

## ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ АНТИМІКОТИКІВ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНУ MET3 У БІОПЛІВЦІ ГРИБІВ CANDIDA SPP

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

ДУ "Інститут дерматології та венерології АМН України"  
(Харків)

### Вступ

За даними національного інституту здоров'я США в зовнішнім середовищі 99,9% усіх мікроорганізмів здатні утворювати біоплівки, в організмі людини близько 80% мікробних інфекцій також можуть протікати з утворенням біоплівок [6].

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 активності ряду біохімічних процесів і супроводжуються зміною експресії багатьох генів, що відображає зміни процесів життєдіяльності під час утворення складних багатоклітинних асоціацій [8].

Ранні стадії утворення біоплівок *C. albicans* характеризуються адгезією клітин до субстрату, після чого з'являється складна сітка гіфів і починає формуватись щільна міжклітинна структура. Вже через 30 хвилин після контакту клітин з субстратом відбувається значні зміни транскриптому, до найбільш показових серед яких належить експресія гену MET3, пов'язаного з метаболізмом сірки.

Ген MET3 - один із ключових генів, що контролюють утворення біоплівок. Кодований цим геном білок є одним із ключових у регуляції обміну сірки в клітці. MET3 також грає дуже важливу, хоча і невідому поки роль у вірулентності і рості біоплівки. Тому доцільно було б вивчити зв'язок активності даного гена у біоплівках після взаємодії з антигрибковими препаратами. Дослідження впливу протигрибкових препаратів на процеси утворення біоплівок до цього часу обмежувалось визначенням переважно мор-

фологічних показників, які недостатньо характеризують зміни процесу життєдіяльності під впливом антимікотиків.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота пов'язана з виконанням НДР Ф.07.09, № державної реєстрації 0109U002511.

Метою даної роботи з'явилось проведення досліджень змін експресії генів, пов'язаних з утворенням біоплівок, і, зокрема, гену MET3 під час дії антигрибкових 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 бензоїлпероксиду ("Aldrich" США) середовище Сабуро (фірма Н. Media, Індія), середовище ДПДЕ, 0,1% фосфатно-сольовий буфер (ЗФР-твін), ДМСО (Росія).

**Одержання біоплівок *Candida albicans*.** Формування біоплівок визначали за методом [2]. *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.

Ефективність антифунгальної дії тербінафіну та бензоїлпероксиду по відношенню біоплівок *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 5 - 24 годин. Контролем була культура *C. albicans* без антимікотиків. Після цього біоплівки відмивали від препаратів, висівали на щільне середовище Сабуро для підрахунку кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) і визначення мінімально пригнічуючої концентрації

(МПК) за ступенем мутності на мультискані при довжині хвилі 450 нм. Паралельно відмиті біоплівки руйнували центрифугуванням та визначали РНК у всіх зразках.

**Виділення РНК із біоплівок.** Через 5 та 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 [5]. Отримані зразки РНК піддавали реакції зворотної транскрипції для одержання кДНК [7]. Клітини гомогенізували в гуанідиновому реагенті, після чого розчин тричі екстрагували кислим фенолом і хлороформом, осаджували ізопропанолом і розчиняли у воді. Для постановки реакції використовувалася зворотна транскриптаза M-MLV (Сібензим, Росія), риболок (Fermentas, Латвія), праймери  $prmet3:5' \text{ - ACACCTGAGTTGACTCCA-3' / } 5' \text{ - ACACCTGAGTTGACTCCA-3'}$ , трифосфати. 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 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 хвилина. 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 гена MET3.

#### Отримані результати та їх обговорення

Серед антимікотиків ми зупинилися на тербінафіні та бензоїлпероксиді. Це обумовлено наступним. Тербінафін (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 [1]. Бензоїлпероксид (БП) сам володіє широким спектром антимікробної дії. Він активен по відношенню як бактерій, так і грибів, в тому разі й резистентних до антимікотиків, що особливо важливо при лікуванні змішаних інфекцій [9, 10].

Дію ТФ та БП окремо 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:

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

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

Дані, отримані по визначенню МПК ТФ і БП зокремо й у комбінації як по визначенню оптичної щільності, так і по життєздатності клітин грибі, збігалися і відображені в таблиці 1.

Дані таблиці 1 вказують на те, що БП являється високо ефективним по відношенню до біоплівок *S.albicans* 885 і в комбінації з ТФ володіє синергізмом антимікробної активності та більш широким спектром дії по відношенню грибів, чим кожен з препаратів відоремо. 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. [3,4].

Таблиця 1

**Ефективність антифунгальної дії ТФ і БП по відношенню до біоплівок *C.albicans* 885**

МПК в мкг/мл			ФПК	Ефект комбінованого застосування
ТФ	БП	ТФ+БП		
250,0	500,0	31,2+15,6	0,156	синергізм

Оскільки ген MET3 є одним із ключових генів, що контролюють утворення біоплівок, нами був вивчений зв'язок активності даного гена у біоплівках під дією антигрибкових препаратів. В зразках біоплівок, що були піддані дії тільки тербінафіну на протязі 5 годин, визначалось значне зменшення фіксованих до пластика клітин, до 20% клітин находились у розчині і лише 70-80% залишались фіксованими до поверхні пластику.

Позитивний результат реакції було отримано лише у зразках клітин, фіксованих до пластику. Таким чином, під дією ТФ та БП зокрема та разом відбувається пригнічення процесу утворення біоплівки, проявленням якого є відкріплення клітин від твердої фази (деінтеграція біоплівки) одночасно із блокуванням експресії гену MET3. Вже після 5 годин інкубації з препаратом 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 біоплівок з антимікотиками ТФ та БП зокрема та разом в усіх лунках усіх препаратів була перевірена наявність РНК, що транскрибується з гену MET3, що вказує на експресію цього гену. У зразках препаратів, МПК яких приведені в таблиці №1 була відсутня РНК, у той час як при зменшенні МПК ТФ і БП, а також у контролі була присутня РНК, що свідчило про наявність експресії гену MET3. Можна зробити висновок, що дія ТФ та БП на біоплівку грибів *Candida* досить швидко призводить до пригнічення експресії гену MET3.

Таким чином, отримані дані показують, що комбінування ТФ и БП є високоефективним стосовно біоплівок *C.albicans* і

свідчить про можливість застосування ТФ и БП при лікуванні при лікуванні шкірних форм кандидозу.

## Висновки

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

2. Встановлено, що дія тербінафіну та бензоілпероксиду на біоплівку грибів *Candida* призводить до пригнічення експресії гену MET3.

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

4. В перспективі подальших досліджень: визначити вплив ліпосомальних форм тербінафіну та бензоілпероксиду на експресію гену MET3 біоплівки грибів *Candida albicans*.

## Література

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

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

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

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

5. Выделение RNA из культуры клеток [Электронный ресурс]. - Режим доступа: [http://molbiol.ru/protocol/15\\_01.html](http://molbiol.ru/protocol/15_01.html).

6. Lewis K. Riddle of biofilm resistance / K.Lewis // Antimicrob. Agents Chemother. - 2001. - V. 45, № 4. - P. 999-1007.

7. *Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by Candida albicans* / L.A. Murillo, G. Newport, C.Y. Lan [et.al.] // *Eukaryot Cell*. - 2005. - V. 4, № 9. - P. 1562-1573.

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

9. Tanghetti E.A. *A current review of topical benzoyl peroxide: New perspectives on formulation and utilization* / E.A. Tanghetti, K.F.Popp // *Dermatol Clin.* 2009. - V. 27. - P. 17-24.

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

#### Резюме

**Іванова Н.М., Мавров Г.І., Зуєва М.І., Коцар О.В., Частий Т.В.**  
*Визначення впливу антимікотиків на експресію гену MET3 у біоплівці грибіє Candida spp.*

Показано, що тербінафін та бензоїлпероксид проявляють синергізм по відношенню до біоплівок *Candida albicans*. Найдено, що під дією тербінафіну та бензоїлпероксиду зокрема та разом відбувається пригнічення процесу утворення біоплівки. Встановлено, що дія тербінафіну та бензоїлпероксиду на біоплівку грибів *Candida* призводить до пригнічення експресії гену MET3.

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

#### Резюме

**Іванова Н.Н., Мавров Г.И., Зуева М.И., Коцар Е.В., Частий Т.В.**  
*Определение влияния антимикотиков на экспрессию гена met3 в биопленке грибов Candida spp.*

Показано, что тербинафин и бензоилпероксид проявляют синергизм по отношению к биопленкам *Candida albicans*. Найдено, что под действием тербинафина и бензоил пероксида отдельно и вместе происходит угнетение процесса образования биопленки. Установлено, что действие тербинафина и бензоилпероксида на биопленку грибов *Candida* приводит к угнетению экспрессии гена MET3.

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

#### Summary

**Ivanova N.N., Mavrov G.I., Zujeva M.I., Kotsar E.V., Chastij T.V.**  
*Definition of influence of the antifungal preparations on gene MET3 expression in the biofilm of Candida spp.*

It is shown, that terbinafine and benzoyl peroxide show of the synergism in relation to *Candida albicans* biofilms. It is found, that under the action of terbinafine and benzoyl peroxide separately and together there is the oppression of process of the biofilms formation. It is established, that the action of terbinafine and benzoyl peroxide on the *Candida* biofilms leads to the inhibition of gene MET3 expression.

**Key words:** terbinafine, benzoyl peroxide, biofilm *Candida albicans*, gene MET3.

**Рецензент: д.мед.н., проф. В.Д.Лук'янчук**

## ПОРІВНЯННЯ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ДІЇ КОМБІНОВАНИХ ВІТЧИЗНЯНИХ МАЗЕЙ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГНІЙНИХ РАН

Л.Б. Іванчик, Я.О. Бутко, Л.О. Булига

Національний фармацевтичний університет (Харків)

### Вступ

Рановий процес - це складний комплекс біологічних реакцій організму, спрямований на відновлення структури та функцій пошкоджених тканин. Пусковим моментом його розвитку є альтерація тканин під дією механічних, фізичних, хімічних та ін. факторів і мікробна інвазія. З позицій загальної патології рановий процес являє собою окремий випадок запалення, який проявляється поєднанням місцевих деструктивно-запальних змін і загальних реакцій [3, 11].

Класифікація фаз протікання ранового процесу включає фазу запалення, регенерації (проліферації та дозрівання грануляційної тканини) та перебудови рубця й епітелізації [4].

У першій фазі, в результаті руйнування тканинних структур вивільняються біогенні аміни (гістамін, серотонін) та фактор Хагемана, які сприяють трансформації калікреїногенів в калікреїн, останній каталізує перетворення кініногенів плазми крові в кініні, призводить до локального накопичення гідролітичних ферментів лізосом, що руйнують цитоплазматичні мембрани клітин, запускають каскад реакцій перетворення арахідонової кислоти та синтез медіаторів запалення - простагландинів, лейкотрієнів, простагланцинів [8, 9]. Накопичення медіаторів запалення в місці пошкодження призводить до міграції клітин імунної системи - нейтрофілів, моноцитів, лімфоцитів та розвитку гнійно-некротичних змін у тканинах [5].

На початковому етапі лікування ран при виборі препаратів необхідно звертати увагу на наявність протизапального компонента дії. Найбільш широко для терапії ранового процесу використовуються м'які лікарські засоби комбінованої дії, які