

УДК 615.282:615.015.12:615.074

**О.В. Коцар**

*Харківський національний медичний університет*

## **ВИЗНАЧЕННЯ МІНІМАЛЬНОЇ ІНГІБУЮЧОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ КОМЕРЦІЙНИХ АНТИМІКОТИКІВ І ЇХ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ФОРМ**

Визначення мінімальної інгібуючої концентрації комерційних антимікотиків та їх ліпосомальних форм відносно біоплівок *C. albicans* показало значну активність останніх. Комбіноване застосування хіміотерапевтичних препаратів різних груп пригнічує ріст біоплівки через їх синергічну дію. Застосування ліпосомальних форм лікарських засобів у медичній практиці є перспективним напрямком в сучасній медицині.

**Ключові слова:** біоплівка *Candida albicans*, тербінафін, бензоїл пероксиду, ліпосоми.

Останнім часом більшістю вітчизняних і зарубіжних мікробіологів визнано, що мікроорганізми в природному і штучно створеному довкіллі існують в основному у вигляді структурованих, прикріплених до поверхні субстрату співтовариств – біоплівок. Ці природні співтовариства бактерій, покриті полісахаридним матриксом, функціонують як скоординований консорціум [1–3]. В ньому бактерії більшість часу розвитку і розмноження знаходяться в складі біоплівки, прикріпленої до поверхонь екосистем, і ці клітини фізіологічно відмінні від клітин того ж штаму, зважених у середовищі. В принципі планктонну стадію можна розглядати лише як спосіб переміщення мікробної клітини від однієї поверхні до іншої, тобто як короткотривалий стан в житті бактерій [4].

Бактерії, що знаходяться у складі мікробних співтовариств і, зокрема, біоплівках, стають менш доступними для дії різних зовнішніх чинників, включаючи антибіотики. На шляху до бактерій антимікробні препарати знаходяться над поверхнею плівки і міжклітинного матриксу, що відокремлює патогени співтовариства від дії хіміопрепаратів. В результаті усередині співтовариств, не змінюючи своєї індивідуальної чутливості, бактерії краще виживають у присутності різних факторів зовнішнього середовища [5, 6].

Відомо, що багатовидові біоплівки більш поширені в природі, ніж одновидові, але біоплівки *C. albicans* представляють особливий інтерес для медичних мікробіологів, зважаючи на їх клінічну значущість.

Враховуючи те, що гриби роду *Candida* належать до умовно-патогенних мікроорга-

нізмів, тобто є компонентом симбіотної для людини мікрофлори, то сам факт їх виявлення в організмі у хворого або здорової людини ні в якому разі не може бути критерієм встановлення діагнозу кандидоз. Суттєвим негативним наслідком нераціональної хіміотерапії і різкого підвищення темпів еволюції умовно-патогенних мікробів для людини стало розширення їх спектра і підвищення питомої ваги в етіопатогенезі деяких інфекційних процесів [6, 7].

Незважаючи на застосування нових високоактивних і малотоксичних протигрибкових препаратів, у багатьох випадках не вдається отримати повного одужання у хворих. Фатально проявляється природна біологічна відповідь грибів на широке й не завжди раціональне використання протимікробних засобів, які створюють селективний тиск в екологічних нішах, сприяючи відбору і розмноженню резистентних штамів мікроорганізмів. Більшість сучасних лікарських препаратів у традиційних формах досить обмежено проникають через клітинні біомембрани. Саме тому при розробці нових лікарських засобів наша увага була зосереджена на вивченні можливості збільшити здатність препаратів легше проникати через біомембрани клітин-мішеней, у тому числі й біомембрани біоплівок. До таких препаратів відносяться ліпосомальні форми антибіотиків, які дозволяють значно підвищити ефективність препаратів, знизити їх токсичність і терапевтичні дози [8].

Ліпосоми, що складаються з одного або декількох бішарів фосфоліпідів, уперше було описано в середині 60-х років ХХ ст. [9]. За доволі короткий термін ліпосоми перетвори-

лись із простої моделі, що імітує клітинні мембрани, на об'єкт активних наукових досліджень і набули різноманітного практичного застосування. На сьогодні існує значна кількість лабораторних методик створення ліпосом з біологічно активними субстанціями і порівняно невелика кількість технологій, які застосовуються у виробництві. Більшість цих методів мають обмеження за включенням біологічно активних субстанцій у ліпосоми внаслідок чутливості останніх до механічних та/або хімічних ушкоджень [10].

Розглядаючи способи взаємодії ліпосом із клітинами-мішенями, варто підкреслити, що подібність ліпідних оболонок ліпосом з біомембранами є принциповою теоретичною основою їхнього контакту.

Питома вага ліпідів у структурі біологічних мембран складає від 20 до 80 %, а більша їхня частина представлена групою ліпідів. Отже, спорідненість до природних клітинних мембран становить принципово важливу особливість ліпосом.

Відомі різні механізми взаємодії ліпосом з клітинами, основними з яких є ендоцитоз, адсорбція, злиття ліпосомної мембрани з клітиною, проникнення ліпосоми через пори клітинної мембрани, контактний лізис і обмін ліпідами [11].

У ліпосоми можна інкапсулювати сполуки, що легко окислюються, і тим самим істотно уповільнити їх деградацію і захистити кінцевий продукт від передчасного розпаду. Нами обрано такі ліпосомальні препарати: тербінафін, який відноситься до групи аліламінів, та антисептик – бензоїл пероксиду.

Тербінафін гідрохлорид – протигрибковий препарат для перорального та місцевого застосування, що призначається при грибкових поразках шкіри, нігтів та волосся, а також при кандидозі слизових оболонок. Препарат може діяти як фунгіцидно, так і фунгістатично. Його протигрибкова активність перевищує активність інших препаратів: флуконазолу, клотримазолу, ітраконазолу, кетоконазолу та амфотерицину В [12].

Бензоїл пероксиду за своїми властивостями відноситься до групи дерматотропних засобів, має антисептичний та дезінфікуючий ефект. Він є активним по відношенню як до бактерій, так і до грибів, що важливо для лікування змішаних інфекцій [13].

Дослідження проводились на базі лабораторії екологічного та епідеміологічного моніторингу Інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України<sup>1</sup>.

Метою роботи було визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) препаратів тербінафіну і бензоїл пероксиду відносно референс-штаму *Candida albicans* NCTC 885/653.

**Матеріал і методи.** Досліджували зразки ліпосомальних форм препаратів на основі яєчного лецитину при співвідношенні препарату до ліпідів 1:20, при якому в ліпосоми включається до 99 % препарату.

Для порівняння протигрибкової активності ліпосомальних і комерційних форм антибіотиків стосовно біоплівки *C. albicans* використовували комерційні препарати тербінафіну (ТФ) і бензоїл пероксиду (БП) виробництва фармацевтичної фірми ЗАТ «Космохім».

Визначення мінімальної інгібуючої концентрації препаратів проводили мікрометодом з використанням 96-лункових плоскодонних планшетів шляхом послідовних двократних розведень у поживному середовищі для грибів, що містить декстрозу (2 %), пептон (2 %), дріжджовий екстракт (1 %) – (ДПДЕ) [14].

Суспензії культури *C. albicans* готували за допомогою стандарту каламутності (0,5 ОД за шкалою McFarland), яку розводили у 100 разів ізотонічним розчином натрію хлориду до концентрації  $10^6$  КУО/см<sup>3</sup>. У кожен лунку вносили по 100 мкл культури *C. albicans*. Планшети інкубували при температурі 35 °С протягом 24 годин. Наступної доби відбирали вміст лунок, промивали трикратно 0,1%-вим фосфатним сольовим буфером (ФСБ рН=7,4), висушували та наносили протигрибкові препарати. Після 24 годин інкубування біоплівки з антимікотиками вміст лунок знов відбирали, промивали фосфатним буфером та додавали 50 мкл середовища ДПДЕ. З кожної лунки робили висів на агар Сабуру.

Ефективність сумісної протигрибкової дії тербінафіну та бензоїл пероксиду по відношенню до біоплівки *C. albicans* визначали за допомогою методу checkerboard, згідно з яким один з препаратів вносили від більшої концентрації (лунка планшета № 1), послідовно зменшуючи концентрацію (до лунки № 11).

<sup>1</sup> Автор розробки – канд. хім. наук, провідний науковий співробітник лабораторії патологічної фізіології, молекулярної генетики та патоморфології Інституту венерології та дерматології НАМН України Н.М. Іванова.

Інший препарат починали вносити від останньої лунки (№ 11) до початкової (№ 1). Цей метод дозволяє визначити фракційний індекс інгібуючої концентрації (ФІК) за формулою

$ФІК = \frac{МІК(ТФ \text{ в комбінації з БП})}{МІК(ТФ) + МІК(БП \text{ в комбінації з ТФ})} / \frac{МІК(БП)}{МІК(ТФ)}$ : якщо  $ФІК < 0,5$  – визначається синергізм дії,  $ФІК = 0,5-1,0$  – адитивність,  $ФІК = 1,0-4,0$  – індіферентність,  $ФІК \geq 4,0$  – антагонізм [15].

Отримані результати обробили методом варіаційної статистики з використанням стандартної похибки частки ( $S_p$ ) та критерію  $\chi^2$  [16].

**Результати та їх обговорення.** При дослідженні МІК протигрибової активності комерційних препаратів і їх ліпосомальних форм були виявлені принципові відмінності (рисунок).

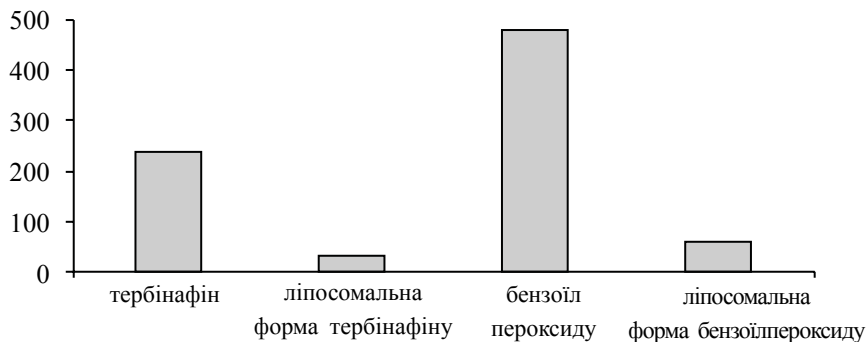
Мінімальна інгібуюча концентрація комерційної форми тербінафіну у відношенні референтного штаму *Candida albicans* (NCTC

протигрибових препаратів дорівнює 0,1625, і за значенням фракційного індексу інгібуючої концентрації вони володіють синергізмом дією, що можна, вірогідно, пояснити суттєвим збільшенням вільних радикалів, які мають антимікробну активність та з'являються при взаємодії бензоїл пероксиду з похідними аліламінів. Цей механізм треба врахувати при лікуванні кандидозів, обумовлених антимікотикорезистентними штамми.

### Висновки

1. Встановлено, що мінімальна інгібуюча концентрація комерційного препарату тербінафін відносно біоплівки *C. albicans* склала 240 мкг/мл, ліпосомальна його форма значно менше – 30 мкг/мл.

2. Мінімальна інгібуюча концентрація препарату бензоїл пероксиду відносно біоплівки *C. albicans* склала 480 мкг/мл,



Мінімальна інгібуюча концентрація різних форм протигрибових препаратів відносно біоплівки *C. albicans* (NCTC 885/653)

у біоплівці склала 240 мкг/мл, ліпосомальної форми – 30 мкг/мл.

Ліпосомальна форма бензоїл пероксиду була також ефективнішою в порівнянні з комерційною формою препарату по відношенню до біоплівки *C. albicans*. Мінімальна інгібуюча концентрація інтактного бензоїл пероксиду склала 480 мкг/мл, ліпосомальної форми – 60 мкг/мл.

Отже, мінімальна інгібуюча активність ліпосомальних форм протигрибових препаратів перевищувала активність комерційних препаратів у 8 разів (рисунок).

При сумісному використанні препаратів тербінафіну та бензоїл пероксиду їх мінімальна інгібуюча концентрація вища, ніж кожного препарату окремо і складає  $(31,2 \pm 15,6)$  мкг/мл. Фракційний індекс інгібуючої концентрації при сумісному використанні

ліпосомальна форма даного антимікотика – 60 мкг/мл.

3. Показано, що ліпосомальна форма обох препаратів (тербінафіну гідрохлориду та бензоїл пероксиду) активніша в 8 разів у порівнянні з комерційними антимікотиками.

4. Доказано *in vitro* ефективність комбінованого застосування препаратів тербінафіну і бензоїл пероксиду по відношенню до біоплівки *C. albicans* внаслідок їх синергічної дії.

**Перспективність дослідження.** Проблема боротьби із збудниками кандидозу прямо пов'язана з питаннями його раціонального лікування, що диктує необхідність суттєвого удосконалення підступів щодо створення ліпосомальних препаратів для подолання кандидозної інфекції.

### Література

1. Rodney M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process / M. Rodney // Healthcare epidemiology. – 2001. – № 33. – P. 1387–1392.

2. Николаев Ю.А. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 2. – С. 149–162.
3. Хмель И.А. Quorum-sensing регуляция экспрессии генов: фундаментальные и прикладные аспекты, роль в коммуникации бактерий / И.А. Хмель // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 457–464.
4. Хмель И.А. Quorum-sensing регуляция экспрессии генов – перспективная мишень для создания лекарств против патогенности бактерий / И.А. Хмель, А.З. Метлицкая // Молекулярная биология. – 2006. – № 40 – С. 195–210.
5. Biofilms: the matrix revised / S.S. Branda, A. Vik, I. Friedman, R. Kolter // Trends Microbiol. – 2005. – № 13. – Р. 21–25.
6. Способность индигенных лактобацилл полости рта человека к формированию биопленок / Ю.В. Червинец, А.М. Самоукина, В.М. Червинец и др. // Журнал микробиологии. – 2010. – № 6. – С. 80–83.
7. Голубка О.В. Поширеність кандидозів, загальна характеристика збудника, особливості лабораторної діагностики. [Електронний ресурс] / О.В. Голубка // Аналіз Мечниківського Інституту. – 2011. – № 2. – С. 51–59. Режим доступу до журналу: <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm>
8. Іванова Н.М. Антигрибкова активність ліпосомального тербінафіну / Н.М. Іванова, В.М. Васильченко // Медична хімія. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 46–51.
9. Фосфолипиды. Методы их выделения, обнаружения и изучения физико-химических свойств липидных дисперсий в воде: Учеб.-метод. пособие по биоорганической химии / под ред. Г.М. Сорокоумова, А.А. Селищева, А.П. Каплун. – М., 2000. – 105 с.
10. Liposomes: structure, properties, methods of introduction into the body for therapeutic purposes / M.O. Kiciakova, G.P. Gavruluk, O.C. Voronkova, et al. // Herald of the Dnepropetrovsk University. Biology. Ecology. – 2010. – Vol. 18, T. 1. – P. 52–57.
11. Шульга С.М. Ліпосоми і наносоми: структура, властивості, виробництво / С.М. Шульга // Biotechnologia Acta. – 2013. – Т. 6, № 5. – Р. 19–40.
12. Аналіз чутливості до антимікотиків грибів *C. albicans* і *Candida non-albicans*, циркулюючих на території Харкова і Харківської області / О.В. Голубка, Т.В. Савінова, І.В. Журавльова та ін. // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2012. – № 18. – С. 80–84.
13. Burkhart C.G. Treatment of acne vulgaris without antibiotics: tertiary amine-benzoyl peroxide combination vs. benzoyl peroxide alone (Proactive Solution TM) / C.G. Burkhart, C.N. Burkhart // Internat. J. Dermat. – 2007. – Vol. 46, № 1. – P. 89–93.
14. Мінухін В.В. Адгезивні властивості асоціації *C. albicans* і *S. aureus* / В.В. Мінухін, О.В. Кочнева, С.М. Граматюк, М.П. Сухомлін // Вісник проблеми біології медицини. – 2013. – Вип. 2 (100). – С. 89–91.
15. Бузолева Л.С. Влияние тяжелых металлов на размножение патогенных бактерий / Л.С. Бузолева, А.М. Кривошеева // Advances in current natural science. – 2013. – № 7. – С. 31–33.
16. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.М. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: МОРИОН, 2001. – 408 р.

**Е.В. Коцарь**

#### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ИНГИБИРУЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КОММЕРЧЕСКИХ АНТИМИКОТИКОВ И ИХ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ**

Определение минимальной ингибирующей концентрации коммерческих антимикотиков и ее липосомальных форм по отношению к *C. albicans* показало значительную активность последних. Комбинированное использование химиотерапевтических препаратов разных групп приводит к угнетению роста биопленок за счет их синергического действия. Применение липосомальных форм лекарственных препаратов в медицинской практике является перспективным направлением в современной медицине.

**Ключевые слова:** биопленка *Candida albicans*, тербинафин, бензоил пероксида, липосомы.

**E.V. Kotsar**

#### **DETERMINATION OF THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION OF COMMERCIAL ANTIMYCOTICS AND FORM OF LIPOSOM**

Definition minimum inhibitory concentration commercial antimycotics and its liposomal form against *C. albicans* showed a significant activity of the latter. The combined use of chemotherapy drugs different groups leads to inhibition of growth of biofilms due to their synergistic action. The use of liposomal forms of drugs in medical practice is a promising trend in modern medicine.

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

Поступила 06.04.15