

## ВЛИЯНИЕ СТИРИЛОВОГО КРАСИТЕЛЯ RH 421 НА АКТИВНОСТЬ АМФОТЕРИЦИНА В КЛЕТОЧНЫХ И МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ

© Е. В. Михайлова,<sup>1</sup> С. С. Ефимова, О. С. Остроумова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

<sup>1</sup> электронный адрес: mikhailovaev@list.ru

Дана оценка совместного действия антибиотика амфотерицина В (АВ) и стирилового красителя RH 421 *in vitro* с использованием модельных липидных мембран и *in vivo* на микроорганизмах *Saccharomyces cerevisiae*. На содержащих эргостерин липидных бислоях показано, что добавка RH 421 увеличивает равновесное число открытых амфотерициновых каналов в  $8.5 \pm 3.2$  раза. Методом диффузии в агар с бумажных дисков установлено, что присутствие RH 421 в клеточной тест-системе усиливает токсическое действие АВ, что выражается в увеличении зоны ингибирования роста дрожжей в 1.5 раза. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что RH 421 является потенциальным синергистом противогрибкового действия АВ и может быть использован для создания новых лекарственных форм с улучшенными фармакологическими свойствами.

Ключевые слова: амфотерицин В, стирильный краситель RH 421, липидные бислои, *Saccharomyces cerevisiae*.

Принятые сокращения: АВ — амфотерицин В, ДМСО — диметилсульфоксид, ДФФХ — 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин.

Грибковые болезни занимают одно из ведущих мест в перечне дерматологических заболеваний. За последние четыре десятилетия их количество значительно возросло в связи с распространением аутоиммунных нарушений, а также в результате применения в клинической практике подходов, подавляющих иммунную систему пациентов (Ghannoum, Rice, 1999). Увеличение числа микозов связано также с формированием устойчивости патогенных штаммов к специфическим лекарственным соединениям. Поэтому назначаемые первоначально препараты, купируя инфекцию, теряют свою эффективность при повторных проявлениях заболевания.

Большинство используемых в настоящее время препаратов для лечения микозов относится к трем классам соединений — полиенам, пиримидинам и азолам (Thompson et al., 2009). Почти все они непосредственно или опосредованно влияют на содержание в клеточной стенке одного из основных структурных компонентов, специфичного для дрожжей, грибов и некоторых протист, — эргостерина. Этот стерин участвует в регуляции большого числа клеточных процессов, таких как эндоцитоз, компартиментализация мембран, образование вакуолей и др. Нарушений этих функций достаточно, чтобы понизить жизнеспособность клеток (Nes et al., 1978).

Наиболее активно в клинической практике для лечения как наружных грибковых инфекций, так и глубоких системных микозов применяют полиеновые макролидные антибиотики, представляющие собой большую группу природных соединений, продуцируемых микроорганизмами *Streptomyces*. В состав их молекул входит лактонное макроциклическое кольцо, содержащее гидро-

ксилированную углеводородную последовательность и цепь сопряженных двойных связей. Среди этих препаратов наиболее высокой биологической активностью обладает амфотерицин В (АВ) (Касумов, 2009).

В настоящее время предложены два взаимодополняющих механизма действия АВ. Согласно общепринятой теории, АВ связывается с плазматической мембраной грибковых клеток, формируя в ней трансмембранные поры, что приводит к нарушению водно-электролитного баланса клетки-мишени и соответственно к ее гибели (Bolard, 1986). Несмотря на длительные исследования молекулярных механизмов формирования и функционирования амфотерициновых каналов, точная молекулярная архитектура канала до сих пор находится на стадии обсуждения. Из предложенных в настоящее время моделей широко принятой является стеринзависимая модель. Согласно этой модели, при двухсторонней относительно мембраны добавке антибиотика формирование канала происходит в результате ассоциации двух «полупор», образованных комплексами полиеновых и стеринных молекул, располагающихся в противоположных монослоях (Andreoli, 1974; De Kruijff et al., 1974; Marty, Finkelstein, 1975).

Второй механизм действия АВ предложили Грей и соавтор., которые показали, что АВ может непосредственно взаимодействовать с эргостерином и вызывать гибель клеток (Gray et al., 2012).

АВ и его липосомальные формы активны против широкого спектра патогенных микроорганизмов, однако у некоторых штаммов (в частности, видов *Candida lusitanae* и *Aspergillus terreus*) формируется устойчивость к

АВ, вероятнее всего вследствие снижения биосинтеза эргостерина или появления альтернативных стеринов с пониженной способностью к комплексообразованию с АВ (Hebeka, Solotorovsky, 1965). Подобная изменчивость возбудителей требует либо увеличения терапевтической дозы, что в случае АВ ведет к тяжелым побочным эффектам (нарушению работы почек, аритмии и анемии), либо разработки на основе уже существующих полиеновых макролидных препаратов новых лекарственных форм, обладающих широким спектром противогрибковой активности и высоким терапевтическим индексом (Shigemi et al., 2011). Таким образом, поиск веществ, способных усиливать действие уже существующих соединений, является одной из наиболее актуальных задач современной фармакологии.

Ранее мы показали, что в модельных липидных бислоях, содержащих эргостерин, стироловый краситель RH 421 увеличивает проводимость одиночных АВ-каналов (Ostroumova et al., 2012). На основании этих данных можно предположить, что RH 421 усиливает мембранную активность АВ и может быть рассмотрен как потенциальный синергист противогрибкового действия полиенового антибиотика. Для проверки этого предположения было необходимо установить, как влияет RH 421 на равновесное число открытых АВ-каналов в модельных содержащих эргостерин бислоях, а также выяснить возможность совместного действия АВ и стиролового красителя в клеточных системах.

Поэтому целью данной работы являлось определение влияния стиролового красителя RH 421 на активность АВ в модельных мембранах и в тест-системе на клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

## Материал и методика

В работе использовали АВ из *Streptomyces* sp., RH 421 (N-(4-сульфобутил)-4-(4-(4-(дипентиламино)фенил)бутандиенил)пиридиниум), ДМСО, KCl, Hepes, пентан, этанол, хлороформ, гексадекан (Sigma Chemical, США); 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДФФХ) и эргостерин (Avanti Polar Lipids, США).

Формирование бислоевых липидных мембран проводили по методу Монтала и Мюллера (Montall, Mueller, 1972) путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстиях в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*цис* и *транс*) отделения. Объем каждого отделения составлял 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки — 10 мкм, диаметр отверстия — около 50 мкм. Перед началом процесса формирования бислоев отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали гексадеканом. Монослой формировали из смеси ДФФХ и эргостерина на границе вода—воздух из раствора липида в пентане (1 мг/мл). Измерения проводили при комнатной температуре. Эксперименты по измерению каналаобразующей активности АВ проводили при одинаковом по обе стороны мембраны ионном составе водных растворов электролита (2.0 М KCl), кислотность растворов (рН 7.0) поддерживали буферной смесью Hepes (5 мМ). Для подачи трансмембранного потенциала и введения сигнала с мембраны использовали хлор-серебряные электроды, соединенные с растворами камеры через мостики, содержащие 1.5 % агарозы в растворе 2 М KCl. Положительным считали потенциал, вызывающий поток катионов из *цис*- в *транс*-отделение камеры. АВ добавля-

ли к водной фазе обеих отделений камеры из раствора в ДМСО (0.1 мг/мл) до конечной концентрации в околомембранных растворах  $10^{-8}$ — $10^{-7}$  М. Электрофизиологические измерения проводили при комнатной температуре. Стироловый краситель RH 421 вводили в мембраноомывающие растворы из миллимолярных растворов в этаноле до конечной концентрации 5 мкМ. Было проведено пять независимых измерений.

Измерения и оцифровку трансмембранных токов проводили в режиме фиксации потенциала с помощью Axopatch 200B и Digidata 1440A (Axon Instruments, США). Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instruments, США). Статистический анализ полученных данных производили при помощи программы Origin 8.0 (OriginLab, США).

В качестве клеточной тест-системы был использован штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* YPH925 (*MAT $\alpha$  trp1-63 ura3-52 ade2-101 his3delta200 trp1delta63 leu2delta1 cyh2R kar1delta15*) (Spencer et al., 1994). Для культивирования дрожжевых клеток использовали полную питательную среду с традиционными компонентами (Difco, США) (Sherman et al., 1986). Дрожжи выращивали в термостате при 30 °С.

Действие препаратов на клетки *S. cerevisiae* in vitro оценивали методом диффузии в агар с бумажных дисков. Использовали суспензию, содержащую примерно  $1 \cdot 10^5$ — $2 \cdot 10^5$  клеток, находящихся в стационарной фазе роста, которую наносили на твердую полную питательную среду в чашках Петри. Сверху помещали стерильные бумажные диски (Whatman, GE Healthcare, Великобритания), которые пропитывали препаратами или растворителями. Диски размещали либо поодиночке, либо парами, так чтобы края дисков соприкасались. Расстояние между центрами дисков и центрами пар дисков было не менее 30 мм. После нанесения тестируемых соединений чашки помещали в термостат на 2 сут. Зоны подавления роста дрожжей представляют собой прозрачные кольца вокруг дисков на фоне равномерного дрожжевого газона. Количественную оценку площади этих зон и последующую обработку результатов проводили с использованием программного пакета ImageJ (Wayne Rasband, США). Для оценки и анализа полученных данных применяли стандартные методы описательной статистики: среднее арифметическое значение, стандартное отклонение от средней величины, 95%-ное доверительные интервалы. Нормальность распределения данных оценивали по критерию Колмогорова—Смирнова, сравнение выборок осуществляли с помощью *t*-критерия Стьюдента (Ланг, Сесик, 2011).

## Результаты и обсуждение

Введение стиролового красителя RH 421 в мембраноомывающий раствор приводит к увеличению каналаобразующей активности в модельных липидных бислоях. Как видно на рис. 1, добавка RH 421 в мембраноомывающие растворы до конечной концентрации 5 мкМ вызывает 7-кратный рост равновесного числа открытых АВ-каналов ( $N_{op}$ ) в липидных бислоях, сформированных из смеси ДФФХ и эргостерина и омываемых 2 М KCl (рН 7.0). Среднее значение увеличения  $N_{op}$  за счет введения RH 421, полученное в пяти независимых экспериментах, составляет  $8.5 \pm 3.2$  раза.

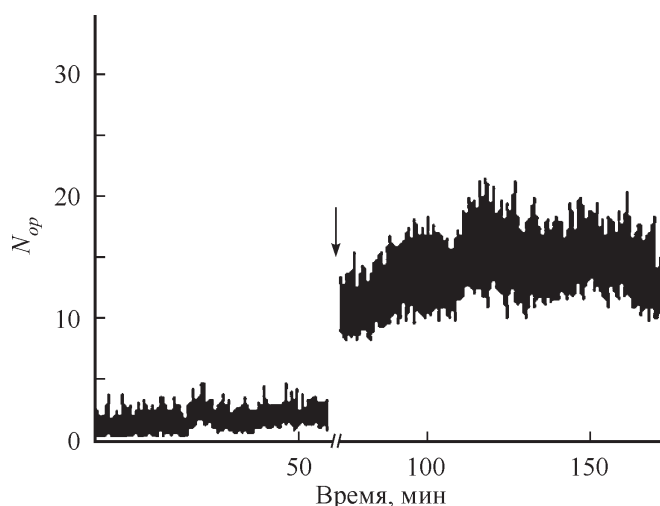


Рис. 1. Влияние стирилового красителя RH 421 на равновесное число функционирующих в мембране амфотерициновых каналов ( $N_{op}$ ).

Мембрана сформирована из ДФФХ и эргостерина (67:33, М%) и омывается 2.0 М КСl (рН 7.0). Трансмембранный потенциал 50 мВ. Стрелкой указан момент введения RH 421 до конечной концентрации 5 мкМ.

Увеличение каналообразующей активности АВ в присутствии RH 421 указывает на возможность синергического влияния стирилового красителя на противогрибковое действие АВ. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты на дрожжевых тест-системах.

Для определения влияния красителя RH 421 на противогрибковую активность АВ использовали стандартный метод диффузии в агар с бумажных дисков, позволяющий количественно оценить противомикробную активность препаратов.

Первым этапом работы было определение минимальной ингибирующей концентрации АВ в используемой системе. Клетки высевали на твердую полную питательную среду в чашки Петри, а сверху помещали стерильные бумажные диски. Расстояние между центрами дисков составляло не менее 30 мм. На бумажные диски наносили растворы АВ в ДМСО в диапазоне концентраций от 4.000 до 0.064 мг/мл. В качестве контроля на бумажный диск наносили ДМСО. После 2 сут культивирования измеряли диаметр областей подавления роста дрожжей, которые представляют собой зоны питательной среды без клеточного газона вокруг дисков на фоне равномерного роста дрожжевых клеток на остальной площади чашек Петри. Результаты опытов представлены в таблице.

Зависимость зоны ингибирования роста дрожжей от концентрации амфотерицина В (АВ)

[АВ], мг/мл	Диаметр зоны ингибирования, см
4.000	$1.35 \pm 0.05$
3.200	$1.21 \pm 0.08$
1.280	$1.13 \pm 0.08$
0.500	$1.00 \pm 0.05$
0.256	Нет
0.000	»
100 % ДМСО	

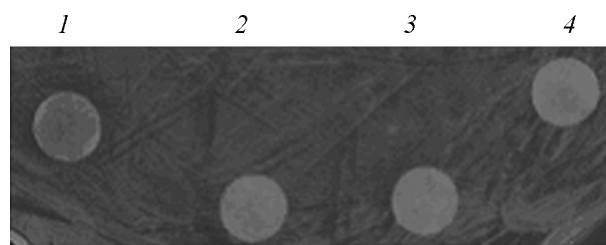


Рис. 2. Проверка влияния стирилового красителя RH 421 на рост *Saccharomyces cerevisiae*.

Диски с красителем RH 421, нанесенным в концентрациях  $10^{-2}$  (1),  $10^{-3}$  (2),  $10^{-4}$  (3) и  $10^{-5}$  (4) М, наложены на питательную среду с микроорганизмами. Ингибирование роста во всех случаях отсутствует.

Исходя из полученных данных, минимальная ингибирующая концентрация АВ составляет 0.5 мг/мл. Эту концентрацию использовали во всех последующих опытах в этой тест-системе.

Следующий этап — оценка возможного противогрибкового действия RH 421. На бумажные диски, помещенные на твердую питательную среду с клетками дрожжей, наносили растворы RH 421 (в этаноле) в диапазоне концентраций от  $10^{-2}$  до  $10^{-5}$  М. Полученные результаты представлены на рис. 2. Ни в одной из используемых концентраций RH 421 не вызывает образования области ингибирования. Поскольку при концентрации  $10^{-2}$  М RH 421 вызывает частичное окрашивание клеток в красный цвет, для дальнейших исследований выбрана концентрация  $10^{-3}$  М, при действии которой окрашивания клеток не происходит.

После выбора рабочих концентраций АВ и его потенциального синергиста оценивали их совместное действие на дрожжевой штамм. Для этого метод диффузии в агар был модифицирован: на среду с микроорганизмами накладывали пары бумажных дисков, соприкасающиеся краями. На один из дисков наносили АВ в концентрации 0.5 мг/мл, а на парный — либо RH 421 ( $10^{-3}$  М), либо растворитель, 96%-ный этиловый спирт (контроль), после чего рассчитывали площадь области ингибирования роста клеток вокруг пары дисков. На рис. 3 можно видеть четкие области ингибирования, которые при совместном действии АВ и RH 421 (рис. 3, а) в двух случаях из трех

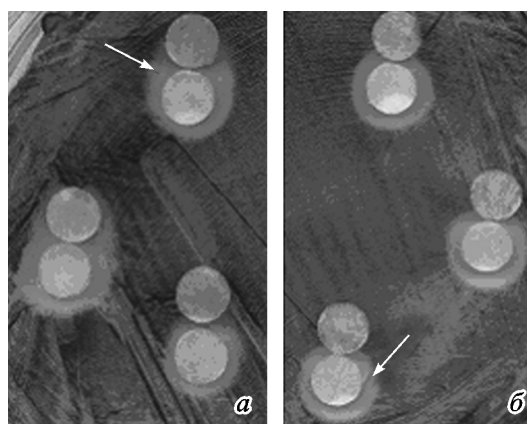


Рис. 3. Зоны ингибирования роста *Saccharomyces cerevisiae* (указаны стрелками), полученные при совместном действии АВ и стирилового красителя RH 421 (а) и АВ и 96%-ного этанола (б).

Объяснения в тексте.

больше, чем в контроле (рис. 3, б). Для количественной оценки областей ингибирования рассчитывали их площади в программе ImageJ.

Сравнение средних площадей областей ингибирования, полученных при совместном действии АВ и RH421 ( $n = 50$ ) и когда АВ действовал отдельно ( $n = 44$ ), выявило увеличение средней площади при совместном действии АВ и RH421 : 46.5 против 31.1 мм<sup>2</sup> в случае действия только АВ. Разность средних значений составила 15.4 мм<sup>2</sup> (разброс значений 12.5—19.2 мм<sup>2</sup>, доверительный интервал 95 %, критерий Стьюдента  $t = 9.1$ , количество степеней свободы 43,  $P < 0.001$ ).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что присутствие RH 421 в тест-системе усиливает противогрибковую активность АВ, и это подтверждает данные, полученные на модельных мембранах *in vitro*. Полученные результаты указывают на новое направление поиска потенциальных синергистов противогрибкового действия полиенов, которые могут быть использованы для создания на их основе лечебных препаратов с улучшенными фармакологическими свойствами. В дальнейшем это может способствовать расширению сферы использования полиеновых антибиотиков в терапевтических целях.

Авторы выражают благодарность Л. В. Шагиной и О. В. Невзглядовой за участие в обсуждении результатов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы президента РФ (МК-1813.2012.4), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00948), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ГК № 8119 (МОН РФ, ФЦП «ННПКИР»).

#### Список литературы

- Касумов Х. М. 2009. Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков. М.: Наука. 512 с.
- Ланг Т. А., Сесик М. 2011. Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов. М.: Практическая медицина. 480 с.
- Andreoli T. E. 1974. The structure and function of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235 : 448—468.
- Bolard J. 1986. How do polyene macrolid antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. biophys. acta.* 864 : 257—304.
- De Kruijff B., Gerritsen W. J., Oerlemans A., Demel R. A., van Deenen L. L. 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. *Biochim. biophys. acta.* 339 : 30—43.
- Ghannoum M. A., Rice L. B. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microb. Rev.* 12 : 501—517.
- Gray K. C., Palacios D. S., Dailey I., Endo M. M., Uno B. E., Wilcock B. C., Burke M. D. 2012. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 109 : 2234—2239.
- Hebeka E. K., Solotorovsky M. 1965. Development of resistance to polyene antibiotics in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 89 : 1533—1539.
- Marty A., Finkelstein A. 1975. Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin, differences in its one-sided and two-sided action. *J. Gen. Physiol.* 65 : 515—526.
- Montall M., Muller P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 65 : 3561—3566.
- Nes W. R., Sekula B. C., Nes W. D., Adler J. H. 1978. The functional importance of structural features of ergosterol in yeast. *J. Biol. Chem.* 253 : 6218—6225.
- Ostroumova O. S., Efimova S. S., Schagina L. V. 2011. Probing amphotericin B single channel activity by membrane dipole modifiers. *PLoS ONE.* 7 : e30261.
- Sherman F., Fink G. R., Hicks J. B. 1986. Laboratory course manual for methods in yeast genetics. New York: Cold Spring Harbour. 186 p.
- Shigemi A., Matsumoto K., Ikawa K., Yaji K., Shimodozono Y., Morikawa N., Takeda Y., Yamada K. 2011. Safety analysis of liposomal amphotericin B in adult patients: anaemia, thrombocytopenia, nephrotoxicity, hepatotoxicity and hypokalaemia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 38 : 417—420.
- Spencer F., Hugerat Y., Simchen G., Hurko O., Connelly C., Hieter P. 1994. Yeast *kar1* mutants provide an effective method for YAC transfer to new hosts. *Genomics.* 22 : 118—126.
- Thompson G. R., Caneda J., Patterson T. F. 2009. Overview of antifungal agents. *Clin. Chest. Med.* 30 : 203—215.

Поступила 20 X 2012

#### THE EFFECTS OF RH 421 ON THE ACTIVITY OF AMPHOTERICIN B IN CELL AND MODEL MEMBRANES

E. V. Mikhailova,<sup>1</sup> S. S. Efimova, O. S. Ostroumova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

<sup>1</sup> e-mail: mikhailovaev@list.ru

The combined action of polyene macrolide antibiotic amphotericin B and styryl dye RH 421 in model lipid membranes and in yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been studied. RH 421 insertion into the ergosterol-containing lipid bilayers led to the increase of the steady-state number of open amphotericin channels by  $8.5 \pm 3.2$  times. Paper disk agar diffusion method has demonstrated that RH 421 enhanced the antimicrobial effect of amphotericin B leading to an increase in the zone of growth inhibition of *S. cerevisiae* strain by 1.5 times. Our data suggest that RH 421 is a potential synergist of amphotericin B and can be used in new formulations with improved pharmacological properties.

Key words: amphotericin B, RH 421, lipid bilayers, *Saccharomyces cerevisiae*.