

АНТИГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ТЕРБИНАФИНА В ОТНОШЕНИИ БИОПЛЕНОК CANDIDA ALBICANS

Н.Н. Иванова, В.Н. Васильченко, А.П. Белозеров

ГУ «Институт Дерматологии и Венерологии АМН Украины», Харьков

Резюме. В результате определения минимально ингибирующей концентрации (МПК) липосомального тербинафина в отношении биопленок *Candida albicans* было найдено, что МПК липосомальной формы тербинафина снижалось в сравнении с МПК интактного тербинафина в 4–8 раз. Липосомы, полученные на основе яичного лецитина и тербинафина были более эффективны в отношении биопленок *C. albicans* при увеличении концентрации лецитина. Введение в культуральную среду биопленок *C. albicans* аутоиндуктора грибов фарнезола и липосомальной формы тербинафина приводило к повышению их чувствительности к тербинафину в 16 раз.

Ключевые слова: биопленки *Candida albicans*, МПК, лецитин, липосомы, тербинафин, фарнезол.

ВВЕДЕНИЕ

Последнее десятилетие характеризуется постепенным пересмотром наших представлений о микроорганизмах как одноклеточных образованиях. Все больше накапливается данных в пользу того, что они представляют собой целостные «сверхорганизмы», ведущие социальный образ жизни. Со сложной многоуровневой социальной организацией, направленной на выживание микроорганизмов в постоянно меняющейся агрессивной среде. Ключевым фактором, обеспечивающим сохранение вида, являются биопленки [1].

Во внешней среде около 99,9% всех организмов способны образовывать биопленки. В организме человека 70–80% бактериальных инфекций, особенно это касается хронических, персистирующих, также сопровождается образованием биопленок [2].

Биопленки представляют собой уникальные образования, состоящие из живых клеток (около 15%), погруженных в виде микроколоний в экзополимер – полисахаридный матрикс (на долю которого приходится около 85% объема) [3].

Матрикс, продуцируемый клетками в биопленках, обеспечивает физическую защиту клеток от факторов иммунной системы (антитела, макрофаги), от бактериофагов, затрудняет и за-

медляет проникновение антибиотиков, что способствует высокой резистентности к ним.

Биопленки образуют как бактерии, так и грибы. Среди грибов особое место занимают инфекции, вызываемые *Candida spp.* и, прежде всего, *Candida albicans*, на долю которого приходится свыше 10% случаев септицемий и, который, как причина смертности, занимает 2 место среди возбудителей так называемых катетерассоциированных инфекций [4, 5], что обусловлено их чрезвычайно высокой резистентностью к антимикотикам. Так, для подавления метаболической активности биопленок *C. albicans* необходима в 30–2000 раз более высокая концентрация амфотерицина В, флуконазола, флуцитозина, интраконазола, кетоконазола, чем для дрожжевых планктонных клеток [3].

В связи с вышеизложенным, в настоящее время важной задачей является разработка новых подходов к лечению инфекций, сопровождающихся образованием биопленок

Переход к наноразмерам в медицине открывает перед нею новые возможности. Лекарства, упакованные в наноконтейнеры, становятся более эффективными и безопасными, попадают к органам-мишеням и позволяют снизить терапевтические дозы препаратов, которые используются для лечения грибковых инфекций, а также сократить сроки лечения, снизить токсичность

лечебных средств, упакованных в липосомы и нановезикулы. Липосомальные формы препаратов и наночастицы имеют более пролонгированное действие, чем растворы, при определенных условиях они могут поглощаться клетками, их мембрана может сливаться с клеточной мембраной, которая приводит к внутриклеточной доставке их содержимого.

Так, в отличие от обычного амфотерицина липосомальный амфотерицин В создает более высокие концентрации в крови, чем обычный амфотерицин В, он менее нефротоксичный, имеет более выраженные кумулятивные свойства [6].

Липосомы (Лс) также повышают солюбилизацию трудно растворимых веществ, к которым относятся и антимикотики. Антигрибковые препараты, как правило плохо растворимы в водных средах, потому их необходимо включать в мембрану Лс.

Для изучения возможности создания липосомальных форм антимикотиков для лечения инфекций, сопровождающихся образованием биопленок, нами был выбран производный алиламинов – тербинафин (ТФ). Выбор этого препарата был обусловлен, во-первых тем, что высокая терапевтическая эффективность и низкая токсичность обусловили его широкое применение для лечения некоторых форм кожных и системных микозов. Кроме того, ТФ является липофильным веществом, поэтому накапливается в органах, богатых жировой тканью, и таким образом, должен хорошо включаться в липидные везикулы.

Цель исследования данной работы – разработка методов получения липосомальных форм антимикотиков на примере ТФ, изучение их антигрибковых свойств по отношению к биопленкам *C.albicans* в опытах *in vitro*. Изучение влияния состава, размера, заряда Лс на включение в них ТФ, а также влияние аутоиндуктора фарнезола на ингибирующую активность липосомального ТФ, оценка преимуществ липосомальных препаратов перед существующими препаратами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на музейном штамме *C.albicans*. 885/ 653, полученным из ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней АМНУ», (Киев).

В работе были использованы: спиртовой 10% раствор яичного лецитина и 0,5% спиртовой раствор кардиолипина (ЗАО «Биолек», Украина);

холестерин («Sigma», США); олеиновая кислота («Fluka», Италия); ДМСО (Россия). В работе также использовались субстанция антигрибкового препарата тербинафина гидрохлорид («Hetero Labs limited», Индия) и сефароза-4В («Sigma», США), фарнезол («Sigma Aldrich», США), среда Сабуро (фирма Н. Media, Индия) и жидкая модифицированная среда RPMI-1640 (Sigma).

Получение липосом: Лс получали методом выпаривания липидов на вакуумном ротационном упаривателе (Vakuum- Rotation, Германия) с последующим суспендированием в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) с рН 7,4 и озвучиванием на диспергаторе УЗДН-А (Россия). Озвучивание липосом проводили при охлаждении до 2-4 С.

Получение липосомальной формы тербинафина: Субстанция тербинафина гидрохлорида растворялась в хлороформе в связи с его плохой растворимостью в водных растворах и прибавлялась к спиртовому раствору лецитина в соотношении антигрибковый препарат: липиды 1:10, 1:20. Далее смесь выпаривали и получали Лс, как указано выше.

Определение размера липосом: Размер Лс определяли методом турбодиметрии по измерению оптической плотности исследуемой липидной суспензии в диапазоне волн 450–700 нм [7].

Получение биопленок *C.albicans*. *C.albicans*. 885 культивировали на среде, содержащей декстрозу (2%), пептон (2%), дрожжевой экстракт (1%) (вес/объем), собирали центрифугированием, отмывали стерильным ЗФР, ресуспендировали в среде RPMI 1640, обогащенной L-глутамином и забуференным Hepes (фирмы Serva, США). 100 мкл 10⁶ колониеобразующих единиц (КОЕ) вносили в плоскодонные 96-ячеечные планшеты для иммунологических анализов и инкубировали при 32°С в течение 48 часов. Образующиеся биопленки 3 раза отмывали стерильным ЗФР. Остаток ЗФР удаляли полоской фильтровальной бумаги.

Определение МПК тербинафина. Противогрибковые препараты разводили методом серийных разведений средой RPMI в аналогичных плоскодонных 96-ячеечных планшетах, добавляли к биопленкам, инкубировали в течение 24 часов. После этого биопленки отмывали от препаратов, ресуспендировали в жидкой среде Сабуро и высевали на плотную среду Сабуро, после соответствующего разведения для подсчета количества КОЕ и определения МПК по степени мутности на мультискане EX при длине волны 450

нм. МПК считалась наименьшая концентрация, которая задерживает рост грибов на протяжении периода инкубации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы нами было проведено изучения зависимости процента включения ТФ в мембраны Лс в зависимости от состава Лс и их размера. Были получены Лс на основе яичного лецитина (ФХя), который является мягким липидом и традиционно используется при создании липосомальных форм лекарственных препаратов. Соотношение ТФ и лецитина составляло 1:10 и 1:20. Было найдено, что процент включения тербинафина в лецитиновые Лс зависит от их размера и состава липидов (рис.1). На рис. 1 видно, что при уменьшении размера Лс увеличивается содержимое включенного ТФ.

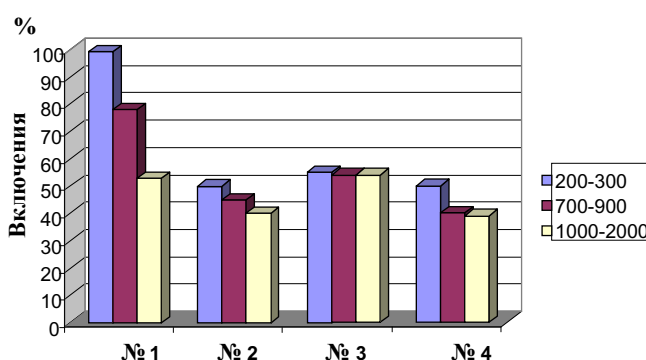


Рис. 1. Процент включения тербинафина в липосомы в зависимости от их состава и размера

№1 - 1% Лс: ФХя + ТФ, №2 - 1% Лс: ФХя + Хол(4:1) + ТФ, №3-1%ФХя + Кард.(4:1) + ТФ, №4 - 1% ФХя + Ол. к-та (5:1) + ТФ.

Для придания ригидности, при получении Лс к лецитину был добавлен холестерин (Хол) (рис.1, №2) в соотношении ТФ: липиды 1:20. Также к лецитину был добавлен кардиолипин (Кард.) (рис.1, № 3) в соотношении ТФ: липиды 1:20. Кроме того, известно [8], что олеиновая кислота (Ол. к-та) хорошо утилизируется дрожжами, а ее наличие в Лс облегчает доставку препаратов, которые используются в дерматологии, к местам поражения, поэтому в состав лецитиновых Лс мы прибавляли олеиновую кислоту в соотношении олеиновая кислота: лецитин 1:10 (рис.1, № 4), соотношение ТФ: липиды составляло 1:10. Как видно на рисунке 1, кардиолипин, холестерин и олеиновая кислота уменьшают процент включения ТФ в лецитиновые Лс. Кроме того, их при-

сутствие в Лс с ТФ приводила к агрегации и нестабильности Лс при хранении. Мы предположили, что, возможно, кардиолипин и холестерин «выдавливают» ТФ из Лс, который в процессе приготовления Лс адсорбируется из водного раствора на мембране Лс и агрегирует их, так как ТФ является липофильным веществом.

Поскольку наибольшее включение ТФ (99%) было получено нами при использовании лецитиновых Лс, содержащих ТФ, в дальнейших опытах по изучению возможности ингибирования образования биопленок *S.albicans* и изучению МПК липосомальных препаратов была использована 2% дисперсия лецитиновых Лс с размером частиц 200–230 нм. и соотношением ТФ: лецитин 1:10, 1:20.

Результаты определения МПК липосомальных препаратов отображены в таблице 1.

Таблица 1

МПК липосомальных препаратов в отношении биопленок грибов *S.albicans*

№	Наименование препаратов	МПК мкг/мл в отношении биопленок <i>S. albicans</i> 885/653
1	2% Лс: лецитин + ТФ, очищенные от невключившегося ТФ, соотношение ТФ: лецитин 1:10.	64
2	2% Лс: лецитин + ТФ, очищенные от невключившегося ТФ, соотношение ТФ: лецитин 1:20.	32
3	2% Лс: лецитин + ТФ, очищенные от невключившегося ТФ, соотношение ТФ: лецитин 1:10 + фарнезол (100 μ M)	16
4	Тербинафин	256
5	фарнезол (100 μ M)	Не ингибировал образование биопленок

В результате определения МПК липосомальных препаратов, было найдено, что Лс, полученные на основе яичного лецитина и ТФ более эффективны при увеличении концентрации лецитина в отношении биопленок *S. albicans* 885/653. Так, при соотношении ТФ: лецитин 1:20, МПК липосомальной формы ТФ уменьшалось в сравнении с МПК интактного ТФ в 8 раз (табл.1, № 2), в то время как при соотношении 1:10 МПК липосомального ТФ было меньше МПК ТФ в 4 раза.

Можно предположить, что лецитиновые Лс, содержащие ТФ адсорбировались на биопленках *C.albicans*, обеспечивая внутриклеточную доставку ТФ, в то время как свободный ТФ движется по каналам биопленок и не проникает внутрь их. Таким образом, проведенные исследования показывают, что даже при низких концентрациях, липосомальная доставка ТФ в значительной мере повышает его эффективность для ингибирования роста бактериальной биопленки *C.albicans*. Проведенные исследования совпадают с литературными данными о повышении антигрибковой активности липосомального бензилпенициллина в сравнении с его раствором при ингибировании действия биопленок патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* [9].

Для *C.albicans* характерно явление диморфизма, которое состоит в способности гриба существовать в формах: дрожжевые клетки, которые почкуются, а также псевдогифы и гифы. Последние представляют собой удлиненные образования мицелярных форм грибов [3]. Существенное место в процессе образования биопленок грибов рода *Candida* занимает феномен «чувство кворума» (quorum sensing – QS), реализация которого связана с продукцией фарнезола и тирозола, являющихся аутоиндукторами морфогенеза данного патогена [10].

Показано, что аутоиндуктор фарнезол ингибирует развитие дрожжевых клеток в гифы, тем самым подавляя образование биопленок *Candida* [11].

Поскольку фарнезол ингибирует формирование полноценных биопленок, то, таким образом, он способствует повышению их чувствительности к антимикотикам. В связи с этим, в следующей серии экспериментов при изучении МПК липосомального ТФ был изучен эффект применения фарнезола в комбинации с липосомальным ТФ по отношению к биопленкам *C.albicans* 885.

При добавлении к дрожжевым клеткам аутоиндуктора фарнезола, МПК липосомального ТФ уменьшалось в 16 раз (табл. 1, № 3). Фарнезол без ТФ был неактивен.

Таким образом, полученные данные показывают, что липосомальный ТФ является высокоэффективным по отношению к биопленкам *C.albicans* 885 и свидетельствуют о возможности применения липосомального ТФ при лечении кандидоза.

ВЫВОДЫ

1. Было найдено, что липосомы на основе лецитина, повышают солубилизацию тербинафина. При добавлении к лецитину олеиновой кислоты, кадиолипина и холестерина солубилизация антимикотиков ухудшается. Показана зависимость процента включения тербинафина в липосомы и его зависимость от размера и состава липосом. Оптимальный процент включения тербинафина (99%) был получен при использовании лецитиновых липосом при соотношении тербинафин: лецитин 1: 20.

2. В результате определения минимально ингибирующей концентрации липосомальных препаратов, было найдено, что липосомы, полученные на основе яичного лецитина и ТФ более эффективны при увеличении концентрации лецитина в отношении биопленок *C.albicans*.

3. В результате определения минимально ингибирующей концентрации липосомального тербинафина в отношении биопленок *C. albicans* было найдено, что МПК липосомальной формы тербинафина уменьшалось в сравнении с МПК интактного тербинафина в 8 раз.

4. Введение в культуральную среду биопленок *C.albicans* аутоиндуктора грибов фарнезола и липосомальной формы тербинафина приводит к повышению чувствительности биопленок к тербинафину в 16 раз.

5. Полученные данные показывают, что липосомальный тербинафин является высокоэффективным по отношению к биопленкам *C.albicans* 885 и свидетельствуют о возможности его применения при лечении кандидоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rodney M. Donlan and J. William Costerton. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms // Clin. Microb. Reviews. – 2002. – V. 15, N 2. – P. 167-193.
2. Lewis K. Riddle of biofilm resistance // Antimicrob. Agents Chemother. – 2001. – V. 45, N 4. – P. 999-1007.
3. Douglas I.J. Candida biofilms and their role in infection // Trends Microbiol. – 2003. – V. 11, N 1. – P. 30-36.
4. Donlan R. M. Biofilms and device – associated infections // Emerg. Infect. Dis. – 2001. – V. 7, N 2. – P. 277-281.
5. Matthew K. Schinabeck, Lisa A. Long, Mohammad A. Hossain et. al.
6. Shahi S.K. and Patra M. Microbially synthesized bioactive nanoparticles and their formulation active against human pathogenic fungi // Rev. Adv. Mater. Sci. – 2003. – N 5. – P. 501-509.

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. Сорокова, А.А. Селищева, А.П. Каплун. М. – 2000. – 105 с.

8. Dawson TL Jr, DeAngelis YM, Treadway R et al. Dandruff. Part II: Dandruff and seborrheic dermatitis result from oleic acid released from sebum by Malassezia lipase activity // Poster present at Am Acad. Dermatol. Meeting. – 2002.

9. Hee-Jeong Kim and Malcolm N. Jones / The delivery of benzyl penicillin to Staphylococcus Aureus biofilms by use of liposomes // Journal of Liposome Research. – 2004. – V. 14. – N 3-4. – P. 123-139.

10. Hornby J.M., Jersen E.C., Lisec A.D. et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus Candida albicans is mediated by farnesol // A ppl. Environ. Microbial. – 2001. – V. 67. – N 7. – P. 2982-2992.

11. И.И. Мавров, В.Н. Васильченко, А.П. Белозеров. Биопленки и Quorum sensing у микроорганизмов. 3. Роль феномена Quorum sensing в регуляции формирования биопленок у грибов рода Candida // Дерматология та Венерология. – 2008. – N 2. – С. 19-24.

АНТИГРИБКОВА АКТИВНІСТЬ ЛІПОСОМАЛЬНОГО ТЕРБІНАФІНУ У ВІДНОШЕННІ БІОПЛІВОК CANDIDA ALBICANS

**Н.М. Іванова, В.М. Васильченко,
А.П. Белозеров**

Резюме. У результаті визначення мінімально пригнічуючих концентрацій (МПК) ліпосомального тербінафіну у відношенні біоплівок грибів *Candida albicans* було знайдено, що МПК ліпосомального тербінафіну знижувалося в порівнянні з МПК інтактного тербінафіну в 4–8 разів. Ліпосоми, отримані на основі яєчного лецитину й тербінафіну більш ефективні у відношенні до біоплівок *C. albicans* при збільшенні концентрації лецитину. Введення в культуральне середовище біоплівок *C. albicans* аутоіндуктора грибів фарнезола й ліпосомального тербінафіну приводило до підвищення їх чутливості до тербінафіну в 16 разів.

Ключові слова: біоплівки *Candida albicans*, МПК, лецитин, ліпосоми, тербінафін, фарнезол.

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF LIPOSOMAL TERBINAFINE CONCERNING OF BIOFILMS CANDIDA ALBICANS

**N.N. Ivanova, V.N. Vasilchenko,
A.P. Belozеров**

Resume. As the result of the detection of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the liposomal terbinafine concerning fungal infections caused by biofilms *Candida albicans* it has been found that MIC of the liposomal forms of terbinafine decreased in comparison with MIC of intact terbinafine in 4–8 times. The liposomes received on the basis of egg lecithin and terbinafine were more effective concerning biofilms *C. albicans* at increase of concentration of lecithin. Introduction in culture medium of biofilms *C. albicans* autoinducter of farnesol and liposomal forms of terbinafine led to increase of them sensitivity to terbinafine in 16 times.

Keywords: biofilm *Candida albicans*, MIC, lecithin, liposomes, terbinafine, farnesol.