

PROIECT CNCSIS PN II – RU:

TE_159/ 2010

**EVALUAREA EFECTULUI ANTIFUNGIC AL NANOCONJUGATELOR
UNUI NOU DERIVAT DE PROPICONAZOL CU BETA-
CICLODEXTRINĂ**

RAPORT ETAPĂ 2012

Evaluarea reducerii mortalității și a încărcăturii fungice / gram țesut în urma administrării de nano-conjugate la loturile infectate cu DL₉₀.

Pentru aprecierea eficienței terapeutice a compusului MXP-4509, s-au folosit doze și căi de administrare diferite a produsului la două loturi de șoareci preinoculați cu Doza Letală 90 (DL₉₀). Timp de 15 zile s-a urmărit procentul de mortalitate și încărcătura fungică per gram țesut renal la loturile de șoareci tratați.

Material și metodă.

- șoareci outbreak CD1, femele, cu greutatea medie de 20 g (Institutul Cantacuzino, București);
- tulpina SC 5314 de *Candida albicans*;
- soluție MXP 4509 în tampon fosfat cu o concentrație finală 1 mg/ml s.a. (propiconazol nitrat);
- pentru prepararea inoculului de *C. albicans*: plăci cu Agar YPD, anse de inoculare, tampon fosfat, vortex, eprubete sterile, cameră de numărare Neubauer improved;
- pentru manipularea animalelor: halat, mască, mănuși de latex, inel de cauciuc pentru deget;
- pentru inocularea i.v. a șoarecilor: dispozitiv de contenție șoareci, seringi de 1ml cu ac de 25G;
- pentru administrarea soluției de antifungic: sondă de gavaj, seringi de 1 ml cu ac de 25G, tampon de vată cu alcool, mănuși de latex, soluție antiseptică;

Desfășurarea experimentului:

Ziua 0 – formarea loturilor și inocularea șoarecilor cu tulpina SC 5314.

Șoarecii s-au împărțit în 3 loturi (30 de șoareci per lot). Animalele au fost cazate câte 5 în fiecare cușcă (cuști tip 1500 U, Eurostandard IV, cu suprafața utilă de 1500 cm²) în condiții identice de alimentație (furaj granulat standard), temperatură, umiditate relativă (60-70%) și luminozitate (12h lumină, 12h întuneric).

Lotul I (martor):

- șoarecii au fost inoculați cu tulpina SC 5314 fără a primi ulterior nici un tratament;

Lotul II:

- șoarecii au fost inoculați cu tulpina SC 5314 și au fost tratați ulterior cu 25 mg/Kg corp MXP 4509 pe cale i.p.;

Lotul III:

- șoarecii au fost inoculați cu tulpina SC 5314 și au fost tratați ulterior cu 50 mg/Kg corp MXP 4509 p.o.;

Inocularea șoarecilor:

- se pregătește o suspensie de levuri în tampon fosfat, care apoi se ajustează (prin numărare în cameră), la o densitate de 5×10^6 celule/ml;
- se plasează șoarecii în dispozitive de contenție;
- se încălzesc șoarecii pe o lampă cu infra-roșu pentru evidențierea venei codale;
- se imobilizează coada șoarecelui între indexul și policele mâinii stângi, apoi se introduce acul în venă, aproape paralel cu lumenul vasului și se injectează 0,2 ml suspensie
- după injectare acul se menține pe loc cca. 5 secunde astfel ca materialul injectat să fie drenat din coadă;
- se plasează șoarecii injectați în cușca inițială și se mențin în același regim de viață timp de 14 zile, notându-se zilnic numărul de animale decedate;

Zilele 1 – 14: - șoarecilor din lotul II li s-a administrat zilnic 0,5 ml soluție MXP 4509 pe cale i.p., iar celor din lotul III, 1 ml prin gavaj.



- se urmăresc zilnic șoarecii inoculați și se notează mortalitatea pe zile și loturi;
- șoarecii muribunzi se consideră ca decedați în ziua următoare;
- în zilele 3, respectiv 7, din fiecare lot se sacrifică câte un șoarece, se recoltează rinichii, din care se prepară un omogenizat în ser fiziologic cu ajutorul dispozitivului Turbomax. Din acest omogenizat se practică diluții seriate

zecimale și însămânțări pe Agar YPD în vederea determinării încărcăturii fungice pe gram țesut renal.



Rezultate:

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 1 și 2.

La majoritatea șoarecilor decedați, starea comatoasă a fost precedată de semne nervoase datorate, probabil, insuficienței renale.

Administrarea substanței antifungice a îmbunătățit semnificativ rata de supraviețuire a animalelor inoculate cu *Candida albicans*, mortalitatea cea mai scăzută înregistrându-se în urma administrării orale zilnice a unei doze de 50 mg/kg corp s.a.

Tabel 1. Dinamica mortalității (decedați /zi) la cele 3 loturi de șoareci

Ziua	Lotul I	Lotul II	Lotul III
3	1	-	-
4	1	-	-
5	1	-	-
6	6	3	1
7	10	2	2
8	5	2	1
9	3	-	-
10	1	-	-
11	2	-	-
Mortalitate totală în ziua a 14-a	100%	23,3%	13,3%

**Tabelul 2. Dinamica încărcăturii fungice (UFC/g) în țesutul renal
la cele 3 loturi de șoareci**

Ziua	Lotul I	Lotul II	Lotul III
3	4×10^5	10^5	$0,3 \times 10^5$
7	$2,2 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$

În ceea ce privește încărcătura fungică în țesut renal se observă o reducere a acesteia la loturile tratate comparativ cu lotul martor, aspect care se corelează cu dinamica mortalității.

Screeningul tulpinilor din colecția personală de microorganisme pentru producerea de biofilme.

Materialul biologic utilizat pentru testări a fost reprezentat de 220 tulpini levurice provenite din prelevate clinice, care au fost anterior identificate drept *Candida albicans* prin testul de filamentare și teste biochimice. Aceste tulpini au fost triate prin teste de biologie moleculară pentru a le identifica cu acuratețe doar pe cele de *C. albicans* – cunoscute ca producătoare de biofilme *in vitro* și *in vivo*. Tulpinile de *C. albicans* au fost apoi cultivate în condiții speciale pentru a forma biofilme, în microplăci cu 96 godeuri, și au fost tratate cu concentrații diferite de MXP-4509.

Diferențierea tulpinilor de *Candida albicans* și *Candida dubliniensis*
prin PCR duplex

Diferențierea cu acuratețe a speciilor *Candida albicans* și *Candida dubliniensis* exclusiv pe baza caracterelor fenotipice este discutabilă datorită rezultatelor inconstante. În vederea identificării corecte a speciei *Candida dubliniensis*, este preferabilă, pentru siguranța și expeditivitatea ei, o tehnică de biologie moleculară care presupune folosirea a două perechi de primeri (amorse): una de amorse specifice unui intron al genei codante pentru actină (DUBF / DUBR) și alta de amorse universale pentru ADN-ul ribozomal (ITS1 / ITS4). Dintre cele două specii amintite, doar *Candida dubliniensis* generează în urma amplificării două benzi, una de 288 perechi de baze (pb) cu setul DUBF / DUBR și una de cca. 600 pb, cu amorsele universale. *Candida albicans* va genera o singură bandă, pe cea de 600 pb, cu amorsele universale.

Pentru diferențierea tulpinilor de *Candida albicans* și *Candida dubliniensis* prin PCR duplex s-au folosit seturile de amorse:

- ITS 1: 5' TCCTGAGGTGAACCTGCGG3';
- ITS 4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3';
- DUBF: 5' GTATTTGTCGTTCCCCTTTC3' (nucleotidele 251-270);
- DUBR: 5' GTGTTGTGTGCACTAACGTC3' (nucleotidele 519-538).

Mod de lucru

Se calculează cantitățile de reactivi necesare preparării mixului, având în vedere cele patru eșantioane ce vor fi folosite (martor pozitiv 1, martor pozitiv 2, martor negativ, proba de testat). Se vor adăuga în plus cantitățile de reactivi necesare pentru încă un eșantion, astfel încât în momentul divizării mix-ului, cantitățile necesare pentru cele patru eșantioane să fie suficiente.

Se decongelează reactivii și se mențin la gheață până la utilizare;

Se prepară mixul, se adaugă enzima și apoi se vortexează;

Se distribuie mixul în tuburi PCR de 0,2 ml

Se adaugă:

- 1 μl ADN *Candida albicans* în eșantionul pentru martorul pozitiv 1;
- 1 μl ADN *Candida dubliniensis* în eșantionul pentru martorul pozitiv 2;
- 1 μl ADN tulpină de identificat în eșantionul probei de testat;
- 1 μl apă purificată în eșantionul martorului negativ.

Se introduc tuburile în thermocycler și se supun următorului regim termic:

50°C/5 minute

95°C/ 10 minut

apoi, 94°C/ 30 sec.

58°C/ 30 sec. 30 cicluri

72°C/ 30 sec.

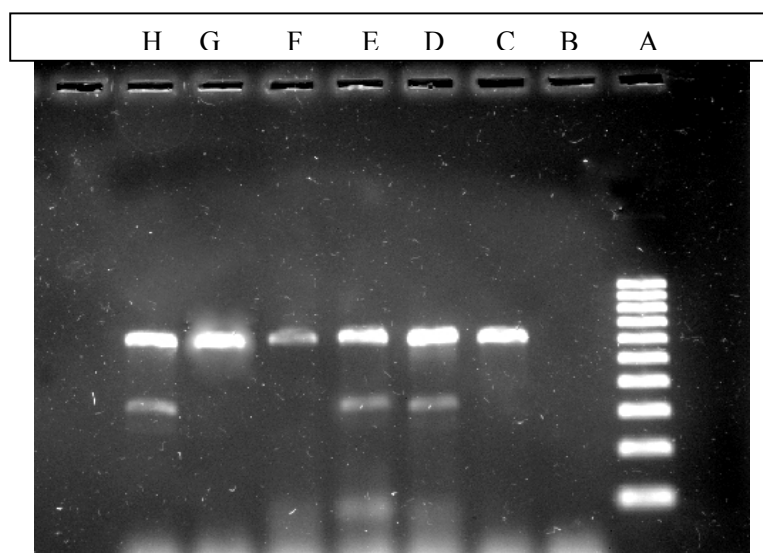
apoi, 72°C/ 10 minute.

După încheierea amplificării, eșantioanele se mențin la + 4°C până la vizualizarea pe gel de agaroză.



După obținerea ADN-ului amplificat, s-a realizat migrarea prin electroforeză utilizând gel agaroză 1,5% în TBE 1x (Tris, acid boric, EDTA). S-a utilizat GelRed™ (1:1000, ADN stain, Interchim) în scopul vizualizării acestuia la U.V. în transiluminator, în prezența marker-ului de talie 100 bp DNA ladder (Promega).

Parametrii de migrare au fost: 55 minute la 80 Volți, 45 mA, 45 w, ADN-ul migrează lent și benzile se separa mai bine.



A= marker de talie 100bp, B=martor negativ al doilea dinte al pieptănului de la dreapta la stânga, C= *C. albicans* tulpină tip, D= *C. dubliniensis* tulpină tip (cea cu doua benzi), E= *C. dubliniensis*, F= *C. albicans*, G= *C. albicans*, H= *C. dubliniensis*.

Din cele 86 de tulpini GTT (+), 80 de tulpini de *Candida albicans* au fost confirmate prin PCR.

Testarea capacității de formare a biofilmelor

Pentru efectuarea testului de formare a biofilmelor s-au utilizat următoarele:

- tulpini de *Candida albicans*;
- microplăci cu 96 de godeuri;
- Agar Sabouraud Dextrose (SDA);
- bulion Yeast Nitrogen Base (YNB);
- tampon fosfat salin (PBS);
- anse calibrate de 10 μ l și 1 μ l, de unică folosință (Biosigma)
- micropipete automate (Biohit, Germania);
- agitator orbital;
- XTT (Sigma-Aldrich Corp.);
- soluție de menadionă;
- hotă cu flux laminar (ABS Class II Cabinet BioQUELL, Marea Britanie).

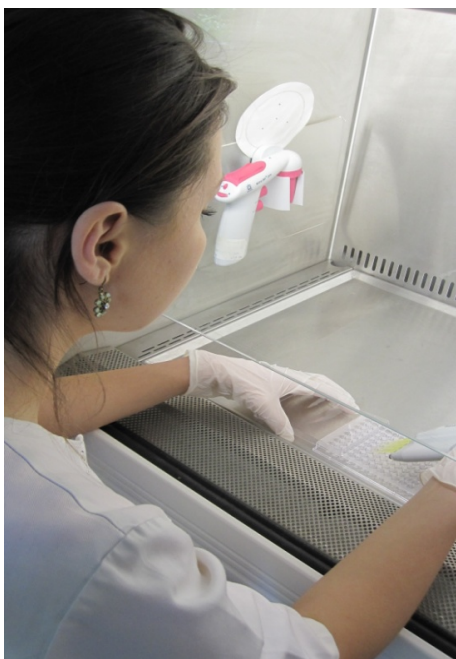
S-au selectat pentru acest studiu 80 tulpini de *Candida albicans*. Înainte de fiecare experiment, tulpina de *Candida albicans* se cultivă aerob pe Agar Sabouraud Dextrose (SDA) timp de 18 ore la temperatura de 37°C, apoi se prelevează o ansă plină de cultură de creștere și se inoculează în bulion Yeast Nitrogen Base (YNB) suplimentat cu glucoză de 50 mM.

După 18 ore de incubare, celulele, care sunt la sfârșitul fazei de creștere exponențială, se recoltează, se spală de două ori cu tampon fosfat salin (PBS) (pH 7.2) și apoi sunt resuspendate în Yeast Nitrogen Base (YNB) suplimentat cu glucoză de 100 mM.

Suspensiile standard de *Candida* se prepară la o concentrație de 10^7 celule/ml, ajustând densitatea optică (DO) în conformitate cu standardele McFarland folosind un spectrofotometru.

Dezvoltarea biofilmelor

Levurile se cultivă în microplăci cu 96 de godeuri. Volume de 100 μ l de suspensie standard de *Candida* (10^7 celule/ml) se transferă în fiecare godeu și se incubează 1,5 ore (faza de aderare) la 37°C, într-un agitator orbital la 75 rot/min. După faza de aderare, suspensia celulară se aspiră ușor, apoi fiecare godeu se spală de două ori cu PBS pentru a îndepărta celulele libere, cu grijă pentru a nu desprinde pe cele aderente.



Spălarea godeurilor cu PBS



Menținerea plăcii la termostat – faza de aderare

Cu scopul de a permite dezvoltarea biofilmului, se adaugă în fiecare godeu 200 μ l de YNB proaspăt preparat suplimentat cu glucoză de 100 mM.

Placa se incubează pentru 24 sau 48 de ore la 37 ° C la 75 rpm, într-un agitator orbital. După 24 ore de incubare, mediul se aspiră, biofilmele se spală de două ori cu PBS, apoi se adaugă 200 μ l de YNB în fiecare godeu. La diferite intervale de timp, biofilmele sunt cuantificate folosind testul de reducere XTT. Toate testele se repetă de 6 ori, în două etape separate.

Testul activității oxidative

Se folosește XTT în PBS cu 200mM glucoză. XTT se divolvă în PBS la o concentrație finală de 1 mg/ml. Soluția se sterilizează prin filtrare și se congelează la -70°C până în momentul utilizării.

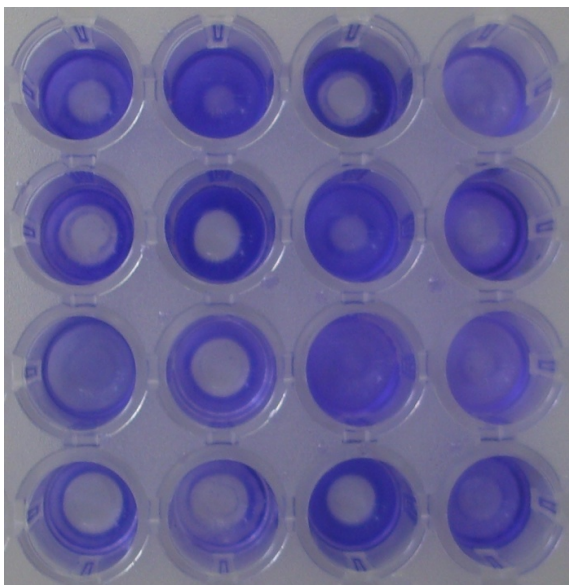
Pentru fiecare test, soluția XTT se decongelează pe gheață și se amestecă cu soluția de menadionă la o concentrație de 20:1. Biofilmele se spală de două ori cu 200 μ L de PBS pentru a elimina celulele neaderente. Apoi, 158 μ l de PBS, 40 μ l de XTT și 2 μ l de menadionă se transferă în fiecare godeu. Placa se acoperă cu folie de aluminiu și se incubează la 37°C la întuneric timp de 3 h.

Modificările colorimetrice sunt măsurate la 492 nm, folosind un cititor de microplăci.

Valorile DO pentru cele 80 tulpini de *Candida albicans* după citirea la spectrofotometru

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B					0,162	0,257	0,217	0,294	0,153	0,308	0,283	0,186
C	0,243	0,225	0,298	0,267	0,322	0,168	0,289	0,278	0,268	0,278	0,312	0,207
D	0,328	0,269	0,214	0,189	0,256	0,247	0,306	0,217	0,236	0,335	0,226	0,308
E	0,192	0,251	0,322	0,284	0,303	0,152	0,248	0,239	0,186	0,185	0,203	0,154
F	0,285	0,323	0,285	0,166	0,273	0,216	0,332	0,264	0,238	0,214	0,298	0,227
G	0,167	0,274	0,318	0,279	0,249	0,227	0,327	0,278	0,279	0,314	0,286	0,169
H	0,327	0,275	0,172	0,286	0,259	0,332	0,296	0,207	0,279	0,182	0,315	0,296

Se observă, că biofilmul format este cu atât mai dezvoltat cu cât colorația este mai intensă și densitatea optică (DO) citită spectrofotometric, mai mare.



Godeuri cu biofilm, după tratare cu XTT

17 0.268	18 0.278	19 0.312	20 0.207
29 0.263	30 0.335	31 0.226	32 0.308
28 0.186	27 0.185	26 0.203	25 0.154
21 0.238	22 0.214	23 0.298	24 0.277

Valori ale DO citite la spectrofotometru

Densitățile optice după tratarea biofilmelor cu o soluție conținând 2048 mg/l MXP-4509 au fost semnificativ mai mici decât la lotul netratat sau la cele tratate cu 512 sau 1024 mg/l, indicând capacitatea acestei concentrații de a inhiba dezvoltarea biomasei în biofilme. Inhibiția nu este completă, dar depășește 50% în medie, fapt întâlnit și la alți compuși azolici cu rol antifungic. Efectul antifungic al nano-conjugatelor se manifestă față de biofilmele levurice datorită gradului ridicat de hidro-solubilitate al substanței active, favorizat de beta-ciclodextrina folosită ca agent carrier.