
ВИВЧЕННЯ АНТИГРИБКОВИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ТЕРБІНАФІНУ ТА БЕНЗОІЛПЕРОКСИДУ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО БІОПЛІВОК *CANDIDA SPP*

Н.М. Іванова, Г.І. Мавров, М.І. Зуєва, О.В. Коцар О.В.

ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України»

Резюме. *Антигрибкова активність ліпосомальних тербінафіну та бензоїлпероксиду у відношенні біоплівок грибів *Candida albicans* вище інтактних препаратів у 8 разів. Тербінафін та бензоїлпероксид проявляють синергізм по відношенню до біоплівок *Candida albicans*. Дія ліпосомальних тербінафіну та бензоїлпероксиду на біоплівку грибів *Candida* призводить до пригнічення експресії гену *MET3* та інгібуванню процесу утворення біоплівки.*

Ключові слова: *тербінафін, бензоїлпероксид, ліпосоми, біоплівки *Candida albicans*, ген *MET3*.*

ВСТУП

Антибіотикотерапія і механізми природного захисту макроорганізму часом неспроможні перед інфекціями, що супроводжуються розвитком біоплівок. *Candida albicans* є одним з найбільш небезпечних диморфних грибів, патогенних для людини. Спосіб існування мікроорганізмів у виді біоплівок створює великі проблеми в медичній практиці, у зв'язку з тим, що в складі біоплівок гриби більш стійкі до антибактеріальних препаратів. На прикладі *C. albicans* було показано, що для інгібування метаболічної активності у біоплівках, необхідна в 30-2000 разів більш висока концентрація антимікотиків, чим їх мінімально гнітюча концентрація для планктонних кліток [1].

Утворення біоплівок значною мірою пов'язано із процесами фіксації мікроорганізмів на твердій поверхні або їх зв'язування між собою. Ці складні процеси відбуваються за рахунок активації ряду біохімічних процесів і супроводжуються зміною експресії багатьох генів, що відображує зміни процесів життєдіяльності під час утворення складних багатоклітинних асоціацій [2].

Ген *MET3* - один із ключових генів, що контролюють утворення біоплівок. Кодований цим геном білок є одним із ключових у регуляції обміну сірки в клітці. Тому доцільно було б вивчити зв'язок активності даного гена у біоплівках після взаємодії з антигрибковими препаратами та їх ліпосомальними формами.

Дослідження впливу протигрибкових препаратів на процеси утворення біоплівок до цього часу обмежувалось визначенням переважно морфологічних показників, які недостатньо характеризують зміни процесу життєдіяльності під впливом антимікотиків.

У зв'язку з надзвичайною високою стійкістю біоплівок до антимікробних препаратів, повинні істотно мінятися принципи проведення антимікробної терапії. Нові підходи до лікування інфекцій, що протікають з утворенням біоплівок, можуть включати створення нових лікарських форм антимікробних препаратів на основі нанотехнологій.

Основними достоїнствами ліпосом (лс) у цьому відношенні вважаються їхні здібності:

- доставляти субстанцію усередину клітки (тому що ліпосоми і клітинні мембрани побудовані, в основному, з речовин ліпідної природи);
- охороняти вміст ліпосоми від дії ферментів і захисних систем і, таким чином, збільшувати концентрацію лікарської субстанції в організмі хворого;
- знижувати імуногенність субстанції;
- забезпечувати поступове вивільнення лікарської речовини.

Для отримання ліпосомальних антимікробних препаратів ми зупинилися на тербінафіні (ТФ) та бензоілпероксиді (БП). Це обумовлено наступним. ТФ є одним із найбільш ефективних. Він відноситься до похідних аліламінів. По своїй антимікотичній дії на багато видів грибів ТФ перевершує всі інші антимікотичні препарати: полієнові антибіотики, азоли (похідні імідазола -клотримазол, кетоконазол та інші., а також більш нові і менш токсичні тріазоли першого покоління - інтраконазол, флуконазол і ехінокандиди.

Найбільш чутливими до нього є гриби родини *Trichosporum*, *Microsporium*, *Epidermophyton*, *Aspergillus fumigatus*, *Sporothrix schenckii*, *Malassezia* spp. Трохи менш чутливими до ТФ є гриби *Candida* spp., тобто дерматофіти, які можуть утворювати біоплівки [3].

БП сам володіє широким спектром антимікробної дії. Він активний по відношенню як бактерій, так і грибів, в тому разі й резистентних до антимікотиків, що особливо важливо при лікуванні змішаних інфекцій [4, 5].

Мета дослідження даної роботи - отримання ліпосомальних форм антимікотичних препаратів на прикладі тербінафіну та бензоілпероксиду, вивчення їх антимікотичних властивостей зокрема та в комбінації по відношенню до біоплівок *Candida albicans*. Проведення досліджень змін експресії генів, пов'язаних з утворенням біоплівок, і, зокрема, гену MET3 під час дії ліпосомальних антимікробних препаратів на ранні стадії утворення біоплівок грибами *Candida albicans*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Штам *Candida albicans* NCTC 885/653 було отримано із ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України", Київ. У роботі також використовували: субстанцію антигрибкового препарату тербінафіну гідрохлориду («Hetero Labs Limited», Індія) та субстанцію бензоіл пероксиду («Aldrich» США), середовище Сабуро (фірма Н. Media, Індія), середовище ДПДЕ, 0,1% фосфатно-сольовий буфер (ЗФР-твін), ДМСО (Росія). У роботі були використані: спиртовий 10% розчин яєчного лецитину (Україна; «Біолек»), ДМСО (Росія). Для виділення РНК використовували зворотну транскриптазу М-MLV (Сібензим, Росія), ріболок (Fermentas, Латвія), Таq-полімераза (Сібензим, Росія).

Одержання біоплівок *Candida albicans*. Формування біоплівок визначали за методом [6]. *Candida albicans* (*C. albicans*) культивували на середовищі, що містить декстрозу (2%), пептон (2%), дріжджовий екстракт (1%) (середовище ДПДЕ), збирали центрифугуванням, відмивали стерильним ЗФР.106 грибних елементів *C. albicans* вносили у плоскодонні планшети для імунологічних досліджень та інкубували при 34°C протягом 48 годин. Біоплівки, що утворювалися, 3 рази відмивали

стерильним ЗФР. Залишок ЗФР видаляли смужкою фільтрувального паперу.

Одержання ліпосом (лс) - лс одержували методом випарювання ліпідів на вакуумному ротаційному випарювачі (Vakuum-Rotation, Німеччина) з наступним суспендуванням у забуференому фізіологічному розчині з рН 7,4 і озвучуванням на диспергаторі УЗДН-А (Росія). Озвучування лс проводили при охолодженні до 2-4 С.

Одержання ліпосомальної форми антигрибкових препаратів - субстанції тербінафіну гідрохлориду та бензоїлпероксиду розчинялися у хлороформі в зв'язку з їх поганою розчинністю у водяних розчинах і додавалися до спиртових або хлороформних розчинів ліпідів у співвідношенні антигрибковий препарат: ліпіди 1:20. Далі суміш випарювали й одержували лс, як зазначено вище.

Визначення розміру ліпосом - розмір лс визначали методом турбодиметрії за виміром оптичної щільності ліпідної суспензії в діапазоні хвиль 450 - 700 нм і обчисленню логарифмів довжин хвиль і відповідних логарифмів ліпосом [7]

Ефективність антифунгальної дії тербінафіну та бензоїл пероксиду та їх ліпосомальних форм по відношенню біоплівки *C.albicans* визначали за допомогою методу checkerboard. Антигрибкові та антимікробні препарати розводили методом серійних розведень середовищем ДПДЕ в плоскодонних планшетах, додавали до 2-х добових біоплівок, інкубували протягом 24 годин. Контролем була культура *C.albscans* без антимікотиків. Після цього біоплівки відмивали від препаратів, руйнували центрифугуванням та визначали РНК у всіх зразках.

Виділення РНК із біоплівок. Через 5 або 24 години інкубації антимікотиків з біоплівками відбиралися планктонні клітини, біоплівки промивалися від препарату та планктонних клітин та ретельно знімалися зі дна чашки за допомогою стерильного гумового шпателя. Теж саме проводили і з контрольною культурою. На цьому етапі визначали

експресію гену MET3 як в планктонних клітинах, так і фіксованих на твердій фазі біоплівок грибів *Candida*. Виділення РНК із біоплівок було проведено фенольним методом [8]. Отримані зразки РНК піддавали реакції зворотної транскрипції для одержання кДНК [9]. Клітини гомогенізували в гуанідиновому реагенті, після чого розчин тричі екстрагували кислим фенолом і хлороформом, осаджували етанолом і розчиняли у воді. Для постановки реакції використовувалася зворотна транскриптаза M-MLV. Для постановки реакції використовувалася зворотна транскриптаза M-MLV (Сібензим, Росія), риболок (Fermentas, Латвія), праймери pmet3:5 '- ACACCTGAGTTGACTCCA-3' / 5'- ACACCTGAGTTGACTCCA-3', трифосфати (2). Для постановки реакції використовувалася зворотна транскриптаза M-MLV (Сібензим, Росія). Далі, після одержання кДНК, проводилася полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) на фрагмент гена MET3 із зазначеними вище праймерами і Taq-полімеразой (Сібензим, Росія).. ПЛР проводили з використанням ампліфікатору «Терцик» (Росія). Режим ампліфікації (для мутації 2282del4) включав температурний режим: 1 цикл 500С 30 хв., 950С 2 хвилини., 35 циклів 940С 15 секунд., 950С 15 секунд., 500С 30 секунд, і 1 цикл 720С 1 хвилини. Продукти ПЛР аналізували електрофорезом в 1,0% агарозному гелі і досліджували на транслюмінаторі при світлі довжиною 310 нм. Позитивна реакція визначалася появою амплікону - фрагменту гену MET3 довжиною 295 нм. Наявність або відсутність експресії гена MET3 визначалося по наявності або відсутності амплікону, фрагменту гену MET3.

ОТРИМАНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Раніше нами було показано, що у ліпосомі на основі яєчного лецитину при співвідношенні тербінафін : ліпіди 1:10 включається до 70% тербінафіну, а при співвідношенні 1:20 - до 99% [10].

Тому, для вивчення можливості інгібування утворення біоплівок *S.albicans*, а також вивчення МПК ліпосомальних тербінафіну та бензоілпероксиду була використана 2% дисперсія лецитинових лс із розміром часток 180 - 200 нм і співвідношенням ТФ: лецитин 1:20 та 2% дисперсія негативно заряджених лс із розміром часток 180 - 200 нм і співвідношенням БП: лецитин 1:20.

Після 24 годин інкубування біоплівок з антимікотиками ТФ та БП, а також їх ліпосомальними формами зокрема та разом в усіх лунках усіх препаратів була перевірена наявність РНК, що транскрибується з гену MET3, що вказує на експресію цього гену. Відсутність амлікону, фрагменту гену MET3 свідчила про інгібування дії біоплівок. У зраз-

ках препаратів, МПК яких приведені на рис №1 була відсутня РНК (відсутній амлікон), що свідчило про відсутність експресії гену MET3 та про інгібування дії біоплівок. У той же час у контролі (при відсутності антимікотичних препаратів) була присутня РНК, що свідчило про наявність експресії гену MET3.

У результаті визначення МПК ліпосомальних препаратів, було знайдено, що Лс, отримані на основі яєчного лецитину і ТФ більш ефективні у відношенні біоплівок *S. albicans* в порівнянні з МПК інтактного ТФ у 8 разів у відношенні біоплівок *S. albicans* (рис. 1, №2). Лс, отримані на основі яєчного лецитину і БП, були також більш ефективні в порівнянні з МПК інтактного БП у 8 разів у відношенні біоплівок *S. albicans* (рис. 1, №4).

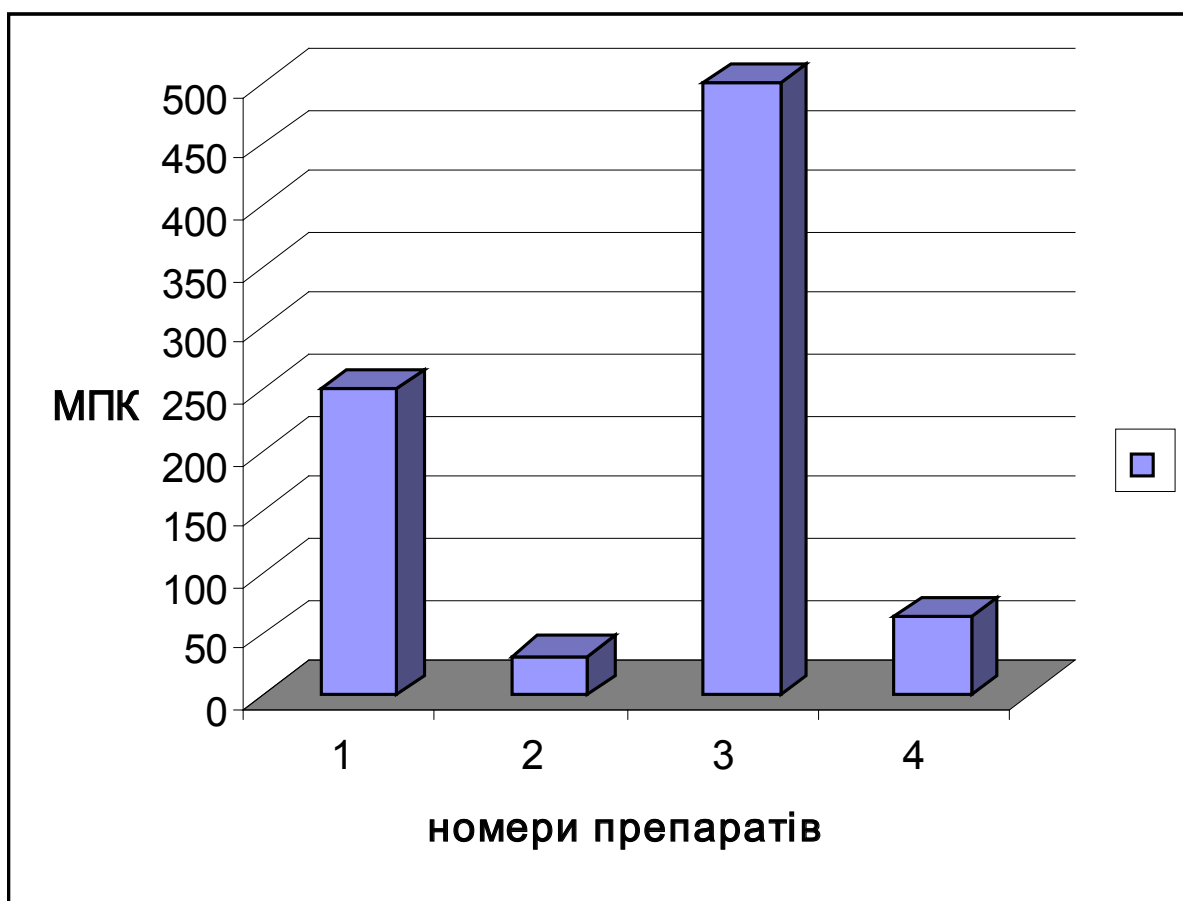


Рис.1 Мінімально інгібуюча концентрація тербінафіну, бензоілпероксиду та їх ліпосомальних форм

Умовні позначення: №1- тербінафін, №2- ліпосомальний тербінафін, №3-бензоілпероксид, №4- ліпосомальний бензоілпероксид

Дію ТФ та БП відокремо та в комбінації вивчали методом checkerboard. Особливістю методу checkerboard є те, що при вивченні комбінованого ефекту ТФ вноситься від більшої концентрації (лунка № 1) послідовно до меншої концентрації (до лунки 11, лунка 12 - контроль - культура гриба без антимікотика), а БП більша концентрація - в лунку №11, а зменшені концентрації - вплоть до лунки № 1. Розраховується МПК для ТФ і БП окремо та в комбінації. Визначається фракційний індекс інгібуючої концентрації ФІК по формулі:

$ФІК = \frac{МПК\ ТФ\ в\ комбінації}{МПК\ ТФ\ одного + МПК\ БП\ в\ комбінації}$ / $\frac{МПК\ ТФ\ одного}{МПК\ БП\ одного}$.

При цьому якщо $ФІК < 0,5$ - значить відзначається синергізм дії, якщо $ФІК 0,5 - < 1,0$ - адитивність, якщо $ФІК 1,0 - < 4,0$ - індиферентність та якщо $ФІК \geq 4,0$ - антагонізм.

Дані, отримані по визначенню МПК ТФ і БП зокремо й у комбінації по визначенню наявності або відсутності експресії гену MET3 відображені в таблиці 1.

Таблиця 1.

Ефективність антифунгальної дії тербінафіну і бензоілпероксиду по відношенню до біоплівки C.albicans 885

МПК в мкг/мл			ФІК	Ефект комбінованого застосування
Тербінафін	Бензоілпероксид	Тербінафін + бензоілпероксид		
250,0	500,0	31,2+15,6	0,156	синергізм

Дані таблиць вказують на те, що БП являється високо ефективним по відношенню до біоплівки C.albicans 885 і в комбінації з ТФ володіє синергізмом антимікробної активності та більш широким спектром дії по відношенню грибів, чим кожен з препаратів відокремо. Це обумовлено суттєвим збільшенням вільних радикалів, які мають антимікробну дію та з'являються при хімічній взаємодії БП з проізоводними аліламінів. Такий механізм дії пояснює важливу властивість БП подавляти ріст не тільки антибіотикочутливих, але й антибіотикорезистентних мікроорганізмів. [11, 12].

Таким чином, отримані дані показують, що комбінування ТФ і БП є високоефективним стосовно біоплівки C.albicans і свідчить про можливість застосування ТФ і БП при лікуванні шкірних форм кандидозу

Крім того, під дією ТФ та БП та їх ліпосомальних форм зокрема та разом відбувається пригнічення процесу утворення біоплівки, проявлення якого було відкріплення клітин від твердої фази (дезінтеграція біоплів-

ки) одночасно із блокуванням експресії гену MET3. Вже після 5 годин інкубації з ТФ з біоплівками, визначалось збільшення кількості клітин у розчині, але треба відзначити, що клітини, що відкріпились від біоплівки під впливом препарату, ще зберігали ознаки життєздатності, що було підтверджено висівом їх на щільне поживне середовище. Після 24 годин інкубування біоплівки з антимікотиками ТФ та БП та їх ліпосомальними формами зокрема та разом була відсутня РНК. Можна зробити висновок, що дія ТФ, БП та їх ліпосомальних форм на біоплівку грибів Candida досить швидко призводить до пригнічення експресії гену MET3.

ВИСНОВКИ:

1. Встановлено, що мінімально інгібуюча концентрація ліпосомальної форми тербінафіну та ліпосомальної форми бензоілпероксиду з нейтральним зарядом (лецитинові ліпосоми) зменшувалося у порівнянні з інтактним тербінафіном та інтактним бензоілпероксидом у 8 разів.

2. Показано, що тербінафін та бензоілпероксид проявляють синергізм по відношенню до біоплівок *Candida albicans*.

3. Встановлено, що дія тербінафіну та бензоілпероксиду та їх ліпосомальних форм на біоплівку грибів *Candida* призводить до

пригнічення експресії гену MET3.

4. Комбінування тербінафіну та бензоілпероксиду є високоефективним стосовно біоплівок *Candida albicans* і свідчить про можливість їх застосування при лікуванні шкірних форм кандидозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Douglas L.J. *Candida* biofilms and their role in infection//Trends Microbiol.- 2003.-Vol.11, № 1.-P.30-36.

2. 8. Parsek M.R., and Greenberg E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. // Trends Microbiol. – 2005.-V.13.- № 1.-P.27-33.

3. Белозоров А.П. Преимущества применения тербинафина при лечении микозов // Провизор –2008. - № 9. – С.12-14

4. Tanghetti EA, Popp KF. A current review of topical benzoyl peroxide: New perspectives on formulation and utilization. *Dermatol Clin.* 2009. - V. 27.- P. 17-24.

5. Tanghetti E. The evolution of benzoyl peroxide therapy. *Cutis.* 2008. - V.82.-P. 5 - 11.

6. Романова Ю.М., Алексеева Н.В.,Смирнова Т.Ф. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium*// Журнал микробиол. – 2006.- № 4- С.38-42.

7. Фосфолипиды. Методы их выделения, обнаружения и изучения физико- химических свойств липидных дисперсий в воде. Учебно- методическое пособие по биоорганической химии./ Под. ред. Г.М. Сорокоумова, А.А. Селищева, А.П.. Каплун. М.- 2000.-105 с.

8. http://molbiol.ru/protocol/15_01.html.

9. Murillo LA, Newport G, Lan CY et.al. Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans* // *Eukaryot Cell.* – 2005.- V. 4,- N 9. – P. 1562-1573.

10. Н.М. Иванова, В.М. Васильченко. Антигрибкова активність ліпосомального тербінафіну//Медична хімія.- 2010.-Т.12.-№1. С .46-51.

11. Burkhart C.G., Burkhart C.N. and Isham N. Synergistic antimicrobial activity by combining an allylamine with benzoyl peroxide with expanded coverage against yeast and bacterial species // *British J. Dermat.* – 2006. - V. 154.- № 2. – P. 341-344.

12. Burkhart C.G. and Burkhart C.N. Treatment of acne vulgaris without antibiotics: tertiary amine-benzoyl peroxide combination vs. benzoyl peroxide alone (Proactive Solution™) // *Internat. J. Dermat.* – 2007. – V. 46.- № 1. – P. 89-93

**ИЗУЧЕНИЕ
АНТИГРИБКОВЫХ
СВОЙСТВ
ЛИПОСОМАЛЬНЫХ
ТЕРБИНАФИНА
И БЕНЗОИЛПЕРОКСИДА
ПО ОТНОШЕНИЮ
К БИОПЛЕНКАМ
CANDIDA SPP.**

**Н.Н. Иванова, Г.И. Маевров,
М.И. Зуева, Е.В. Коцар**

РЕЗЮМЕ. Антигрибковая активность липосомальных тербинафина и бензоилпероксида в отношении биопленок грибов *Candida albicans* выше интактных препаратов в 8 раз. Тербинафин и бензоилпероксид проявляют синергизм в отношении биопленок *Candida albicans*. Действие липосомальных тербинафина и бензоилпероксида на биопленки грибов *Candida* приводит к угнетению экспрессии гена *MET3* и ингибированию процесса образования биопленок.

Ключевые слова: тербинафин, бензоилпероксид, липосомы, биопленки *Candida albicans*, ген *MET3*.

**STUDYING
OF THE ANTIFUNGAL
PROPERTIES
OF THE LIPOSOMAL
TERBINAFINE
AND BENZOYL PEROXIDE
CONCERNING
OF *CANDIDA SPP*
BIOFILM**

**N.N. Ivanova, G.I. Mavrov,
M.I. Zujeva, E.V. Kotsar**

RESUME. The antifungoid activity of the liposomal terbinafine and benzoyl peroxide concerning the biofilm *Candida albicans* above terbinafine and benzoyl peroxide in 8 times. Terbinafine and benzoyl peroxide show the synergism concerning of the biofilm *Candida albicans*. The action of liposomal terbinafine and benzoyl peroxide on the *Candida albicans* biofilm leads to leads to the inhibition of gene *MET3* expression and to inhibition of the biofilm formation process

Keywords: terbinafine, benzoyl peroxide, the liposomes, the biofilm *Candida albicans*, gene *MET3*.