrolowanego transportu jonów,

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

co wpływa na fizjologię komórek. Wyniki moich badań wyjaśniają wieloaspektowe mechanizmy, dzięki którym AmB oddziałuje z błonami lipidowymi grzybów. Wskazują także na rolę ergosterolu w ułatwieniu wnikania AmB do wnętrza komórki oraz wynikających z tego zmian strukturalnych w błonie, które są kluczowe dla jej efektów farmakologicznych. Odkrycia te mają istotne znaczenie dla przyszłego projektowania formułacji AmB z ograniczonymi efektami ubocznymi.



How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

Sebastian Janik, Rafal Luchowski, Ewa Grela, Wojciech Grudzinski, and Wieslaw I. Gruszecki*

Cite This: *J. Phys. Chem. Lett.* 2024, 15, 4823–4827

Read Online

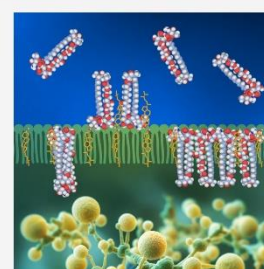
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Amphotericin B is a popular antifungal antibiotic, but the exact way it works is still a matter of debate. Here, we used monolayers composed of phosphatidylcholine with ergosterol as a model of fungal lipid membranes to study drug incorporation from the aqueous phase and analyze the molecular reorganization of membranes underlying the biological activity of the antibiotic. The results show that the internalization of antibiotic molecules into membranes occurs only in the presence of ergosterol in the lipid phase. Comparison of images of solid-supported monolayers obtained by atomic force microscopy and lifetime imaging fluorescence microscopy shows the formation of intramembrane clusters of various sizes in the lipid phase, consisting mainly of antibiotic dimers and relatively large membrane pores (~15 nm in diameter). The results reveal multiple modes of action of amphotericin B, acting simultaneously, each of which adversely affects the structural properties of the lipid membranes and their physiological functionality.



Amphotericin B (AmB) belongs to a class of polyene macrolide antibiotics and is used to treat deep-seated, life-threatening fungal infections^{1,2} (see [Supplementary Figure S1](#) for a chemical structure). Paradoxically, despite several decades of medical use of AmB and its high effectiveness,³ the exact modes of its biological activity are still a matter of debate.^{4,5} Among the main mechanisms discussed is the destabilization of a structure of biomembranes, induced by the presence of the drug molecules in the lipid phase^{6,7} or as a consequence of the sequestration of sterols associated with the formation of extramembraneous sterol-AmB bulk structures referred to as “sponges”.^{8,9} One of the consequences of the destabilization of the membrane structure would be the uncontrolled leakage of physiologically important ions through the biomembranes, disturbing the electrostatics of living cells. Another important mechanism underlying the antibiotic action of AmB is the formation of transmembrane pores that act as passive ion channels uncontrolled by any regulatory activity,¹⁰ thus also having a decidedly negative impact on physiological ion transport. Currently, there are two models of barrel-stave-like transmembrane ion channels formed by AmB molecules in the lipid phase: one composed of a single-length complex¹¹ and the other consisting of a double-length channel formed by two stacked single-length structures, each present in a single leaflet of the lipid bilayer.¹² In the opinion of many researchers, the results of the experiments supporting all of the individual modes of action of AmB concerning lipid membranes are convincing, thus making it difficult to sort out which molecular mechanism applies to the pharmacological effect of this antibiotic. In the present work, we designed experiments in combination with various imaging techniques to further

address this interesting issue, important from the point of view of designing future formulations of this drug that are characterized by minimized toxic side effects for patients. We used a model system of monomolecular layers formed at the air–water interface with dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and ergosterol (Ergo), the main sterol of fungal cells, to study the incorporation of drug molecules into the membrane from the water phase.¹³ Monolayers deposited on a solid support were then subjected to functional imaging. The main advantage of using atomic force microscopy (AFM) was the very high spatial resolution of this technique, while the use of fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) was advantageous due to the sensitivity of fluorescence lifetime parameters to the molecular organization of AmB.¹⁴ The use of various imaging techniques in studying the interactions of pharmacologically active molecules with membranes has proven to be highly effective in understanding the mechanisms of their biological activity.^{15–17} Surprisingly, the results obtained in this study demonstrate multiple modes of action of AmB on lipid membranes, all of which may account for the pharmacological effectiveness of this popular antibiotic.

Figure 1 presents a FLIM image of a film deposited from the single DOPC-Ergo monolayer formed at the air–water interface and exposed to AmB that was introduced into the

Received: February 16, 2024

Revised: March 29, 2024

Accepted: April 22, 2024

Published: April 26, 2024



How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

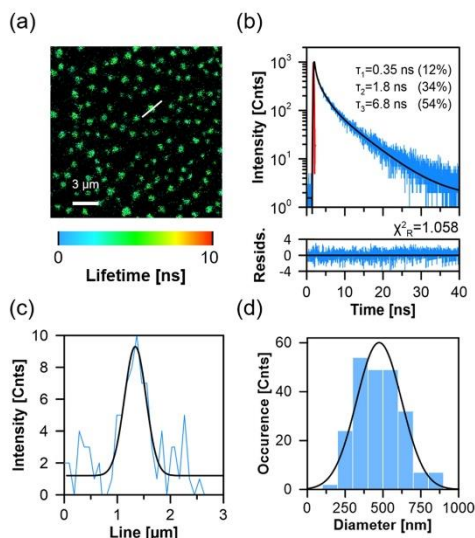


Figure 1. FLIM image and analysis of the film deposited on the monomolecular layer composed of DOPC and Ergo (7:3) exposed to AmB. (a) FLIM image, (b) fluorescence lifetime analysis based on all the photons detected during the imaging (IRF plotted in red), (c) cross-section analysis along the structure marked in panel (a) with white line, and (d) analysis of diameters of the fluorescence-emitting structures visible in panel (a) and another four images and based on the *fwhh* of fits to the signal as shown in panel (c). See the text for more information. The figure shows analyses of the exact same sample that was analyzed using AFM (results shown in Figure 2).

water subphase. The fluorescence signal assigned to AmB shows the incorporation of the drug molecules into the lipid phase.¹⁸ The fluorescence signal of this polyene antibiotic can be effectively detected despite the low concentration in the monolayer system, thanks to the relatively high fluorescence quantum yield of AmB (~4% in the dimeric form¹⁹) and the very high sensitivity of the detection system. The fluorescence emission spectra of AmB incorporated into monolayers are presented in the Supplementary Figure S2. The position of the fluorescence emission band on the wavelength scale suggests that AmB present in the system examined appears mostly in the form of dimers and small molecular aggregates.¹⁴ AmB fluorescence has not been detected in the same experiment carried out under identical conditions, except that Ergo molecules were not present in the lipid monolayer (see Supplementary Figure S3). This result confirms that the presence of sterols, in particular ergosterol, in the system is a prerequisite for the effective penetration of AmB from the aqueous phase into lipid membranes.¹⁸ Detailed analysis of the FLIM image (Figure 1) shows that AmB incorporated in the DOPC-Ergo membrane is not distributed homogeneously but rather self-associates into clusters characterized by dimensions in the range of 250–750 nm. The spatial resolution of the optical microscopic system used enabled the discrimination of structures with a minimum dimension of 226 ± 27 nm (see the Supporting Information for experimental details). It is therefore highly probable that exact dimensions of the smallest

molecular structures formed are significantly lower. The time-resolved fluorescence analysis shows that AmB in the system appears in three molecular organization forms characterized by the fluorescence lifetimes $\tau_1 = 0.35$ ns (12%), $\tau_2 = 1.8$ ns (34%), and $\tau_3 = 6.8$ ns (54%), assigned to small aggregates (e.g., tetramers), parallel dimers, and antiparallel dimers, respectively.¹⁴ Importantly, the amplitudes of the AmB fluorescence lifetime components in the monolayer show that the antibiotic does not exist as a monomer and that dimers are the main forms of molecular organization in this system. This observation suggests that other molecules, including a sterol and possibly also a lipid, are involved in the formation of the relatively large AmB clusters observed, presumably serving as “molecular spacers” protecting against strong excitonic interactions between chromophores. Interestingly, such large structures are not distinguished in the AFM images of multicomponent monolayers (Figure 2). This suggests that

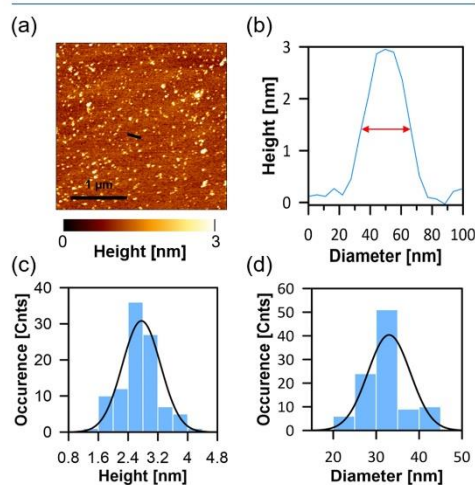


Figure 2. AFM image and analysis of the film deposited on the monomolecular layer composed of DOPC and Ergo (7:3) exposed to AmB. (a) AFM image, (b) cross-section analysis along the black line marked in panel (a), and analysis of height (c) and diameter (d) of the structures appearing as white dots in the image presented in panel (a), according to the methodology presented in panel b. The figure shows analyses of the exact same sample that was analyzed using FLIM (results shown in Figure 1).

some AmB structures separated by a relatively short distance can be resolved using the AFM technique but are recognized as single larger objects by the optical imaging. On the other hand, AFM-based images show the presence of relatively small structures (20–50 nm in diameter) distinctly differing in height above the level of the monolayer (~3 nm, corresponding to the length of a single AmB molecule²⁰). The pillar-like structures visible in the film topography are also distinctly different from the membranes in nanomechanical properties, as can be concluded from the sample imaging based on the AFM phase signal (see Supplementary Figure S4). In principle, such structures can be formed at the water–membrane interface and, thanks to their stability, remain

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

preserved in the process of the deposition of monolayers on a solid support. The fact that such structures are not observed for lipid monolayers exposed to AmB but lacking Ergo (Supplementary Figure S3) suggests that sterol molecules are not only necessary for the internalization of AmB into the membrane but are also involved in the formation of the bulk structures detected using a topography imaging of the samples. More detailed analysis of the AFM images also reveals the appearance of relatively small depressions in the membrane, manifested as black dots (Figure 3). Such structures are typical

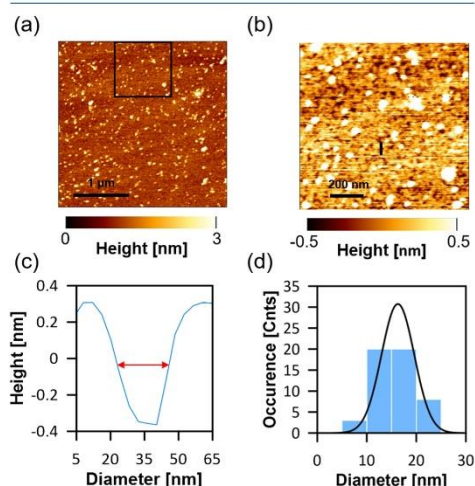


Figure 3. AFM image and analysis of the film deposited from the monomolecular layer composed of DOPC and Ergo (7:3) exposed to AmB. (a) AFM image, (b) detailed analysis of the image marked in panel a with black square, (c) cross-section analysis along the black line marked in panel (b), and (d) analysis of a diameter of the structures appearing as black dots in the image presented in panel (b), according to the methodology presented in panel (c).

for the lipid monolayers containing Ergo and exposed to AmB. The diameters of such structures (~15 nm) are too large to be considered as single ion channels, but certainly, they have the potential to act as pores significantly affecting the membrane structure and disturbing physiological ion transport. Despite the fact that the diameters of pillar-like structures (Figure 2) are larger than those of pore-like structures (Figure 3), it is possible that both types of structures may have the same origin: namely, they are formed in the separation process from membrane clusters rich in AmB and Ergo. The observed differences in diameter can be related both to the molecular dynamics of the multicomponent membrane and the process of relaxation after the emergence of new structures as well as to the different detection of convex structures and cavities using the AFM technique.

The results of the analysis indicate the occurrence of various forms of molecular organization associated with the exposure of the lipid membrane containing Ergo to the action of AmB. First, AmB-related effects are observed only in sterol-containing lipid membranes. Such observations are in agreement with the results of the previous studies showing that

sterols are necessary components of membranes that allow AmB molecules to penetrate into the lipid phase and ensure vertical orientation of the antibiotic molecules, along the axis perpendicular to the membrane plane.^{18,21} In the present study, two essentially different forms of AmB molecular organization in the membrane were observed, important from the standpoint of the structure–function relationship: intra-membrane clusters separated from the lipid phase (20 to 50 nm in diameter) and ~15 nm pores (see Figure 4 for a

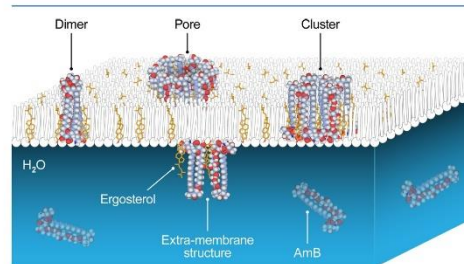


Figure 4. Model illustrating the process of internalization of AmB into the DOPC-Ergo monolayer from the aqueous subphase and the formation of various molecular structures.

visualization). Importantly, AmB does not appear as a monomer but adopts more complex forms with the dimeric suborganization. It is concluded that the membrane components, presumably lipids and sterols, participate in the formation and stabilization of the observed structures. In our opinion, all these forms of molecular organization of AmB significantly influence the structural properties of biomembranes, which are important from a physiological point of view. Membrane phase separation, appearing as AmB-rich clusters, generates interfacial boundaries that may facilitate uncontrolled transmembrane transport of small molecules, including ions. An even greater risk of this process can be expected in the presence of membrane pores. The formation of extramembrane structures also seems to be important from a biological point of view. They likely represent molecular organization forms identified previously as sterol-rich AmB “sponges”. The results of model system studies presented in this work show that the presence of AmB in a lipid membrane containing sterols results in many consequences at the level of molecular organization and structural properties of membranes. Importantly, all of them may impair their biological functionality. This leads to the conclusion that the problem of the molecular basis of the pharmacological action of AmB is complex and is not limited to only one mechanism. Although the present study has revealed several effects of AmB on membranes, we are aware that due to the specificity of the techniques used and their resolution, several other potential mechanisms may not have been observed, e.g., the formation of very small ion channels. Apparently, the relatively complex and specific molecular structure of AmB itself modulates a whole series of interactions in the membrane environment, causing its significant reorganization, which manifests itself in many different ways depending on the research technique used.

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpclett.4c00496>.

Experimental details, chemical structure of amphotericin B, fluorescence emission spectrum of AmB incorporated into the lipid monolayer, AFM image based on the phase signal, AFM and FLIM images of the DOPC monolayers of compression Ergo and exposed to AmB, and isotherm of compression of the DOPC-Ergo monomolecular layer (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Wiesław I. Gruszecki – Department of Biophysics, Institute of Physics, Maria Curie-Skłodowska University, 20-031 Lublin, Poland; orcid.org/0000-0002-8245-3913; Email: wieslaw.gruszecki@umcs.pl

Authors

Sebastian Janik – Department of Biophysics, Institute of Physics, Maria Curie-Skłodowska University, 20-031 Lublin, Poland

Rafał Luchowski – Department of Biophysics, Institute of Physics, Maria Curie-Skłodowska University, 20-031 Lublin, Poland; Department of Biophysics, Medical University of Lublin, 20-059 Lublin, Poland; orcid.org/0000-0003-1156-8059

Ewa Grela – Department of Biophysics, Institute of Physics, Maria Curie-Skłodowska University, 20-031 Lublin, Poland; Division of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Faculty of Physics, University of Warsaw, 02-093 Warsaw, Poland; orcid.org/0000-0002-1667-6780

Wojciech Grudzinski – Department of Biophysics, Institute of Physics, Maria Curie-Skłodowska University, 20-031 Lublin, Poland; orcid.org/0000-0002-8825-1423

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpclett.4c00496>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors dedicate this work to the memory of our friend and co-worker Dr. Peter Kernen. The National Science Center of Poland (NCN) is acknowledged for the financial support within the Project 2019/33/B/NZ7/00902.

■ REFERENCES

- (1) Mesa-Arango, A. C.; Scorzoni, L.; Zaragoza, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front. Microbiol.* **2012**, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00286.
- (2) Dismukes, W. E. Antifungal therapy: Lessons learned over the past 27 years. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42* (9), 1289–1296.
- (3) Cavassin, F. B.; Bau-Carneiro, J. L.; Vilas-Boas, R. R.; Queiroz-Telles, F. Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. *Infect. Dis. Ther.* **2021**, *10* (1), 115–147.
- (4) Carolus, H.; Pierson, S.; Lagrou, K.; Van Dijk, P. Amphotericin B and Other Polyenes-Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. *J. Fungi* **2020**, *6* (4), 321.
- (5) Grela, E.; Zdybicka-Barabas, A.; Pawlikowska-Pawlega, B.; Cytryńska, M.; Włodarczyk, M.; Grudzinski, W.; Luchowski, R.

Gruszecki, W. I. Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against *Candida albicans*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17029.

(6) Herec, M.; Islamov, A.; Kuldin, A.; Gagos, M.; Gruszecki, W. I. Effect of antibiotic amphotericin B on structural and dynamic properties of lipid membranes formed with egg yolk phosphatidylcholine. *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *147* (2), 78–86.

(7) Grela, E.; Wieczor, M.; Luchowski, R.; Zielinska, J.; Barzycka, A.; Grudzinski, W.; Nowak, K.; Tarkowski, P.; Czub, J.; Gruszecki, W. I. A mechanism of binding of an antifungal antibiotic amphotericin B to lipid membranes: An insight from combined single membrane imaging, micro-spectroscopy, and molecular dynamics. *Mol. Pharmaceutics* **2018**, *15*, 4202–4213.

(8) Anderson, T. M.; Clay, M. C.; Cioffi, A. G.; Diaz, K. A.; Hisao, G. S.; Tuttle, M. D.; Nieuwkoop, A. J.; Comellas, G.; Maryum, N.; Wang, S.; et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10* (5), 400–406.

(9) Lewandowska, A.; Soutar, C. P.; Greenwood, A. I.; Nimerovsky, E.; De Lio, A. M.; Holler, J. T.; Hisao, G. S.; Khandelwal, A.; Zhang, J. B.; SantaMaria, A. M.; et al. Fungicidal amphotericin B sponges are assemblies of staggered asymmetric homodimers encasing large void volumes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2021**, *28* (12), 972–981.

(10) De Kruijff, B.; Demel, R. A. Polyene antibiotic-sterol interaction in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes; III Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 57–70.

(11) Yamamoto, T.; Umegawa, Y.; Tsuchikawa, H.; Hanashima, S.; Matsumori, N.; Funahashi, K.; Seo, S.; Shinoda, W.; Murata, M. The Amphotericin B-Ergosterol Complex Spans a Lipid Bilayer as a Single-Length Assembly. *Biochemistry* **2019**, *58* (51), 5188–5196.

(12) Zielinska, J.; Wieczor, M.; Chodnicki, P.; Grela, E.; Luchowski, R.; Nierzwicki, L.; Baczek, T.; Gruszecki, W. I.; Czub, J. Self-assembly, stability and conductance of amphotericin B channels: bridging the gap between structure and function. *Nanoscale* **2021**, *13*, 3686.

(13) Gagos, M.; Gabrielska, J.; Dalla Serra, M.; Gruszecki, W. I. Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes: monomolecular layer technique and linear dichroism-FTIR studies. *Mol. Membr. Biol.* **2005**, *22* (5), 433–442.

(14) Starzyk, J.; Gruszecki, M.; Tutaj, K.; Luchowski, R.; Szlazak, R.; Wasko, P.; Grudzinski, W.; Czub, J.; Gruszecki, W. I. Self-association of amphotericin B: spontaneous formation of molecular structures responsible for the toxic side effects of the antibiotic. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 13821–13832.

(15) Mescola, A.; Ragazzini, G.; Facci, P.; Alessandrini, A. The potential of AFM in studying the role of the nanoscale amphiphatic nature of (lipo)-peptides interacting with lipid bilayers. *Nanotechnology* **2022**, *33* (43), 432001.

(16) Datta, R.; Heaster, T. M.; Sharick, J. T.; Gillette, A. A.; Skala, M. C. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. *J. Biomed Opt* **2020**, *25* (7), 071203.

(17) Balleza, D.; Mescola, A.; Alessandrini, A. Model lipid systems and their use to evaluate the phase state of biomembranes, their mechanical properties and the effect of non-conventional antibiotics: the case of daptomycin. *Eur. Biophys. J. Biophys* **2020**, *49* (5), 401–408.

(18) Grudzinski, W.; Sagan, J.; Welc, R.; Luchowski, R.; Gruszecki, W. I. Molecular organization, localization and orientation of antifungal antibiotic amphotericin B in a single lipid bilayer. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32780.

(19) Gruszecki, W. I.; Gagos, M.; Herec, M. Dimers of polyene antibiotic amphotericin B detected by means of fluorescence spectroscopy: molecular organization in solution and in lipid membranes. *J. Photoch. Photobio B* **2003**, *69* (1), 49–57.

(20) Jarzemska, K. N.; Kaminski, D.; Hoser, A. A.; Malinska, M.; Senczyna, B.; Wozniak, K.; Gagos, M. Controlled Crystallization, Structure, and Molecular Properties of Iodoacetyl amphotericin B. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12* (5), 2336–2345.

(21) Dong, P. T.; Zong, C.; Dagher, Z.; Hui, J.; Li, J. J.; Zhan, Y. W.; Zhang, M.; Mansour, M. K.; Cheng, J. X. Polarization-sensitive

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

The Journal of Physical Chemistry Letters

pubs.acs.org/JPCL

Letter

stimulated Raman scattering imaging resolves amphotericin B orientation in membrane. *Sci. Adv.* **2021**, *7* (2), eabd5230.

4827

<https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.4c00496>
J. Phys. Chem. Lett. **2024**, *15*, 4823–4827

Supporting Information

How does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What does it Do There?

Sebastian Janik^a, Rafal Luchowski^{a,b}, Ewa Grela^{a,c}, Wojciech Grudzinski^a, and Wieslaw I. Gruszecki^{a,}*

^a Department of Biophysics, Institute of Physics, Maria Curie-Skłodowska University, 20-031 Lublin, Poland

^b Department of Biophysics, Medical University of Lublin, 20-059 Lublin, Poland

^c Division of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Faculty of Physics, University of Warsaw, 02-093 Warsaw, Poland

* corresponding author: wieslaw.gruszecki@umcs.pl

Experimental Section

Materials

Crystalline amphotericin B (AmB) was purchased from Cayman Chemical (USA). Directly before use, AmB was repurified chromatographically, as described in detail previously.¹ 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) was obtained from Avanti Polar Lipids (USA). Ergosterol was obtained from Merck (Germany). Methanol, 2-propanol and chloroform were purchased from POCH (Poland). Water used in experiments was purified by a Milli-Q Millipore system (Merck, Germany).

Preparation of monomolecular layers

Monomolecular layers were formed using a Teflon trough equipped with movable barriers, an injection port, and a magnetic stirrer. An integrated Langmuir and Langmuir-Blodgett system was purchased from KSV NIMA Instruments (Finland). A Wilhelmy tensiometer with an ashless filter paper (Whatman) as a surface pressure sensor was used to monitor surface pressure. Before starting the main part of the experiment, the DOPC:Ergo (7:3, mol:mol) monolayers were formed at the air-water interface and isotherms of compression were recorded (See Supporting Information Figure S5). A monolayer constituents were deposited at the air-water interface in 50 μl of a DOPC and Ergo solution prepared in a chloroform:methanol (9:1, v/v) solvent mixture. The monolayer compression began after 15 min. necessary for solvent evaporation. The barrier speed was constant at 10 mm/min. To examine the penetration of AmB from the water phase into the lipid monolayers, the films were compressed to 25 mN/m, and this surface pressure was stabilized automatically by the computer-controlled system. AmB was injected into the aqueous subphase, beneath the monomolecular layers, as a solution prepared in water/2-propanol mixture (6:4, v/v). A volume of 100 μl of AmB solution was injected into

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

~300 ml of water subphase. The concentration of AmB solution was adjusted to maintain the 1:1 ratio of molecules of AmB in the subphase and the total number of DOPC and Ergo molecules forming the lipid monolayers. The process of incorporation of AmB into the monolayers was manifested by a computer-controlled decompression of the films to maintain the surface pressure at 25 mN/m. After stabilization of this process (40 min.), the monomolecular layers were transferred to freshly cleaved Mica substrate by means of the Langmuir-Blodgett technique. The same constant surface pressure was automatically maintained by the system, also during the process of deposition of monomolecular films to a solid support. All experiments were performed at 25 °C. Single-component and multicomponent monomolecular layers formed with AmB, lipids, and sterols were characterized in detail in our previous studies.²

Atomic Force Microscopy

The monolayers were deposited on a freshly cleaved Mica surface at room temperature and then transferred to an AFM microscope. AFM scanning was carried out using JPK Nanowizard 3 system (Bruker, USA) in a non-contact mode (AC mode). RFESPA-190 cantilevers (Bruker, USA) with a nominal elastic constant of 35 N/m and a typical tip radius of 8 nm were used. The nominal resonance frequency of the cantilevers (provided by the manufacturer) was 190 kHz and the typical operating resonance frequency was 157.4 kHz. AFM images were scanned at 512×512 or 1024×1024 pixel resolution at 0.8 Hz. To avoid defects and imperfections, a regime of weak tip-sample interaction was applied during scanning by monitoring the tip dithering phase shift. AFM images were processed by subtracting the polynomial fit from each scan line independently then the height images were fed to cross sections using JPKSMP data processing software (Bruker, USA).

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

FLIM measurements

Time-resolved imaging experiments were conducted employing a MicroTime 200 microscope system purchased from PicoQuant (GmbH, Berlin, Germany). The samples were excited with 405 nm solid-state laser (Picoquant) with pulses characterized by a full width at half maximum (FWHM) of less than 90 ps. This wavelength of laser light was chosen to specifically excite the 0-0 vibrational maximum of the main electronic absorption band of AmB. The laser light beam was directed at the sample through an Olympus 60x objective with a numerical aperture of 1.2. The resulting fluorescence emission was collected by the same objective and transmitted to an avalanche photodiode detector (Excelitas Technologies) configured in a confocal mode. The detection efficiency of the detector was up to 70% at 500 nm, with a timing resolution down to <250 ps (FWHM). A pinhole diameter of 50 μm was utilized, and scattered light underwent filtration through a long-wavelength pass filter HQ430lp followed by a dichromatic mirror ZT405RDC, both sourced from AHF Analysentechnik.

The analysis of fluorescence components was executed utilizing SymPhoTime v. 2.8 software (PicoQuantGmbH, Berlin, Germany). This analytical process encompassed the identification of components based on characteristic fluorescence lifetime values (τ_i) derived from the emission intensity formula $I(t)$:

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt' + Bkgr$$

Wherein, t represents time, $IRF(t')$ denotes the instrument response function at a reference time t' , n is the number of exponentials, A_i signifies exponential prefactors, and $Bkgr$ accounts for background correction.

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

Subsequently, intensities associated with each exponential component, reflecting non-zero contributions from distinct organizations of fluorophores, were computed:

$$I(i) = \tau_i A_i$$

These intensities were indicative of the quantity of distinct molecular organizations of the antibiotic. Additionally, the amplitudes associated with the intensities were expressed as a percentage referenced to the total intensity.

Selected monomolecular film regions 10 x 10 μm or 20 x 20 μm were scanned at a resolution of 300 x 300 pixels. The optical resolution of the microscope, considering the specified objective parameters and excitation wavelength, enabled the discrimination of structures with a minimum dimension of 226 ± 27 nm.

The fluorescence signal from the bright spots observed in the microscopic images was extracted through the exit port of the microscope system and subsequently directed into a spectrograph for further analysis. To ensure the fidelity of the collected data and eliminate interference from Raman and Rayleigh scattered light, a long-wavelength pass filter (HQ430lp) was employed prior to detection (the same as used to record images). Spectral data were recorded using a spectrograph model SR 163 (Shamrock), which was equipped with a Newton 970 EMCCD camera from Andor Technology (detection efficiency of up to 95%). The camera was thermoelectrically cooled down to -60°C to minimize noise during data acquisition, thereby ensuring high-quality signal capture. The SR 163 spectrograph, employing a Czerny Turner design with a grating having 600 lines per millimeter, blazed at 500 nm, enabled the acquisition of fluorescence spectra across a spectral window of 250 nm. Data were recorded and processed using Solaris software, with exposure time (20 s) optimized to maximize signal-to-noise ratio. Subsequent statistical analyses were performed using established statistical tools implemented to Grapher program (Golden Software) to derive meaningful insights from the collected data.

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

All types of experiments, including AFM and FLIM imaging for different monolayers, were repeated at least 10 times and found to be reproducible.

REFERENCES

- (1) Grela, E.; Wieczor, M.; Luchowski, R.; Zielinska, J.; Barzycka, A.; Grudzinski, W.; Nowak, K.; Tarkowski, P.; Czub, J.; Gruszecki, W. I. A mechanism of binding of an antifungal antibiotic amphotericin B to lipid membranes: An insight from combined single membrane imaging, micro-spectroscopy, and molecular dynamics. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 4202–4213.
- (2) Gagos, M.; Gabrielska, J.; Dalla Serra, M.; Gruszecki, W. I. Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes: monomolecular layer technique and linear dichroism-FTIR studies. *Mol. Membr. Biol.* **2005**, *22* (5), 433–442.

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

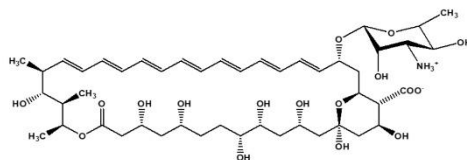


Figure S1 Chemical structure of amphotericin B.

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

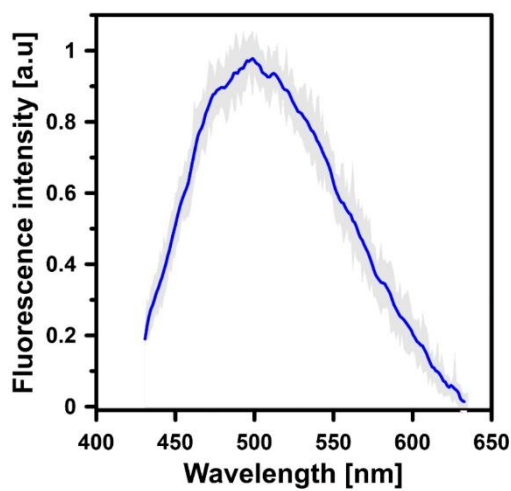


Figure S2 Fluorescence emission spectrum of AmB incorporated in a monomolecular layer composed of DOPC:Ergo (7:3, mol:mol). The spectrum (plotted in blue) represents the arithmetic mean of 16 individual, single-pixel spectra recorded from different fluorescence-emitting structures visible in the FLIM image. The gray area represents S.D. from the arithmetic mean. The spectra were recorded from a monolayer deposited on the mica surface.

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

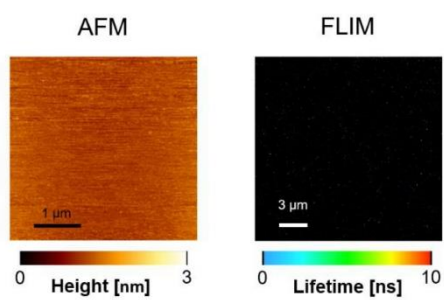


Figure S3 Images acquired with AFM and FLIM (indicated) of the same film deposited from a monomolecular layer formed with DOPC (without Ergo) and exposed to AmB. Note the lack of a signal assigned to AmB.

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

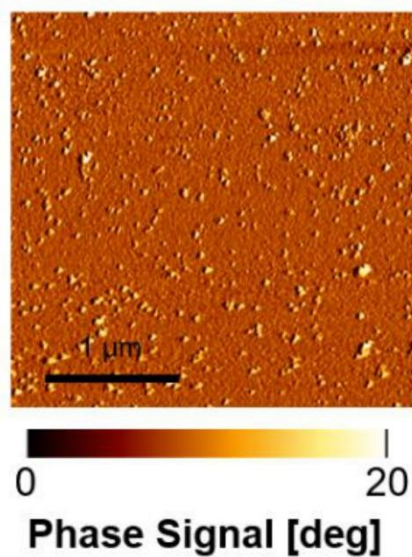


Figure S4 AFM image of the film deposited from the monomolecular layer composed of DOPC and Ergo (7:3, mol:mol) exposed to AmB. The image is based on a phase signal reflecting the mechanical properties of scanned objects.

How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

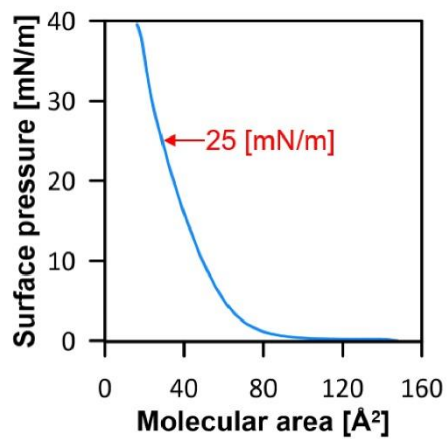


Figure S5 Surface pressure-mean molecular area isotherm of compression of a two-component monomolecular layer formed with DOPC:Ergo (7:3, mol:mol) at the air-water interface. In order to expose a monolayer to AmB, compression was stopped and stabilized at 25 mN/m, while AmB solution was injected into the aqueous subphase.

6 Dyskusja

Wyniki moich badań dostarczają nowych informacji na temat mechanizmów działania amfoterycyny B, powszechnie stosowanego antybiotyku przeciwgrzybiczego. Pomimo wieloletniego stosowania w medycynie, dokładny mechanizm działania AmB na poziomie molekularnym pozostawał przedmiotem dyskusji naukowych¹¹⁶. Kluczowym odkryciem, przedstawionym w obu artykułach, jest jednoczesny, wieloaspektowy wpływ AmB na błony lipidowe zawierające ergosterol. Analiza obrazów FLIM wskazuje, że AmB wbudowana w błonę DOPC-Ergo nie jest rozmieszczona jednorodnie, ale raczej samoasocjuje w klastry o wymiarach w zakresie 250-750 nm. Analiza fluorescencji czasowo-rozdzielczej wykazała, że AmB w badanym układzie występuje w trzech formach organizacji molekularnej charakteryzujących się czasami życia fluorescencji $\tau_1 = 0,35$ ns (12%), $\tau_2 = 1,8$ ns (34%) i $\tau_3 = 6,8$ ns (54%), przypisanymi odpowiednio małym agregatom (np. tetramerom), dimerom równoległym i dimerom antyrównoległym. Co ważne, amplitudy składowych czasu życia fluorescencji AmB w monowarstwie pokazują, że antybiotyk nie występuje w monowarstwie lipidowej jako monomer, a dimery są głównymi formami organizacji molekularnej w tym układzie pomiarowym. W badaniach monowarstw zaobserwowano również dwie zasadniczo różne formy organizacji molekularnej AmB w błonie, ważne z punktu widzenia relacji struktura-funkcja: wewnątrz błonowe klastry oddzielone od fazy lipidowej (20 do 50 nm średnicy) i pory ~ 15 nm. Co ważne, AmB nie występuje jako monomer, ale przyjmuje bardziej złożone formy. Wnioskuje się, że składniki błony, prawdopodobnie lipidy i sterole, uczestniczą w tworzeniu i stabilizacji obserwowanych struktur. Obserwacje te są zgodne z wcześniejszymi badaniami sugerującymi, że AmB może destabilizować błony poprzez tworzenie kanałów jonowych lub sekwestrację steroli^{9,10}. Ważnym odkryciem było potwierdzenie znaczenia ergosterolu dla aktywności AmB. Wyniki badań zaprezentowane w obu artykułach potwierdzają, że obecność ergosterolu jest kluczowa dla efektywnego wnikania AmB do błon lipidowych. Efekty związane z AmB obserwuje się tylko w błonach lipidowych zawierających sterole. Dowodzi to, że sterole są niezbędnymi składnikami błon, które pozwalają cząsteczkom AmB przenikać do fazy lipidowej i zapewniają pionową orientację cząsteczek antybiotyku, wzdłuż osi prostopadłej do płaszczyzny błony. Jest to zgodne z innymi wynikami badaczy pokazującymi, że AmB ma wyższe powinowactwo do błon zawierających ergosterol niż cholesterol, co tłumaczy jego selektywną toksyczność wobec komórek grzybów^{117,118}, oraz sugerują że AmB może

wpływać na morfologię powierzchni monowarstwy fosfolipidowo-sterolowej w zależności od zastosowanego sterolu¹¹⁹. Wszystkie te formy organizacji molekularnej AmB znacząco wpływają na właściwości strukturalne błon biologicznych, które są ważne z fizjologicznego punktu widzenia. Separacja faz błonowych, pojawiająca się jako klastry bogate w AmB, generuje granice międzyfazowe, które mogą ułatwiać niekontrolowany transport w poprzek błony małych cząsteczek, w tym jonów. Jeszcze większego ryzyka tego procesu można oczekiwać w obecności porów błonowych. Tworzenie struktur zewnątrz błonowych wydaje się również ważne z biologicznego punktu widzenia. Prawdopodobnie reprezentują one formy organizacji molekularnej zidentyfikowane wcześniej jako bogate w sterole "gąbki" AmB które zostały zaobserwowane przez inne grupy naukowe⁸. Wyniki moich badań wykazały także, że AmB w połączeniu z nanocząstkami srebra (AmB-Ag) charakteryzuje się wyższą aktywnością przeciwgrzybową potwierdzoną badaniami przeżywalności na komórkach *C. albicans*. Sugeruje to, że nanocząstki mogą pełnić funkcję nośników ułatwiających przenikanie AmB przez ścianę komórkową grzybów. AmB-Ag nanocząstki mogą efektywnie przekraczać barierę ściany komórkowej grzybów, co umożliwia bezpośrednie działanie amfoterycyny B na błonę komórkową. Analiza obrazów FLIM wykazała, że nanocząstki AmB-Ag penetrują komórkę niemal natychmiast po ich aplikacji, wiążąc się z błoną komórkową oraz strukturami wewnątrzkomórkowymi. To odkrycie stanowi rozwinięcie badań wcześniej prowadzonych w naszej grupie badawczej, które sugerowały, że zdolność amfoterycyny B do tworzenia kanałów transbłonowych oraz jej interakcja ze sterolami błonowymi są głównymi mechanizmami odpowiedzialnymi za jej działanie przeciwgrzybowe^{10,19}. Wpływ AmB na utratę integralności błony komórkowej *C. albicans* przedstawili również inni naukowcy za pomocą techniki patch-clamp dowodząc że dodanie AmB do komórki spowodowało spadek oporu na granicy, co wskazuje na zmniejszenie szczelności błony komórkowej¹²⁰. Przedstawione badania mogą otwierać nowe możliwości w projektowaniu efektywniejszych formułacji AmB. Uzyskane wyniki wskazują, że AmB nie występuje w błonach jako monomer, ale raczej w formie dimerów i małych agregatów. Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami spektroskopowymi i sugeruje, że oligomeryzacja AmB może być istotna dla jej działania przeciwgrzybiczego¹¹⁷. Warto zauważyć, że przedstawione badania wykorzystują zaawansowane techniki obrazowania, takie jak mikroskopia sił atomowych (AFM) i mikroskopia fluorescencyjna czasów życia (FLIM), co pozwala na uzyskanie szczegółowych informacji o organizacji molekularnej AmB w błonach. Te metody uzupełniają wcześniejsze badania strukturalne prowadzone przez badaczy wykorzystujące spektroskopię NMR i modelowanie

molekularne, przedstawiając model kanału jonowego zbudowany z siedmiu cząsteczek AmB usytuowanego w poprzek błony lipidowej^{121,122}.

Podsumowując, przedstawione wyniki badań układów modelowych oraz *C. albicans* ukazują, że obecność AmB w błonie lipidowej zawierającej sterole powoduje wiele konsekwencji na poziomie organizacji molekularnej i właściwości strukturalnych błon. Co ważne, wszystkie one mogą upośledzać ich funkcjonalność biologiczną. Prowadzi to do wniosku, że molekularne podstawy działania farmakologicznego AmB są złożone i nie ograniczają się tylko do jednego mechanizmu. Chociaż obecne badanie ujawniło kilka efektów oddziaływania AmB z błoną, zdajemy sobie sprawę, że ze względu na specyfikę zastosowanych technik i ich rozdzielczość, kilka innych potencjalnych mechanizmów mogło nie zostać zaobserwowanych, np. tworzenie bardzo małych kanałów jonowych. Najwyraźniej stosunkowo złożona i specyficzna struktura molekularna samej AmB moduluje całą serię oddziaływań w środowisku błonowym, powodując jej znaczną reorganizację, która przejawia się na wiele różnych sposobów w zależności od zastosowanej techniki badawczej. Podsumowując, przedstawione badania dostarczają nowych informacji na temat złożonego mechanizmu działania amfoterycyny B na błony lipidowe. W niniejszych pracach wskazano, że AmB może tworzyć różnorodne struktury w błonach, w tym klastry wewnątrz błonowe, pory oraz potencjalne "gąbki" sterolowe. Wszystkie te efekty mogą przyczyniać się do destabilizacji błon i zaburzenia ich funkcji. Ta wielopłaszczyznowość działania może stanowić wyjaśnienie dla wysokiej skuteczności AmB wobec komórek grzyba oraz trudności w rozwoju oporności na ten antybiotyk. Dalsze badania powinny skupić się na dokładniejszym określeniu struktury i dynamiki kompleksów AmB-ergosterol w błonach lipidowych oraz na optymalizacji formulacji AmB w celu zwiększenia jego skuteczności i zmniejszenia toksyczności. Wykorzystanie nanotechnologii, jak pokazano w przypadku AmB-Ag, może być obiecującym kierunkiem w rozwoju nowych, bardziej efektywnych terapii przeciwgrzybiczych.

7 Podsumowanie i Wnioski

Publikacja 1

Artykuł przedstawia badania nad mechanizmem działania amfoterycyny B (AmB) - popularnego antybiotyku przeciwgrzybiczego, w formie hybrydowych nanocząstek z srebrem (AmB-Ag). Główne wnioski:

- Kluczowym mechanizmem działania AmB-Ag jest zdolność do efektywnego przekraczania bariery ściany komórkowej grzybów i dostarczania cząsteczek antybiotyku bezpośrednio do błony komórkowej.
- Po dotarciu do błony komórkowej, cząsteczki AmB odłączają się od nanocząstek srebra i wbudowują się w strukturę błony lipidowej.
- Głównym mechanizmem przeciwgrzybiczego działania AmB jest dezintegracja błony komórkowej, co prowadzi do śmierci komórki grzyba. Proces ten zachodzi w ciągu kilku minut.
- Zastosowanie technik spektroskopii i obrazowania molekularnego (FLIM, spektroskopia Ramana) pozwoliło na szczegółową analizę interakcji AmB-Ag z komórkami *Candida albicans* na poziomie molekularnym.

Badania te przyczyniły się do lepszego zrozumienia mechanizmu działania AmB, co może pomóc w opracowaniu skuteczniejszych i bezpieczniejszych form tego antybiotyku.

Podsumowując, praca dostarcza nowych informacji na temat molekularnego mechanizmu działania amfoterycyny B, podkreślając rolę dezintegracji błony komórkowej jako kluczowego czynnika w jej aktywności przeciwgrzybiczej. Wykorzystanie nanocząstek AmB-Ag okazało się skutecznym sposobem na zwiększenie efektywności dostarczania antybiotyku do komórek grzybów.

Publikacja 2.

Artykuł przedstawia badania nad mechanizmem działania amfoterycyny B, popularnego antybiotyku przeciwgrzybiczego. Główne wnioski z badań:

- AmB w badanym układzie modelowym wnika do błony lipidowej tylko w obecności ergosterolu, głównego sterolu błon komórkowych grzybów.

- W błonach zawierających ergosterol, AmB tworzy jednocześnie różne struktury molekularne:
 - Wewnątrz błonowe skupiska o średnicy 20-50 nm, składające się głównie z dimerów AmB;
 - Pory o średnicy około 15 nm.
- AmB nie występuje w błonach jako monomer, lecz przyjmuje bardziej złożone formy organizacyjne, w których podstawową jednostką są dimery;
- W tworzeniu i stabilizacji obserwowanych struktur prawdopodobnie uczestniczą lipidy i sterole błonowe;
- Wszystkie zaobserwowane formy organizacji molekularnej AmB znacząco wpływają na właściwości strukturalne błon biologicznych, co może zaburzać ich funkcjonalność fizjologiczną.

Podsumowując, badania wykazały, że mechanizm działania AmB jest złożony i obejmuje wiele różnych efektów na poziomie molekularnym. Obejmują one tworzenie skupisk wewnątrz błonowych, porów oraz prawdopodobnie struktur pozabłonowych. Wszystkie te efekty mogą przyczyniać się do aktywności przeciwgrzybiczej AmB poprzez zaburzenie integralności i funkcji błon komórkowych grzybów. Wyniki te sugerują, że skuteczność AmB wynika z jednoczesnego działania kilku mechanizmów, a nie jednego dominującego efektu.

8 Bibliografia

- (1) Enoch, D. A.; Yang, H.; Aliyu, S. H.; Micallef, C. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Hum. Fungal Pathog. Identif.* 2017, 1508, 17–65. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6515-1_2.
- (2) Parsons, M. G.; Diekema, D. J. What Is New in Fungal Infections? *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 2023, 36 (6), 100187. <https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100187>.
- (3) Pianalto, K.; Alspaugh, J. New Horizons in Antifungal Therapy. *J. Fungi* 2016, 2 (4), 26. <https://doi.org/10.3390/jof2040026>.
- (4) Brown, G. D.; Denning, D. W.; Gow, N. A. R.; Levitz, S. M.; Netea, M. G.; White, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci. Transl. Med.* 2012, 4 (165), 165rv13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>.
- (5) Talapko, J.; Juzbašić, M.; Matijević, T.; Pustijanac, E.; Bekić, S.; Kotris, I.; Škrlec, I. *Candida Albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J. Fungi* 2021, 7 (2), 79. <https://doi.org/10.3390/jof7020079>.
- (6) Oura, M.; Sternberg, T. H.; Wright, E. T. A New Antifungal Antibiotic, Amphotericin B. *Antibiot. Annu.* 1955, 3, 566–573.
- (7) Saravolatz, L. D.; Ostrosky-Zeichner, L.; Marr, K. A.; Rex, J. H.; Cohen, S. H. Amphotericin B: Time for a New “Gold Standard.” *Clin. Infect. Dis.* 2003, 37 (3), 415–425. <https://doi.org/10.1086/376634>.
- (8) Lewandowska, A.; Soutar, C. P.; Greenwood, A. I.; Nimerovsky, E.; De Lio, A. M.; Holler, J. T.; Hisao, G. S.; Khandelwal, A.; Zhang, J.; SantaMaria, A. M.; Schwieters, C. D.; Pogorelov, T. V.; Burke, M. D.; Rienstra, C. M. Fungicidal Amphotericin B Sponges Are Assemblies of Staggered Asymmetric Homodimers Encasing Large Void Volumes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021, 28 (12), 972–981. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00685-4>.
- (9) Anderson, T. M.; Clay, M. C.; Cioffi, A. G.; Diaz, K. A.; Hisao, G. S.; Tuttle, M. D.; Nieuwkoop, A. J.; Comellas, G.; Maryum, N.; Wang, S.; Uno, B. E.; Wildeman, E. L.; Gonen, T.; Rienstra, C. M.; Burke, M. D. Amphotericin Forms an Extramembranous and Fungicidal Sterol Sponge. *Nat. Chem. Biol.* 2014, 10 (5), 400–406. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1496>.
- (10) Grela, E.; Stączek, S.; Nowak, M.; Pawlikowska-Pawlega, B.; Zdybicka-Barabas, A.; Janik, S.; Cytryńska, M.; Grudzinski, W.; Gruszecki, W. I.; Luchowski, R. Enhanced Antifungal Activity of Amphotericin B Bound to Albumin: A “Trojan Horse” Effect of the Protein. *J. Phys. Chem. B* 2023, 127 (16), 3632–3640. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c01168>.
- (11) Becker, W. Fluorescence Lifetime Imaging – Techniques and Applications. *J. Microsc.* 2012, 247 (2), 119–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2012.03618.x>.
- (12) Berezin, M. Y.; Achilefu, S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chem. Rev.* 2010, 110 (5), 2641–2684. <https://doi.org/10.1021/cr900343z>.
- (13) Stoodley, R.; Wasan, K. M.; Bizzotto, D. Fluorescence of Amphotericin B-Deoxycholate (Fungizone) Monomers and Aggregates and the Effect of Heat-Treatment. *Langmuir* 2007, 23 (17), 8718–8725. <https://doi.org/10.1021/la7008573>.
- (14) Bolard, J.; Legrand, P.; Heitz, F.; Cybulska, B. One-Sided Action of Amphotericin B on Cholesterol-Containing Membranes Is Determined by Its Self-Association in the Medium. *Biochemistry* 1991, 30 (23), 5707–5715. <https://doi.org/10.1021/bi00237a011>.

- (15) Grela, E.; Piet, M.; Luchowski, R.; Grudzinski, W.; Paduch, R.; Gruszecki, W. I. Imaging of Human Cells Exposed to an Antifungal Antibiotic Amphotericin B Reveals the Mechanisms Associated with the Drug Toxicity and Cell Defence. *Sci. Rep.* 2018, 8 (1), 14067. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32301-9>.
- (16) Grudzinski, W.; Sagan, J.; Welc, R.; Luchowski, R.; Gruszecki, W. I. Molecular Organization, Localization and Orientation of Antifungal Antibiotic Amphotericin B in a Single Lipid Bilayer. *Sci. Rep.* 2016, 6 (1), 32780. <https://doi.org/10.1038/srep32780>.
- (17) Pierce, C. G.; Uppuluri, P.; Tristan, A. R.; Wormley, F. L.; Mowat, E.; Ramage, G.; Lopez-Ribot, J. L. A Simple and Reproducible 96-Well Plate-Based Method for the Formation of Fungal Biofilms and Its Application to Antifungal Susceptibility Testing. *Nat. Protoc.* 2008, 3 (9), 1494–1500. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.141>.
- (18) Laniado-Laborín, R.; Cabrales-Vargas, M. N. Amphotericin B: Side Effects and Toxicity. *Rev. Iberoam. Micol.* 2009, 26 (4), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.06.003>.
- (19) Tutaj, K.; Szlazak, R.; Szalapata, K.; Starzyk, J.; Luchowski, R.; Grudzinski, W.; Osinska-Jaroszuk, M.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Szuster-Ciesielska, A.; Gruszecki, W. I. Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles: Synthesis, Properties and Antifungal Activity. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 2016, 12 (4), 1095–1103. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.12.378>.
- (20) Mesa-Arango, A. C.; Scorzoni, L.; Zaragoza, O. It Only Takes One to Do Many Jobs: Amphotericin B as Antifungal and Immunomodulatory Drug. *Front. Microbiol.* 2012, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00286>.
- (21) Dupont, B. Overview of the Lipid Formulations of Amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002, 49 Suppl 1, 31–36. https://doi.org/10.1093/jac/49.suppl_1.31.
- (22) Torrado, J. J.; Espada, R.; Ballesteros, M. P.; Torrado-Santiago, S. Amphotericin B Formulations and Drug Targeting. *J. Pharm. Sci.* 2008, 97 (7), 2405–2425. <https://doi.org/10.1002/jps.21179>.
- (23) Fisher, M. C.; Hawkins, N. J.; Sanglard, D.; Gurr, S. J. Worldwide Emergence of Resistance to Antifungal Drugs Challenges Human Health and Food Security. *Science* 2018, 360 (6390), 739–742. <https://doi.org/10.1126/science.aap7999>.
- (24) Al-Khikani, F. H. O. Amphotericin B as Antiviral Drug: Possible Efficacy against COVID-19. *Ann. Thorac. Med.* 2020, 15 (3), 118–124. https://doi.org/10.4103/atm.ATM_147_20.
- (25) Firouzeh, N.; Asadi, A.; Tavakoli Kareshk, A. Nano Amphotericin B: A Good Anti-Leishmanial Drug with Effect on Cathelicidin Gene Expression. *J. Parasit. Dis. Off. Organ Indian Soc. Parasitol.* 2021, 45 (2), 366–371. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01308-3>.
- (26) Mayer, F. L.; Wilson, D.; Hube, B. *Candida Albicans* Pathogenicity Mechanisms. *Virulence* 2013, 4 (2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>.
- (27) Lopes, J. P.; Lionakis, M. S. Pathogenesis and Virulence of *Candida Albicans*. *Virulence* 2022, 13 (1), 89–121. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>.
- (28) Borman, A. M.; Johnson, E. M. Name Changes for Fungi of Medical Importance, 2018 to 2019. *J. Clin. Microbiol.* 2021, 59 (2), e01811-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01811-20>.
- (29) Domingos, E. L.; Vilhena, R. O.; Santos, J. M. M. F.; Fachi, M. M.; Böger, B.; Adam, L. M.; Tonin, F. S.; Pontarolo, R. Comparative Efficacy and Safety of Systemic Antifungal Agents for Candidemia: A Systematic Review with Network Meta-Analysis and Multicriteria Acceptability Analyses. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2022, 60 (2), 106614. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106614>.

- (30) Holland, G. N. Endogenous Fungal Infections of the Retina and Choroid. In *Retina*; Elsevier, 2006; pp 1683–1698. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-02598-0.50100-2>.
- (31) Carolus, H.; Pierson, S.; Lagrou, K.; Van Dijck, P. Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. *J. Fungi* 2020, 6 (4), 321. <https://doi.org/10.3390/jof6040321>.
- (32) Cavassin, F. B.; Baú-Carneiro, J. L.; Vilas-Boas, R. R.; Queiroz-Telles, F. Sixty Years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. *Infect. Dis. Ther.* 2021, 10 (1), 115–147. <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00382-7>.
- (33) Moen, M. D.; Lyseng-Williamson, K. A.; Scott, L. J. Liposomal Amphotericin B: A Review of Its Use as Empirical Therapy in Febrile Neutropenia and in the Treatment of Invasive Fungal Infections. *Drugs* 2009, 69 (3), 361–392. <https://doi.org/10.2165/00003495-200969030-00010>.
- (34) Queiroz-Telles, F.; Berezin, E.; Leverger, G.; Freire, A.; van der Vyver, A.; Chotpitayasunondh, T.; Konja, J.; Diekmann-Berndt, H.; Koblinger, S.; Groll, A. H.; Arrieta, A. Micafungin Versus Liposomal Amphotericin B for Pediatric Patients With Invasive Candidiasis: Substudy of a Randomized Double-Blind Trial. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2008, 27 (9), 820–826. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31817275e6>.
- (35) Groll, A. H.; Rijnders, B. J. A.; Walsh, T. J.; Adler-Moore, J.; Lewis, R. E.; Brüggemann, R. J. M. Clinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Safety and Efficacy of Liposomal Amphotericin B. *Clin. Infect. Dis.* 2019, 68 (Supplement_4), S260–S274. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz076>.
- (36) Fleming, R. V.; Kantarjian, H. M.; Husni, R.; Rolston, K.; Lim, J.; Raad, I.; Pierce, S.; Cortes, J.; Estey, E. Comparison of Amphotericin B Lipid Complex (ABLC) vs. AmBisome in the Treatment of Suspected or Documented Fungal Infections in Patients with Leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2001, 40 (5–6), 511–520. <https://doi.org/10.3109/10428190109097650>.
- (37) Patel, R. Amphotericin B Colloidal Dispersion. *Expert Opin. Pharmacother.* 2000, 1 (3), 475–488. <https://doi.org/10.1517/14656566.1.3.475>.
- (38) Munita, J. M.; Arias, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* 2016, 4 (2), 4.2.15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
- (39) Campoy, S.; Adrio, J. L. Antifungals. *Biochem. Pharmacol.* 2017, 133, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>.
- (40) Prasad, R.; Shah, A. H.; Rawal, M. K. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. In *Yeast Membrane Transport*; Ramos, J., Sychrová, H., Kschischo, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2016; Vol. 892, pp 327–349. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_14.
- (41) Arendrup, M. C.; Patterson, T. F. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J. Infect. Dis.* 2017, 216 (suppl_3), S445–S451. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix131>.
- (42) Lemke, A.; Kiderlen, A. F.; Kayser, O. Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 68 (2), 151–162. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>.
- (43) Saka, Y.; Mita, T. Interaction of Amphotericin B with Cholesterol in Monolayers, Aqueous Solutions, and Phospholipid Bilayers. *J. Biochem. (Tokyo)* 1998, 123 (5), 798–805. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022007>.
- (44) Czub, J.; Baginski, M. Modulation of Amphotericin B Membrane Interaction by Cholesterol and Ergosterol: A Molecular Dynamics Study. *J. Phys. Chem. B* 2006, 110 (33), 16743–16753. <https://doi.org/10.1021/jp061916g>.

- (45) Kamiński, D. M. Recent Progress in the Study of the Interactions of Amphotericin B with Cholesterol and Ergosterol in Lipid Environments. *Eur. Biophys. J.* 2014, 43 (10–11), 453–467. <https://doi.org/10.1007/s00249-014-0983-8>.
- (46) Maji, A.; Soutar, C. P.; Zhang, J.; Lewandowska, A.; Uno, B. E.; Yan, S.; Shelke, Y.; Murhade, G.; Nimerovsky, E.; Borcik, C. G.; Arango, A. S.; Lange, J. D.; Marin-Toledo, J. P.; Lyu, Y.; Bailey, K. L.; Roady, P. J.; Holler, J. T.; Khandelwal, A.; SantaMaria, A. M.; Sanchez, H.; Juvvadi, P. R.; Johns, G.; Hageman, M. J.; Krise, J.; Gebremariam, T.; Youssef, E. G.; Bartizal, K.; Marr, K. A.; Steinbach, W. J.; Ibrahim, A. S.; Patterson, T. F.; Wiederhold, N. P.; Andes, D. R.; Pogorelov, T. V.; Schwieters, C. D.; Fan, T. M.; Rienstra, C. M.; Burke, M. D. Tuning Sterol Extraction Kinetics Yields a Renal-Sparing Polyene Antifungal. *Nature* 2023, 623 (7989), 1079–1085. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06710-4>.
- (47) Czub, J.; Borowski, E.; Baginski, M. Interactions of Amphotericin B Derivatives with Lipid Membranes—A Molecular Dynamics Study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 2007, 1768 (10), 2616–2626. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.017>.
- (48) Chaffey, N. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular Biology of the Cell. 4th Edn. *Ann. Bot.* 2003, 91 (3), 401–401. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg023>.
- (49) van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008, 9 (2), 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>.
- (50) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell Membranes Are Viewed as Two-Dimensional Solutions of Oriented Globular Proteins and Lipids. *Science* 1972, 175 (4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
- (51) Pierce, K. L.; Premont, R. T.; Lefkowitz, R. J. Seven-Transmembrane Receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, 3 (9), 639–650. <https://doi.org/10.1038/nrm908>.
- (52) Kellogg, D. R.; Moritz, M.; Alberts, B. M. THE CENTROSOME AND CELLULAR ORGANIZATION. *Annu. Rev. Biochem.* 1994, 63 (1), 639–674. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.003231>.
- (53) Simons, K.; Sampaio, J. L. Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011, 3 (10), a004697–a004697. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004697>.
- (54) Weiss, D. R.; Raschke, T. M.; Levitt, M. How Hydrophobic Buckminsterfullerene Affects Surrounding Water Structure. *J. Phys. Chem. B* 2008, 112 (10), 2981–2990. <https://doi.org/10.1021/jp076416h>.
- (55) Karnovsky, M. J.; Kleinfeld, A. M.; Hoover, R. L.; Klausner, R. D. The Concept of Lipid Domains in Membranes. *J. Cell Biol.* 1982, 94 (1), 1–6. <https://doi.org/10.1083/jcb.94.1.1>.
- (56) Simons, K.; Ikonen, E. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* 1997, 387 (6633), 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>.
- (57) White, S. H.; Wimley, W. C. MEMBRANE PROTEIN FOLDING AND STABILITY: Physical Principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1999, 28 (1), 319–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.28.1.319>.
- (58) Eggeling, C.; Ringemann, C.; Medda, R.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K.; Polyakova, S.; Belov, V. N.; Hein, B.; von Middendorff, C.; Schönle, A.; Hell, S. W. Direct Observation of the Nanoscale Dynamics of Membrane Lipids in a Living Cell. *Nature* 2009, 457 (7233), 1159–1162. <https://doi.org/10.1038/nature07596>.

- (59) Chattopadhyay, M.; Krok, E.; Orlikowska, H.; Schwille, P.; Franquelim, H. G.; Piatkowski, L. Hydration Layer of Only a Few Molecules Controls Lipid Mobility in Biomimetic Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 2021, *143* (36), 14551–14562. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c04314>.
- (60) Lingwood, D.; Simons, K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science* 2010, *327* (5961), 46–50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>.
- (61) Le Roy, C.; Wrana, J. L. Clathrin- and Non-Clathrin-Mediated Endocytic Regulation of Cell Signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, *6* (2), 112–126. <https://doi.org/10.1038/nrm1571>.
- (62) Carey, A. B.; Ashenden, A.; Köper, I. Model Architectures for Bacterial Membranes. *Biophys. Rev.* 2022, *14* (1), 111–143. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00913-7>.
- (63) Sezgin, E.; Schwille, P. Model Membrane Platforms to Study Protein-Membrane Interactions. *Mol. Membr. Biol.* 2012, *29* (5), 144–154. <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.700490>.
- (64) Scott, H. L.; Kennison, K. B.; Enoki, T. A.; Doktorova, M.; Kinnun, J. J.; Heberle, F. A.; Katsaras, J. Model Membrane Systems Used to Study Plasma Membrane Lipid Asymmetry. *Symmetry* 2021, *13* (8), 1356. <https://doi.org/10.3390/sym13081356>.
- (65) Harayama, T.; Riezman, H. Understanding the Diversity of Membrane Lipid Composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018, *19* (5), 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>.
- (66) Pereira, D. M.; Valentão, P.; Andrade, P. B. Nano- and Microdelivery Systems for Marine Bioactive Lipids. *Mar. Drugs* 2014, *12* (12), 6014–6027. <https://doi.org/10.3390/md12126014>.
- (67) Schaich, M.; Sobota, D.; Sleath, H.; Cama, J.; Keyser, U. F. Characterization of Lipid Composition and Diffusivity in OLA Generated Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 2020, *1862* (9), 183359. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183359>.
- (68) Conchello, J.-A.; Lichtman, J. W. Optical Sectioning Microscopy. *Nat. Methods* 2005, *2* (12), 920–931. <https://doi.org/10.1038/nmeth815>.
- (69) Minsky, M. Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning* 1988, *10* (4), 128–138. <https://doi.org/10.1002/sca.4950100403>.
- (70) Rayleigh. XXXI. *Investigations in Optics, with Special Reference to the Spectroscope.* *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* 1879, *8* (49), 261–274. <https://doi.org/10.1080/14786447908639684>.
- (71) Paddock, S. W.; Eliceiri, K. W. Laser Scanning Confocal Microscopy: History, Applications, and Related Optical Sectioning Techniques. In *Confocal Microscopy*; Paddock, S. W., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2014; Vol. 1075, pp 9–47. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-847-8_2.
- (72) Stephens, D. J.; Allan, V. J. Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science* 2003, *300* (5616), 82–86. <https://doi.org/10.1126/science.1082160>.
- (73) Lippincott-Schwartz, J.; Snapp, E.; Kenworthy, A. Studying Protein Dynamics in Living Cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, *2* (6), 444–456. <https://doi.org/10.1038/35073068>.
- (74) Rizzuto, R.; Pinton, P.; Carrington, W.; Fay, F. S.; Fogarty, K. E.; Lifshitz, L. M.; Tuft, R. A.; Pozzan, T. Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses. *Science* 1998, *280* (5370), 1763–1766. <https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1763>.
- (75) Keller, P. J.; Schmidt, A. D.; Wittbrodt, J.; Stelzer, E. H. K. Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy. *Science* 2008, *322* (5904), 1065–1069. <https://doi.org/10.1126/science.1162493>.

- (76) Wymer, C. L.; Beven, A. F.; Boudonck, K.; Lloyd, C. W. Confocal Microscopy of Plant Cells. In *Confocal Microscopy*; Humana Press: New Jersey, 1998; Vol. 122, pp 103–130. <https://doi.org/10.1385/1-59259-722-X:103>.
- (77) Cremer, T.; Cremer, C. Chromosome Territories, Nuclear Architecture and Gene Regulation in Mammalian Cells. *Nat. Rev. Genet.* 2001, 2 (4), 292–301. <https://doi.org/10.1038/35066075>.
- (78) Tsien, R. Y. Fluorescent Probes of Cell Signaling. *Annu. Rev. Neurosci.* 1989, 12 (1), 227–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.12.030189.001303>.
- (79) Helmchen, F.; Denk, W. Deep Tissue Two-Photon Microscopy. *Nat. Methods* 2005, 2 (12), 932–940. <https://doi.org/10.1038/nmeth818>.
- (80) Nakano, A. Spinning-Disk Confocal Microscopy. A Cutting-Edge Tool for Imaging of Membrane Traffic. *Cell Struct. Funct.* 2002, 27 (5), 349–355. <https://doi.org/10.1247/csf.27.349>.
- (81) Hell, S. W.; Wichmann, J. Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated Emission: Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy. *Opt. Lett.* 1994, 19 (11), 780. <https://doi.org/10.1364/OL.19.000780>.
- (82) Han, R.; Li, Z.; Fan, Y.; Jiang, Y. Recent Advances in Super-Resolution Fluorescence Imaging and Its Applications in Biology. *J. Genet. Genomics* 2013, 40 (12), 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.11.003>.
- (83) Ntziachristos, V. Going Deeper than Microscopy: The Optical Imaging Frontier in Biology. *Nat. Methods* 2010, 7 (8), 603–614. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1483>.
- (84) Smith, E.; Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*; J. Wiley: Hoboken, NJ, 2005.
- (85) Long, D. A. *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*; Wiley: Chichester ; New York, 2002.
- (86) Kneipp, K.; Kneipp, H.; Kneipp, J. Surface-Enhanced Raman Scattering in Local Optical Fields of Silver and Gold Nanoaggregates From Single-Molecule Raman Spectroscopy to Ultrasensitive Probing in Live Cells. *Acc. Chem. Res.* 2006, 39 (7), 443–450. <https://doi.org/10.1021/ar050107x>.
- (87) Mulvaney, S. P.; Keating, C. D. Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* 2000, 72 (12), 145–158. <https://doi.org/10.1021/a10000155>.
- (88) Downes, A.; Elfick, A. Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine. *Sensors* 2010, 10 (3), 1871–1889. <https://doi.org/10.3390/s100301871>.
- (89) Campion, A.; Kambhampati, P. Surface-Enhanced Raman Scattering. *Chem. Soc. Rev.* 1998, 27 (4), 241. <https://doi.org/10.1039/a827241z>.
- (90) Camden, J. P.; Dieringer, J. A.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P. Controlled Plasmonic Nanostructures for Surface-Enhanced Spectroscopy and Sensing. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41 (12), 1653–1661. <https://doi.org/10.1021/ar800041s>.
- (91) Wahl, M. Modern TCSPC Electronics: Principles and Acquisition Modes. In *Advanced Photon Counting: Applications, Methods, Instrumentation*; Kapusta, P., Wahl, M., Erdmann, R., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 1–21. https://doi.org/10.1007/4243_2014_62.
- (92) Suhling, K.; French, P. M. W.; Phillips, D. Time-Resolved Fluorescence Microscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2005, 4 (1), 13–22. <https://doi.org/10.1039/b412924p>.
- (93) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, 2006.
- (94) Becker, W.; Su, B.; Holub, O.; weisshart, K. FLIM and FCS Detection in Laser-scanning Microscopes: Increased Efficiency by GaAsP Hybrid Detectors. *Microsc. Res. Tech.* 2011, 74 (9), 804–811. <https://doi.org/10.1002/jemt.20959>.

-
- (95) Zheng, K.; Jensen, T. P.; Rusakov, D. A. Monitoring Intracellular Nanomolar Calcium Using Fluorescence Lifetime Imaging. *Nat. Protoc.* 2018, *13* (3), 581–597. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.154>.
- (96) Castello, M.; Tortarolo, G.; Buttafava, M.; Deguchi, T.; Villa, F.; Koho, S.; Pesce, L.; Oneto, M.; Pelicci, S.; Lanzanó, L.; Bianchini, P.; Sheppard, C. J. R.; Diaspro, A.; Tosi, A.; Vicidomini, G. A Robust and Versatile Platform for Image Scanning Microscopy Enabling Super-Resolution FLIM. *Nat. Methods* 2019, *16* (2), 175–178. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0291-9>.
- (97) Raspe, M.; Kedziora, K. M.; van den Broek, B.; Zhao, Q.; de Jong, S.; Herz, J.; Mastop, M.; Goedhart, J.; Gadella, T. W. J.; Young, I. T.; Jalink, K. SiFLIM: Single-Image Frequency-Domain FLIM Provides Fast and Photon-Efficient Lifetime Data. *Nat. Methods* 2016, *13* (6), 501–504. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3836>.
- (98) Gouzou, D.; Taimori, A.; Haloubi, T.; Finlayson, N.; Wang, Q.; Hopgood, J. R.; Vallejo, M. Applications of Machine Learning in Time-Domain Fluorescence Lifetime Imaging: A Review. *Methods Appl. Fluoresc.* 2024, *12* (2), 022001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ad12f7>.
- (99) Digman, M. A.; Caiolfa, V. R.; Zamai, M.; Gratton, E. The Phasor Approach to Fluorescence Lifetime Imaging Analysis. *Biophys. J.* 2008, *94* (2), L14–L16. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120154>.
- (100) Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, Ch. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 1986, *56* (9), 930–933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
- (101) Giessibl, F. J. Advances in Atomic Force Microscopy. *Rev. Mod. Phys.* 2003, *75* (3), 949–983. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.75.949>.
- (102) Müller, D. J.; Dufrêne, Y. F. Atomic Force Microscopy as a Multifunctional Molecular Toolbox in Nanobiotechnology. *Nat. Nanotechnol.* 2008, *3* (5), 261–269. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.100>.
- (103) Butt, H.-J.; Cappella, B.; Kappl, M. Force Measurements With the Atomic Force Microscope: Technique, Interpretation and Applications. *Surf. Sci. Rep. - SURF SCI REP* 2005, *59*, 1–152. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2005.08.003>.
- (104) Custance, O.; Perez, R.; Morita, S. Atomic Force Microscopy as a Tool for Atom Manipulation. *Nat. Nanotechnol.* 2009, *4* (12), 803–810. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.347>.
- (105) Ando, T.; Uchihashi, T.; Scheuring, S. Filming Biomolecular Processes by High-Speed Atomic Force Microscopy. *Chem. Rev.* 2014, *114* (6), 3120–3188. <https://doi.org/10.1021/cr4003837>.
- (106) Cao, Y.; Sun, M. Tip-Enhanced Raman Spectroscopy. *Rev. Phys.* 2022, *8*, 100067. <https://doi.org/10.1016/j.revip.2022.100067>.
- (107) Payam, A. F.; Ramos, J. R.; Garcia, R. Molecular and Nanoscale Compositional Contrast of Soft Matter in Liquid: Interplay between Elastic and Dissipative Interactions. *ACS Nano* 2012, *6* (6), 4663–4670. <https://doi.org/10.1021/nn2048558>.
- (108) Zasadzinski, J. A.; Viswanathan, R.; Madsen, L.; Garnaes, J.; Schwartz, D. K. Langmuir-Blodgett Films. *Science* 1994, *263* (5154), 1726–1733. <https://doi.org/10.1126/science.8134836>.
- (109) Simonsen, A. C.; Bagatolli, L. A. Structure of Spin-Coated Lipid Films and Domain Formation in Supported Membranes Formed by Hydration. *Langmuir* 2004, *20* (22), 9720–9728. <https://doi.org/10.1021/la048683+>.
- (110) Brockman, J. M.; Wang, Z.; Notter, R. H.; Dluhy, R. A. Effect of Hydrophobic Surfactant Proteins SP-B and SP-C on Binary Phospholipid Monolayers: II. Infrared External Reflectance-Absorption Spectroscopy. *Biophys. J.* 2003, *84* (1), 326–340. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74853-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74853-X).

- (111) Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers to Study Interactions at Model Membrane Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2003, 100–102, 563–584. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(02\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00071-4).
- (112) Róg, T.; Giryč, M.; Bunker, A. Mechanistic Understanding from Molecular Dynamics in Pharmaceutical Research 2: Lipid Membrane in Drug Design. *Pharmaceuticals* 2021, 14 (10), 1062. <https://doi.org/10.3390/ph14101062>.
- (113) Siontorou, C. G.; Nikoleli, G.-P.; Nikolelis, D. P.; Karapetis, S. K. Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future. *Membranes* 2017, 7 (3), 38. <https://doi.org/10.3390/membranes7030038>.
- (114) Chernomordik, L. V.; Kozlov, M. M. Mechanics of Membrane Fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008, 15 (7), 675–683. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1455>.
- (115) Li, D.-D.; Deng, L.; Hu, G.-H.; Zhao, L.-X.; Hu, D.-D.; Jiang, Y.-Y.; Wang, Y. Using *Galleria Mellonella*–*Candida Albicans* Infection Model to Evaluate Antifungal Agents. *Biol. Pharm. Bull.* 2013, 36 (9), 1482–1487. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00270>.
- (116) Moraes, D. C. D. Recent Developments on the Anti-*Candida* Effect of Amphotericin B Combined with a Second Drug - a Mini-Review. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 2023, 95, e20220033. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202320220033>.
- (117) Starzyk, J.; Gruszecki, M.; Tutaj, K.; Luchowski, R.; Szlajak, R.; Wasko, P.; Grudzinski, W.; Czub, J.; Gruszecki, W. I. Self-Association of Amphotericin B: Spontaneous Formation of Molecular Structures Responsible for the Toxic Side Effects of the Antibiotic. *J. Phys. Chem. B* 2014, 118 (48), 13821–13832. <https://doi.org/10.1021/jp510245n>.
- (118) Yilma, S.; Cannon-Sykora, J.; Samoylov, A.; Lo, T.; Liu, N.; Brinker, C. J.; Neely, W. C.; Vodyanoy, V. Large-Conductance Cholesterol–Amphotericin B Channels in Reconstituted Lipid Bilayers. *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22 (7), 1359–1367. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.004>.
- (119) Wang, J.; Ma, Y.; Hou, S.; Miao, Z.; Ma, Q. Interaction of Amphotericin B and Saturated or Unsaturated Phospholipid Monolayers Containing Cholesterol or Ergosterol at the Air-Water Interface. *Biophys. Chem.* 2020, 258, 106317. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.106317>.
- (120) Chudzik, B.; Koselski, M.; Czuryło, A.; Trębacz, K.; Gagoś, M. A New Look at the Antibiotic Amphotericin B Effect on *Candida Albicans* Plasma Membrane Permeability and Cell Viability Functions. *Eur. Biophys. J.* 2015, 44 (1), 77–90. <https://doi.org/10.1007/s00249-014-1003-8>.
- (121) Zielińska, J.; Wieczór, M.; Chodnicki, P.; Grela, E.; Luchowski, R.; Nierzwicki, Ł.; Bączek, T.; Gruszecki, W. I.; Czub, J. Self-Assembly, Stability and Conductance of Amphotericin B Channels: Bridging the Gap between Structure and Function. *Nanoscale* 2021, 13 (6), 3686–3697. <https://doi.org/10.1039/D0NR07707K>.
- (122) Umegawa, Y.; Yamamoto, T.; Dixit, M.; Funahashi, K.; Seo, S.; Nakagawa, Y.; Suzuki, T.; Matsuoka, S.; Tsuchikawa, H.; Hanashima, S.; Oishi, T.; Matsumori, N.; Shinoda, W.; Murata, M. Amphotericin B Assembles into Seven-Molecule Ion Channels: An NMR and Molecular Dynamics Study. *Sci. Adv.* 2022, 8 (24), eabo2658. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo2658>.

9 Źródła internetowe

- (1) <https://www.zeiss.com/microscopy/en/products/light-microscopes/confocal-microscopes/lsm-900-for-materials.html#overlay-benefits-1992213094>
(dostęp na dzień 26.09.2024)
- (2) <https://www.renishaw.com/pl/a-basic-overview-of-raman-spectroscopy--25805>
(dostęp na dzień 26.09.2024)
- (3) <https://www.bruker.com/pl/products-and-solutions/microscopes/materials-afm/faq.html>
(dostęp na dzień 26.09.2024)
- (4) <https://www.biolinscientific.com/blog/what-is-a-langmuir-blodgett-film>
(dostęp na dzień 26.09.2024)

10 Naukowe *Curriculum vitae*

Wykształcenie:

- 2020 - obecnie Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Dyscyplina Naukowa Nauki Biologiczne. Tytuł rozprawy doktorskiej: "Badania mechanizmów molekularnych związanych z aktywnością biologiczną antybiotyków polienowych". Rozprawa doktorska: Katedra Biofizyki i Katedra Immunobiologii;
- 2018 - 2020 Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, studia magisterskie: Biotechnologia, specjalność biotechnologia medyczna;
- 2015 - 2018 Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, studia licencjackie na kierunku: Biologia, specjalność biologia medyczna.

Udział w wydarzeniach promujących uczelnię:

- Aktywny udział w przeprowadzeniu finału konkursu dla uczniów szkół ponadpodstawowych „Rok przed Maturą – Fizyka”. 9 czerwca 2022 r. Instytut Fizyki UMCS;
- Aktywny udział w przeprowadzeniu finału konkursu dla uczniów szkół ponadpodstawowych „Rok przed Maturą – Fizyka”. 6 czerwca 2023 r. Instytut Fizyki UMCS;
- Aktywny udział w przeprowadzeniu finału konkursu dla uczniów szkół ponadpodstawowych „Rok przed Maturą – Fizyka”. 7 czerwca 2024 r. Instytut Fizyki UMCS;
- Prowadzenie warsztatów „Bezkręgowce jako źródło cząsteczek o aktywności biologicznej” dla uczniów z V (16.02.2023) i VI Liceum Ogólnokształcącego (24.02.2023) w Lublinie w ramach zajęć dla Szkół Partnerskich.

Udział w konferencjach naukowych:

a. Krajowe:

- BIO-IDEA, II Interdyscyplinarna Konferencja Doktorantów Nauk Biologicznych Lublin, 15 maja 2021 r. Technika mikroskopii rozproszenia ramanowskiego w badaniach

antybiotyku polienowego amfoterycyny B; wystąpienie uzyskało II miejsce w konkursie (prezentacja, wystąpienie ustne);

- TYGIEL, XIV Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Lublin, 24-27 marzec 2022 r. Badania oddziaływania antybiotyku polienowego amfoterycyny B w kompleksach z nanocząstkami srebra na komórki grzybicze (prezentacja, wystąpienie ustne);
- PTBF, XXVII Lubeskie Warsztaty Biofizyczne Kazimierz nad Wisłą, 26-27 maj 2022 r. Spektroskopowa analiza interakcji antybiotyku amfoterycyny B sprzężonej z nanocząstkami srebra z biomembranami (prezentacja, wystąpienie ustne);
- PTBF, XXVIII Lubelskie Warsztaty Biofizyczne Kazimierz nad Wisłą, 25-26 maj 2023 r. Obrazowanie struktur molekularnych Amfoterycyny B w modelowych układach lipidowych (prezentacja, wystąpienie ustne);
- PTBF, XXIX Lubelskie Warsztaty Biofizyczne Kazimierz nad Wisłą, 23-24 maj 2024 r. W jaki sposób antybiotyk Amfoterycyna B dostaje się do błon komórkowych i co tam robi? (prezentacja, wystąpienie ustne).

b. Międzynarodowe:

- Methods and Application in Fluorescence, Szwecja, 11-14 września 2022 r. Spectroscopic Analysis of the Interaction of the Antibiotic Amphotericin B Conjugated with Silver Nanoparticles with Biomembranes (poster);
- Methods and Application in Fluorescence, Walencja, 8-11 września 2024 r. Spectroscopic studies on Amphotericin B modes of entry and activity in the lipid membrane (poster).

Udział w projektach naukowych:

- Udział w projekcie OPUS 17 pt. "Mechanizmy molekularne aktywności biologicznej antybiotyku przeciwgrzybiczego amfoterycyny B,, finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki; kierownik projektu prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki;
- Udział w projekcie MAESTRO pt. "Molekularne mechanizmy regulacji funkcji anten fotosyntetycznych roślin" finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki; kierownik projektu prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki;

- ZŁOŻONY DO OCENY NCN Kierownik w projekcie PRELUDIUM 23 NCN pt. „Aktywność biologiczna AmB: Czy kluczem jest dynamika interakcji z błoną komórkową?” opiekun naukowy projektu prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki.

Publikacje naukowe:

- Sebastian Janik, Rafał Luchowski, Ewa Grela, Wojciech Grudziński, and Wiesław I. Gruszecki, How Does the Antibiotic; Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There? (2024), artykuł, Journal of Physical Chemistry Letters, J. Phys. Chem. Lett. 2024, 15, 18, 4823–4827; DOI 10.1021/acs.jpcclett.4c00496
- Sebastian Janik, Ewa Grela, Sylwia Stączek, Agnieszka Zdybicka-Barabas, Rafał Luchowski, Wiesław I. Gruszecki and Wojciech Grudziński, Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes (2023), artykuł, Molecules, Molecules 2023, 28, 4687; DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28124687>
- Ewa Grela, Stączek Sylwia, Nowak Monika, Pawlikowska-Pawłęga Bożena, Zdybicka-Barabas Agnieszka, Janik Sebastian, Cytryńska Małgorzata, Grudziński Wojciech, Gruszecki Wiesław Ignacy, Luchowski Rafał. Enhanced Antifungal Activity of Amphotericin B Bound to Albumin: A “Trojan Horse” Effect of the Protein. The Journal of Physical Chemistry B, 2023 Apr; 127 (16):3632-3640; DOI: 10.1021/acs.jpcc.3c01168.

11 Oświadczenia współautorów publikacji

Prof. dr hab. Wiesław Gruszecki

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko wnioskodawcy)

OŚWIADCZENIE O WKŁADZIE WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oświadczam, że w pracy:

1. Janik Sebastian, Grela Ewa, Stączek Sylwia, Zdybicka-Barabas Agnieszka, Luchowski Rafał, Gruszecki Wiesław Ignacy, Grudziński Wojciech. Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes. *Molecules*, 2023 Jun; 28(12):4687. doi:10.3390/molecules28124687.

Mój udział polegał na:

- Wspólnym opracowywaniu koncepcji pracy
- Wspólnym planowaniu eksperymentów
- Wspólnej analizie wyników
- Wspólnym redagowaniu tekstu artykułu.

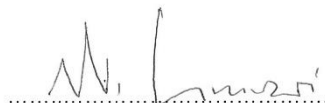
2. Janik Sebastian, Luchowski Rafał, Grela Ewa, Grudziński Wojciech, Gruszecki Wiesław Ignacy. How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2024 Apr; 15(18):4823-4827. doi:10.1021/acs.jpcelett.4c00496.

Mój udział polegał na:

- Wspólnym opracowywaniu koncepcji pracy
- Wspólnym planowaniu eksperymentów
- Wspólnej analizie wyników
- Wspólnym redagowaniu tekstu artykułu.

...Lublin, 29 sierpnia 2024 r.....

(miejsowość, dnia)



(podpis)

Dr hab. Rafał Luchowski, prof. UMCS

Katedra Biofizyki

**OŚWIADCZENIE
O WKŁADZIE WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI
WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Oświadczam, że w pracy:

1. Janik Sebastian, Grela Ewa, Stączek Sylwia, Zdybicka-Barabas Agnieszka, Luchowski Rafał, Gruszecki Wiesław Ignacy, Grudziński Wojciech. Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes. *Molecules*, 2023 Jun; 28(12):4687. doi:10.3390/molecules28124687.

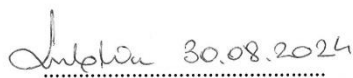
Mój udział polegał na:

- pomocy w pomiarach i interpretacji wyników FLIM

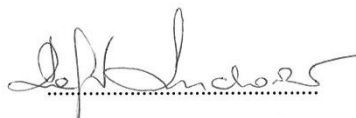
2. Janik Sebastian, Luchowski Rafał, Grela Ewa, Grudziński Wojciech, Gruszecki Wiesław Ignacy. How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2024 Apr; 15(18):4823-4827. doi:10.1021/acs.jpcclett.4c00496.

Mój udział polegał na:

- pomocy pomiarach i interpretacji wyników FLIM


.....

(miejsowość, dnia)


.....

(podpis)

dr Ewa Grela

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko wnioskodawcy)

**OŚWIADCZENIE
O WKŁADZIE WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI
WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Oświadczam, że w pracy:

1. Janik Sebastian, Grela Ewa, Stączek Sylwia, Zdybicka-Barabas Agnieszka, Luchowski Rafał, Gruszecki Wiesław Ignacy, Grudziński Wojciech. Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes. *Molecules*, 2023 Jun; 28(12):4687. doi:10.3390/molecules28124687.

Mój udział polegał na:

- pomocy w pomiarach i wprowadzenie w analizę wyników FLIM;
- udział w przygotowywaniu próbek.

2. Janik Sebastian, Luchowski Rafał, Grela Ewa, Grudziński Wojciech, Gruszecki Wiesław Ignacy. How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2024 Apr; 15(18):4823-4827. doi:10.1021/acs.jpcl.4c00496.

Mój udział polegał na:

- pomocy w pomiarach i wprowadzenie w analizę wyników FLIM;
- udział w przygotowywaniu próbek.

Ewa Grela

Lublin, 29 sierpnia 2024 r.

(miejsce, dnia)

.....

(podpis)

Dr hab. Agnieszka Zdybicka-Barabas

OŚWIADCZENIE
O WKŁADZIE WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI
WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oświadczam, że w pracy:

1. Janik Sebastian, Grela Ewa, Stączek Sylwia, Zdybicka-Barabas Agnieszka, Luchowski Rafał, Gruszecki Wiesław Ignacy, Grudziński Wojciech. Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes. *Molecules*, 2023 Jun; 28(12):4687. doi:10.3390/molecules28124687.

Mój udział polegał na:

- Pomocy w prowadzeniu hodowli komórek *Candida albicans*

lublin, 16.09.2024 r.
(miejsowość, dnia)

Agnieszka Zdybicka-Barabas
(podpis)

Dr Sylwia Stączek

**OŚWIADCZENIE
O WKŁADZIE WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI
WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Oświadczam, że w pracy:

1. Janik Sebastian, Grela Ewa, Stączek Sylwia, Zdybicka-Barabas Agnieszka, Luchowski Rafał, Gruszecki Wiesław Ignacy, Grudziński Wojciech. Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes. *Molecules*, 2023 Jun; 28(12):4687. doi:10.3390/molecules28124687.

Mój udział polegał na:

- Pomocy w prowadzeniu hodowli komórek *Candida albicans*
- Udziale w badaniach dotyczących przeżywalności komórek *C. albicans* metodą zliczania kolonii na płytkach z podłożem stałym.

.....
Rubiń, 16.09.2024

(miejscowość, dnia)

.....
Sylwia Stączek

(podpis)



KATEDRA
BIOFIZYKI

Dr hab. Wojciech Grudziński, prof. UMCS

**OŚWIADCZENIE
O WKŁADZIE WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI
WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Oświadczam, że w pracy:

1. Janik Sebastian, Grela Ewa, Stączek Sylwia, Zdybicka-Barabas Agnieszka, Luchowski Rafał, Gruszecki Wiesław Ignacy, Grudziński Wojciech. Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes. *Molecules*, 2023 Jun; 28(12):4687. doi:10.3390/molecules28124687.

Mój udział polegał na:

- wstępnej pomocy w pomiarach ramanowskich i wprowadzeniu w analizy wyników mikro-spektroskopowych rozproszenia Ramana;
- wspólnym planowaniu eksperymentów;
- wspólnym redagowaniu tekstu artykułu.

2. Janik Sebastian, Luchowski Rafał, Grela Ewa, Grudziński Wojciech, Gruszecki Wiesław Ignacy. How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2024 Apr; 15(18):4823-4827. doi:10.1021/acs.jpcllett.4c00496.

Mój udział polegał na:

- wspólnym planowaniu eksperymentów;
- wspólnym redagowaniu tekstu artykułu.

Lublin, 18 września 2024 r.


dr hab. Wojciech Grudziński

KATEDRA BIOFIZYKI
Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1, 20-031 Lublin
tel: (81) 537 62 50
fax: (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl