

Aleksandra Taraszkiewicz

Tytuł: Analiza mechanizmu inaktywacji fotodynamicznej *Candida albicans* z zastosowaniem pochodnych imidazoakrydyny jako związków fotouczulających.

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Bielawski

Promotor pomocniczy: dr Joanna Nakoneczna

Streszczenie

Candida albicans jest gatunkiem grzybów należącym do oportunistycznych patogenów człowieka. Kolonizuje powierzchnie błon śluzowych przewodu oddechowego, pokarmowego, moczowo-płciowego oraz skóry, nie wywołując infekcji u 50-70% zdrowych osób. Jednak w przypadku osłabionej odporności, długotrwałej antybiotykoterapii, stosowania cewników czy sztucznych zastawek, uszkodzenia skóry w wyniku oparzeń, ryzyko wystąpienia infekcji wzrasta. Infekcje wywołane *C. albicans* dzielą się na powierzchniowe (np. grzybica pochwy, jamy ustnej, paznokci) oraz głębokie (narządowe, np. grzybicze zapalenie wsierdza lub pęcherza moczowego). W wyniku inwazji grzyba do krwi dochodzi do rozwoju grzybicy systemowej, która stanowi zagrożenie dla życia pacjenta. Wśród pacjentów przebywających na oddziałach intensywnej terapii, szczepy *Candida* spp. zajmują czwarte miejsce wśród patogenów wywołujących zakażenia. W związku z coraz częściej pojawiającym się problemem braku efektywności terapii przeciwgrzybiczej, spowodowanym opornością mikroorganizmów na leczenie, poszukuje się alternatywnych metod walki z infekcjami. Jedną z nich może być inaktywacja fotodynamiczna (ang. Photodynamic inactivation, PDI), opierająca się na współdziałaniu trzech podstawowych czynników: światła, związku fotoaktywnego oraz tlenu. Związek fotoaktywny, absorbuje światło, w efekcie czego następuje przeniesienie elektronów ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego. Istnieją dwa typy reakcji fotodynamicznej. W typie I reakcji fotodynamicznej elektron ze wzbudzonego związku fotoaktywnego zostaje przeniesiony na substraty: biomolekuły (prowadząc do powstania np. rodników lipidowych), wodę (tworząc np. rodnik hydroksylowy HO·) lub tlen (tworząc anionorodnik ponadtlenkowy O₂⁻). Powstałe rodniki mogą bezpośrednio wpływać na uszkodzenie struktur komórkowych lub kwasu deoksyrybonukleinowego lub też podlegać procesowi dysmutacji. Reakcja fotodynamiczna typu II polega na przeniesieniu energii z cząsteczki fotouczulacza w stanie wzbudzonym, na tlen molekularny w stanie podstawowym. Dzięki temu powstaje tlen w stanie

wzbudzonym, o wyższej energii, zwany tlenem singletowym ($^1\text{O}_2$), który charakteryzuje się wysoką reaktywnością.

Pochodne imidazoakrydyny (IA) zsyntetyzowano po raz pierwszy przez grupę badaczy z Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem prof. Jerzego Konopy. Związki te zostały opracowane jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. Jedynym doniesieniem, związanym z biobójczą aktywnością IA zależną od światła, była obserwacja, iż komórki nowotworowe, które zakumulowały pochodne imidazoakrydyny w lizosomach po naświetlaniu, ulegały zniszczeniu. Fotoaktywacja imidazoakrydyn okazała się być bardzo obiecująca ze względu na potencjalne wykorzystanie tej właściwości do kontroli wzrostu mikroorganizmów będących patogenami człowieka.

Celem niniejszej pracy była analiza związków z grupy imidazoakrydyn w inaktywacji fotodynamicznej *Candida albicans*, m.in. określenie ich właściwości fotouczulających, typu reakcji fotodynamicznej oraz wpływu parametrów naświetlania na efektywność PDI. Ponadto, w ramach przedstawianej pracy zbadano akumulację IA w komórkach *C. albicans*, określono rodzaju śmierci komórkowej będącej efektem PDI, a także możliwość indukcji oporności na PDI. W pracy wykorzystano trzy szczepy referencyjne oraz szczepy kliniczne *C. albicans*. Uzyskane wyniki wykazują, że efektywność PDI różni się w zależności od zastosowanej pochodnej IA, a także szczepu (różnica widoczna jest zarówno wśród szczepów referencyjnych jak i klinicznych). Wykazano, że zarówno typ I (fotogeneracja rodników) jak i II (generacja tlenu singletowego) reakcji PDI może odpowiadać za efekt biobójczy podczas zastosowania IA jako związku fotouczulającego. Dodatkowo wykazano, że efektywność PDI jest zależna od mocy zastosowanego światła i w przypadku PDI z zastosowaniem IA, najlepsze wyniki uzyskano podczas stosowania średniej mocy światła ($7\text{mW}/\text{cm}^2$). Ponadto wykazano, że *C. albicans* ulega apoptozie w wyniku traktowania PDI. Sekwencyjne traktowanie komórek *C. albicans* subletalnymi dawkami światła i związku fotouczulającego wykazało zmiany w odpowiedzi na reakcję fotodynamiczną. Nie zaobserwowano natomiast wytworzenia form opornych. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że akumulacja IA jest niezbędna, jednak nie jest jedynym czynnikiem efektywnej reakcji PDI. Nie zaobserwowano jednoznacznej korelacji pomiędzy efektywnością PDI, a akumulacją IA, wydajnością generacji tlenu singletowego lub wolnych rodników.