

PROIECT CNCSIS PN II – RU:

TE_159/ 2010

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

RAPORT ETAPĂ 2013

Testarea *in vivo* a efectului antifungic al nanoconjugatelor MXP-4509 față de biofilme obținute pe modele experimentale la șobolani outbred

Studierea efectului antifungic față de biofilme s-a realizat *in vivo* folosind metoda recomandată de van Wijngaerden și colab. (1999) și a constat în implantarea subcutanată a unor fragmente de cateter preincubate cu o suspensie de *C. albicans*. Șobolani au fost tratați cu antifungicul de testat timp de 6 zile, apoi s-au recoltat fragmentele de cateter și s-a evaluat încărcătura fungică a acestora comparativ cu un set martor, provenind de la animale netratate.

Material și metodă

- șobolani Wistar, femele, 200 grame
- *Candida albicans*, tulpina *wild type* SC5314
- Mediu RPMI-1640 cu 0,9% glucoză
- Ser fiziologic
- Agar YPD în plăci Petri
- Tampon fosfat (PBS)
- Dexametazonă
- Oxitetraciclină pulbere hidrosolubilă
- Catetere multilumen
- Vortex
- Sondă de gavaj

Cu 7 zile înaintea implantării cateterelor, s-a declanșat imunosupresia șobolanilor prin administrarea în apa de băut a oxitetraciclinei (1g/litru) și dexametazonei (2 mg/litru). Aceasta s-a menținut până la sacrificarea animalelor, la sfârșitul experimentului.

Ziua 0:

- însămânțarea tulpinii SC5314 pe agar YPD și incubarea peste noapte la 37°C;
- fragmentarea cateterelor în porțiuni de 1cm lungime și incubarea acestora în ser bovin peste noapte la 37°C (figura 1)

Ziua 1:

- *Faza de aderare* (se realizează o suspensie levurică într-un ml ser fiziologic, apoi se diluează 1/10 și se etalonează la 5×10^4 UFC/ml in RPMI; se transferă fragmentele de cateter din ser în suspensia levurică preparată și se incubează

timp de 1h 30 min. la 37°C (figura 2); după acest interval de timp, se practică diluții pentru evaluarea nr. UFC/fragment cateter după faza de aderare: în primul tub Eppendorf conținând 1 ml ser fiziologic se transferă un fragment de cateter și se vortexează 30 secunde, apoi se transferă succesiv 100 μl în două tuburi conținând 900 μl ser fiziologic și se însămânțează câte 100 μl pe agar YPD, dispersându-se uniform cu ajutorul unor perle de sticlă – figura 3)

- *Implantarea* (se anesteziază șobolanul cu izofluran, se tunde zona lombară și se dezinfectează, se practică o incizie de cca. 1 cm lungime – figura 4, și apoi 3 tunele subcutanate în care se implantează câte un fragment de cateter – figura 5, se suturează plaga cutanată și se redecontaminează zona);
- *Tratamentul* (se împart șobolanii în 3 loturi de câte 3 animale: martor, lot tratat cu 20 mg/kg MXP-4509 per os, lot tratat cu 40 mg/kg MXP-4509 per os; administrarea s-a realizat prin gavaj, timp de 7 zile)

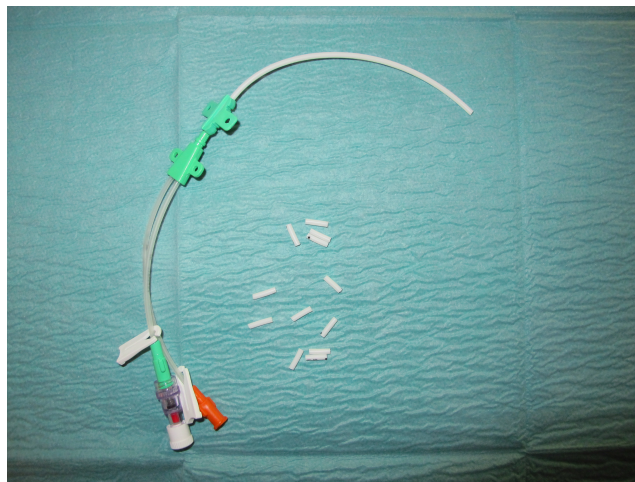


Figura 1. Pregătirea fragmentelor de cateter

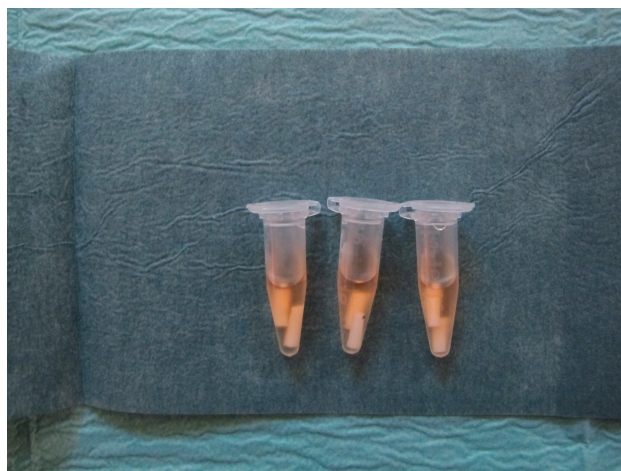


Figura 2. Faza de aderare – incubarea fragmentelor de cateter cu suspensia levurică în RPMI

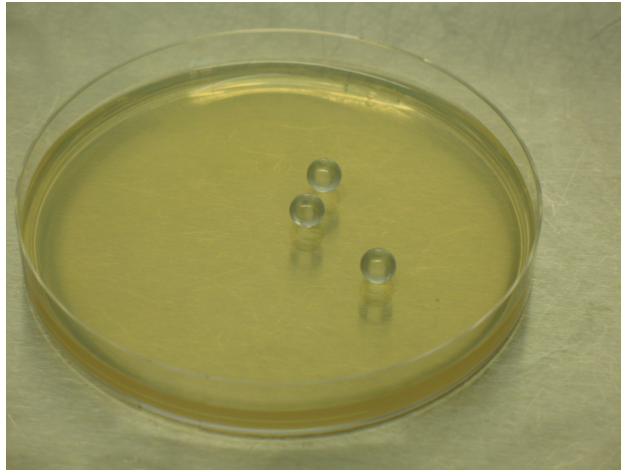


Figura 3. Dispersarea inoculului pe suprafața agarului YPD cu ajutorul perlelor de sticlă, în vederea determinării nr. UFC/fragment de cateter



Figura 4. Efectuarea inciziei cutanate dorso-lombare

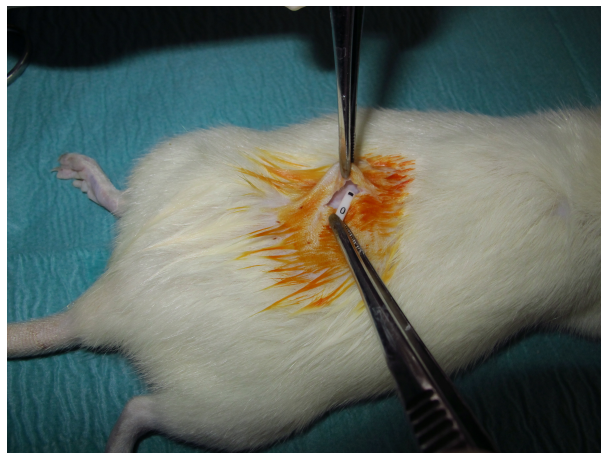


Figura 5. Implantarea fragmentelor de cateter în tunelele subcutanate create după incizie

Ziua 7:

- Se eutanasiază animalele, se dezinfectează zona lombară, se îndepărtează cateterele și se plasează în ser fiziologic;

- Se repetă numărătoarea UFC/fragment cateter (figura 6 A și B) și se compară rezultatele.

Rezultate

Tabelul 1

Încărcătura fungică medie a fragmentelor de cateter după implantare *in vivo*

Nr. UFC/fragment cateter martor	Nr. UFC/fragment cateter 20 mg/kg MXP-4509	Nr. UFC/fragment cateter 40 mg/kg MXP-4509
$1,87 \times 10^4$	$0,093 \times 10^4$	$0,054 \times 10^4$

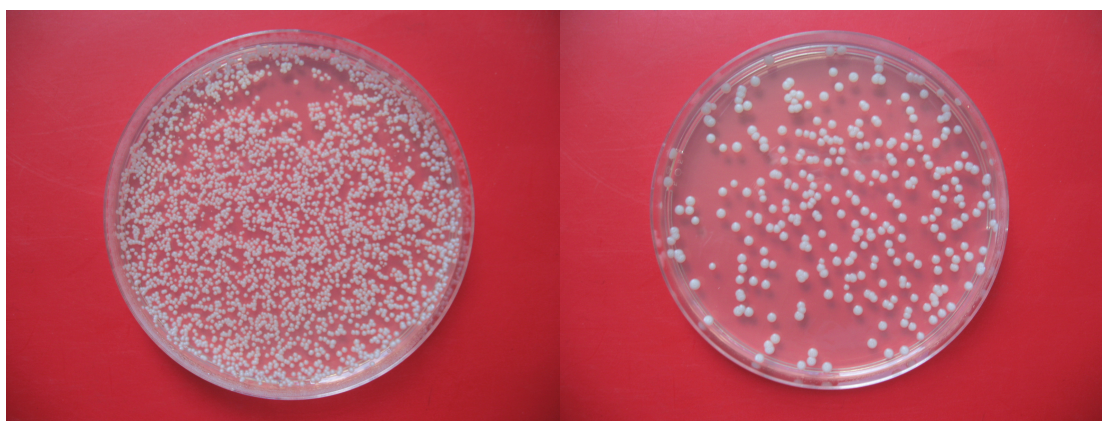


Figura 6: fragment de cateter martor (A) și fragment de cateter prevenind de la lotul tratat cu 20 mg/kg complex antifungic (B)

Nr. mediu de celule levurice per fragment de cateter (UFC) după cele 6 zile de implantare subcutanată este prezentat în tabelul 1. Datele existente evidențiază o reducere a formării biofilmului de *Candida albicans* pe fragmentele implantate la șobolanii tratați per os cu nanoconjugatele derivatului de propiconazol, comparativ cu cel dezvoltat pe fragmentele martor (de 20,10 ori, respectiv de 34,63 ori). Această descreștere, deși semnificativă, nu este suficientă pentru eradicarea biofilmelor dezvoltate pe catetere, așa cum au fost ele obținute prin acest model experimental. În plus, se constată că numărul de celule aderente la cateter a crescut față de cel inițial (decelat la sfârșitul fazei de aderare) – de la $0,45 \times 10^2$ UFC până la $0,093 \times 10^4$ UFC, respectiv până la $0,054 \times 10^4$ UFC.