

## Wiązanie amfoterycyny B do upigmentowanych grzybów mikroskopowych *Cladosporium cladosporioides*

Amphotericin B binding to pigmented microscopic fungi *Cladosporium cladosporioides*

Teresa Witoszyńska, Magdalena Kulik, Ewa Buszman, Janina Trzcionka

### STRESZCZENIE

#### WSTĘP

Ciemno upigmentowane grzyby mikroskopowe *Cladosporium cladosporioides* mogą wywoływać zakażenia, szczególnie u osób z obniżoną odpornością organizmu. Grzyby te w swojej ścianie komórkowej zawierają biopolimery melaninowe ochraniające grzybnię, zdolne do wiązania różnych związków chemicznych, w tym leków. Celem pracy była ocena zdolności wiązania antybiotyku przeciwgrzybiczego amfoterycyny B do grzybni *Cladosporium cladosporioides*, melaniny wyizolowanej z grzybni i do syntetycznej DOPA-melaniny.

#### MATERIAŁ I METODY

Upigmentowane grzyby glebowe *Cladosporium cladosporioides* hodowano w płynnej pożywce standardowej. Melaninę naturalną izolowano z grzybni metodą hydrolizy kwaśnej. Syntetyczną DOPA-melaninę uzyskano w wyniku reakcji oksydacyjnej polimeryzacji L-DOPA. Próbkę melanin i grzybni kompleksowano z roztworami amfoterycyny B o różnych stężeniach, stosując różne czasy inkubacji. Do oznaczenia ilości leku związanego z grzybnią i melaninami zastosowano technikę spektrofotometrii UV-VIS.

#### WYNIKI

Wykazano, że amfoterycyna B tworzy kompleksy z grzybnią *Cladosporium cladosporioides*, z melaniną wyizolowaną z grzybni i z syntetyczną DOPA-melaniną. Ilości leku związanego z melaninami zwiększają się wraz ze wzrostem stężenia wyjściowego antybiotyku i wydłużaniem czasu inkubacji.

#### WNIOSKI

Silne oddziaływanie amfoterycyny B z melaninami może obniżać funkcje ochronne melanin w stosunku do grzybni *Cladosporium cladosporioides*.

Katedra i Zakład  
Chemii i Analizy Leków  
Wydziału Farmaceutycznego  
Z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach

#### ADRES

##### DO KORESPONDENCJI:

Prof. dr hab. n. farm. inż. Ewa Buszman  
Katedra i Zakład Chemii i Analizy Leków  
Wydziału Farmaceutycznego  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach  
ul. Jagiellońska 4,  
41-200 Sosnowiec  
tel. 32 364 16 11  
e-mail: ebuszman@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2012, 66, 2, 34–38  
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach  
ISSN 0208-5607

## SŁOWA KLUCZOWE

amfoterycyna B, *Cladosporium cladosporioides*, melanina

## ABSTRACT

## BACKGROUND

Dark pigmented microscopic fungi *Cladosporium cladosporioides* can lead to infection in immunocompromised patients. Melanin biopolymers present in the cell wall protect mycelium and are able to bind different chemicals, including drugs.

The aim of this work was to examine the binding capacity of antifungal antibiotic amphotericin B to crude mycelium of *Cladosporium cladosporioides*, melanin isolated from mycelium and to synthetic DOPA-melanin.

## MATERIAL AND METHODS

Pigmented soil fungi *Cladosporium cladosporioides* were cultured in the standard liquid medium. Natural melanin was isolated from dry mycelium by acid hydrolysis. Synthetic DOPA-melanin was formed by oxidative polymerization of L-DOPA. Samples of dry mycelium and melanins were complexed with different concentrations of amphotericin B using different times of incubation. The amounts of drug bound to mycelium and to melanins were determined by the use of UV-VIS spectrophotometric method.

## RESULTS

It has been demonstrated that amphotericin B forms complexes with *Cladosporium cladosporioides* mycelium as well as with melanin isolated from mycelium and with synthetic DOPA-melanin. The amounts of drug bound to melanins increase with increasing initial antibiotic concentration and prolongation of incubation time.

## CONCLUSION

The ability of amphotericin B to form complexes with melanin may be one of the reasons of decreased melanin protection in relation to *Cladosporium cladosporioides* mycelium.

## KEY WORDS

amphotericin B, *Cladosporium cladosporioides*, melanin

## WSTĘP

Ciemno upigmentowane grzyby saprofityczne *Cladosporium spp.* należą do klasy grzybów niedoskonałych *Deuteromycetes* [1]. Niektóre z nich są patogenne i toksykogenne dla ludzi i znane jako przyczyny mózgowych oraz skórnych feohyfomikoz [2]. *Cladosporium castellani* oraz *Cladosporium wernecki* mogą wywołać grzybicę powierzchniową, natomiast *Cladosporium bantianum* i *Cladosporium cladosporioides* odpowiedzialne są za podskórną bądź układową feohyfomikozę [1]. *Cladosporium spp.* są też silnymi alergenami i powodują

poważne dolegliwości alergiczne w drogach oddechowych, jak również uszkodzenia wewnątrzoskrzelowe [2]. Zakażenia grzybami *Cladosporium cladosporioides* dotyczą głównie osób z obniżoną odpornością, chociaż mogą występować również u zdrowych ludzi, u których nie stwierdzono zaburzeń immunologicznych.

Upigmentowane grzyby mikroskopowe *Cladosporium cladosporioides* charakteryzują się obecnością w ścianie komórkowej biopolimerów melaninowych. Obecność ugrupowań chinonowych, hydrochinonowych, semichinonowych, pierścieni aromatycznych i grup hydroksylowych w melaninie nadaje jej stabilność

wolnorodnikową, możliwość absorpcji światła i energii cieplnej, zdolność wiązania białek, polisacharydów, jonów metali, pestycydów, zanieczyszczeń i leków, co wyjaśnia wiele ochronnych funkcji melanin. Melanina spełnia funkcje ochronne w stosunku do grzybni, wpływa na oddziaływanie lek-grzybni i tym samym może modyfikować skuteczność podanego leku [3,4,5,6,7].

W zakażeniach grzybami barwnikowymi, np. w feohyfomikozie i chromoblastomikozie wywołanych m.in. przez *Cladosporium spp.* i *Phialophora*, podaje się flucytozynę – syntetyczną pochodną pirymidyny, ale w większości przypadków grzybic dodatkowo inne leki przeciwgrzybicze, np. amfoterycynę B [8].

Amfoterycyna B należy do grupy polienowych makrolidowych antybiotyków [9]. Jest lekiem z wyboru w leczeniu większości grzybic układowych, gdyż daje najwyższe szanse na wyleczenie w rozsianej kandydozie, kryptokozie i aspergiliozie [10]. Korzystne jest łączenie amfoterycyny B z flucytozyną w kryptokozie, kandydozie narządowej, w zapaleniu wsierdza wywołanego przez grzyby [11] oraz w zakażeniach grzybami z rodziny *Dematiaceae*, w tym *Cladosporium cladosporioides* [5,6,12].

Celem niniejszej pracy było zbadanie zdolności wiązania amfoterycyny B do grzybni *Cladosporium cladosporioides*, melaniny wyizolowanej z grzybni i porównawczo do syntetycznej DOPA-melaniny.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiał badany stanowiły upigmentowane grzyby mikroskopowe *Cladosporium cladosporioides* pozyskane ze środowiska naturalnego południowej Polski. Hodowle grzybni w pożywce standardowej (glukoza 20,0 g, ekstrakt drożdżowy 10,0 g, pepton 10,0 g, woda redetylowana ad 1 dm<sup>3</sup>, o pH = 7,0) prowadzono przez 14 dni w temperaturze 26–28°C, następnie grzybnie sączono i suszono do stałej masy. Melaninę izolowano z grzybni metodą hydrolizy w 6M HCl w temperaturze 110°C przez 24 godziny.

Syntetyczną DOPA-melaninę otrzymano w wyniku reakcji oksydacyjnej polimeryzacji 3,4-dihydroksyfenylo-L-alaniny (L-DOPA prod. Sigma Chem. Co) w 1/15 M buforze fosforanowym o pH 8,0.

Amfoterycynę B w postaci preparatu Amphotericin B solubilized (proszek do przygotowania roztworów do infuzji o składzie: amfoterycyna B – 45%, deoksyholan sodu – 35%, fosforan sodu-stabilizator) zakupiono w firmie Sigma Chem. Co.

Kompleksy amfoterycyny B z grzybnią *Cladosporium cladosporioides*, melaniną wyizolowaną z grzybni i syntetyczną DOPA-melaniną otrzymano w wyniku inkubacji próbek po 5 mg każda z 5 ml roztworu leku przygotowanego w 5% glukozie o stężeniach: 1,8; 2,7; 4,5; 6,3; 8,1 µg/cm<sup>3</sup>. Dla próbek grzybni i melanin zastosowano czasy inkubacji: 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90 minut. Równocześnie z próbkami badanymi przygotowano próbki kontrolne niezawierające substancji leczniczej.

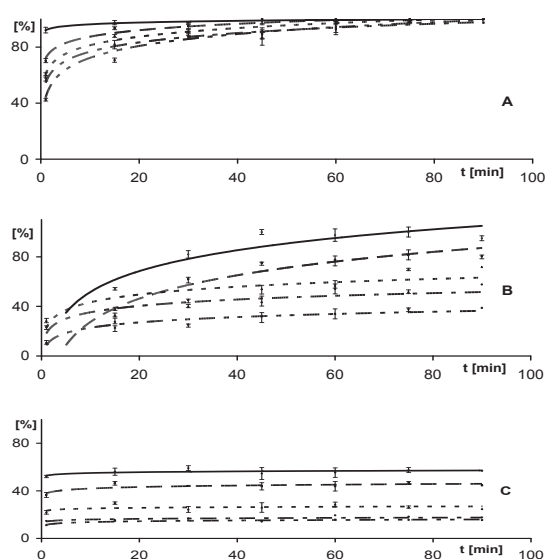
Ilość amfoterycyny B związanej z próbkami grzybni i melanin oznaczono metodą spektrofotometryczną przez pomiar absorbancji roztworów wzorcowych o znanym stężeniu leku oraz supernatantów otrzymanych po kompleksowaniu zawierających niezwiązany lek. Pomiary przeprowadzono spektrofotometrem UV-VIS firmy Jasco, model V-530 przy długości fali 328 nm. Ilość związanej amfoterycyny B wyrażono w µg/mg melaniny lub grzybni. Dla każdego układu badawczego wykonano po 3 równoległe próby, dla których obliczono wartości średnie oraz odchylenia standardowe (SD, *standard deviation*).

#### WYNIKI I DYSKUSJA

Oddziaływanie amfoterycyny B z melaninami i z grzybnią *Cladosporium cladosporioides* oceniano przy zastosowaniu różnych stężeń leku i różnych czasów inkubacji. Stężenia roztworów amfoterycyny B dobrano na podstawie danych literaturowych, uwzględniając zarówno stosowane stężenia terapeutyczne (od 0,5 do 3,5 µg/cm<sup>3</sup> surowicy) [11], jak i stężenia stosowane w badaniach naukowych (od 0,03 do 16 µg/cm<sup>3</sup> pożywki), dotyczących wyznaczenia wartości MIC (*minimal inhibitory concentration*) i MFC (*minimal fungicidal concentration*) dla tego leku w stosunku do konidii i strzępek rodzaju *Cladosporium* [13].

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pozwalają stwierdzić, że ilość amfoterycyny B związanej z 1 mg syntetycznej DOPA-melaniny (ryc. 1A) oraz melaniny wyizolowanej z grzybni (ryc. 1B) rośnie wraz z wydłużaniem

czasu inkubacji, osiągając wartość maksymalną po ok. 90 min kompleksowania. Dla wyjściowych stężeń leku od 1,8 do 8,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  ilość związanej amfoterycyny B wynosiła 1,8–7,9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  syntetycznej DOPA-melaniny i 1,7–3,2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  melaniny wyizolowanej z grzybni. Wiązanie amfoterycyny B do grzybni *Cladosporium cladosporioides* (ryc. 1C) w zakresie stosowanych stężeń leku odbywało się na podobnym poziomie (średnio 1,1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  grzybni), niezależnie od czasu kompleksowania, co sugeruje, że w wiązaniu tym bierze udział głównie melanina, stanowiąca ok. 17,6% wszystkich składników ściany komórkowej grzybni [14].



**Ryc. 1.** Zależność ilości amfoterycyny B (%) związanej z syntetyczną DOPA-melaniną (A), z melaniną wyizolowaną z grzybni (B), z grzybnią *Cladosporium cladosporioides* (C) od czasu kompleksowania (t) i stężenia wyjściowego leku ( $c_0$ ). —  $c_0 = 1,8 \mu\text{g}/\text{ml}$ , - - -  $c_0 = 2,7 \mu\text{g}/\text{ml}$ , •••  $c_0 = 4,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ , - • -  $c_0 = 6,3 \mu\text{g}/\text{ml}$ , - •• -  $c_0 = 8,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ .  
**Fig. 1.** The effect of incubation time (t) and initial drug concentration ( $c_0$ ) on the amount (%) of amphotericin B bound to synthetic DOPA-melanin (A), melanin isolated from mycelium (B), and to crude mycelium *Cladosporium cladosporioides* (C).

Syntetyczna DOPA-melanina i melanina wyizolowana z grzybni wiązały więcej amfoterycyny B niż grzybnia *Cladosporium cladosporioides*, co świadczy o wysokim powinowactwie antybiotyku do melaniny i o możliwej zmianie aktywności przeciwgrzybiczej leku, wynikającej z tworzenia kompleksu lek-melanina. Badania Nosanchuka [15], w których oceniano aktywność leków przeciwgrzybiczych, w tym amfoterycyny B i flucytozyny, uprzednio inkubowanych z syntetyczną DOPA-me-

laniną i melaniną produkowaną przez *Cryptococcus neoformans*, potwierdzają tego typu przypuszczenia. Inkubacja amfoterycyny B z melaninami znacząco redukowała aktywność leku w stosunku do grzyba *Cryptococcus neoformans*, obserwowano także zmiany w elementarnym składzie melanin pod wpływem tego leku. Inkubacja flucytozyny z melaninami nie wpływała ani na zmianę aktywności przeciwgrzybiczej leku, ani na elementarny skład melanin.

W zakażeniach grzybami barwnikowymi dobre efekty terapeutyczne obserwuje się po równoczesnym podaniu flucytozyny i amfoterycyny B. Synergizm działania tych leków może być związany z ich odmiennymi uzupełniającymi się mechanizmami działania. Flucytozyna wpływa na syntezę RNA oraz DNA i w efekcie hamuje biosyntezę białka komórki grzyba [6]. Z kolei amfoterycyna B łącząc się z ergosterolem zwiększa przepuszczalność błony komórkowej (permeabilizacja), co prowadzi do wydostawania się na zewnątrz składników komórkowych, przerywania procesów metabolicznych i obumarcia komórki [10,16,17,18]. Badania własne [19] dotyczące wiązania flucytozyny do grzybni *Cladosporium cladosporioides*, melaniny wyizolowanej z grzybni i syntetycznej DOPA-melaniny wskazują na niski udział melanin w wiązaniu tego leku. Słabe oddziaływanie melanin z flucytozyną sugeruje, że melanina nie przeszkadza w przejściu tego leku do miejsca jego działania, czyli do wnętrza komórki grzybowej, i nie wpływa znacząco na jego aktywność, natomiast wykazane w niniejszej pracy wysokie wiązanie się melanin z amfoterycyną B może sugerować zatrzymanie się leku w ścianie komórkowej i osłabienie ochronnego działania melanin w stosunku do grzybni.

WNIOSKI

1. Wykazana zdolność wiązania amfoterycyny B do melanin *in vitro* może być powodem obniżenia właściwości ochronnych melanin w stosunku do grzybni *Cladosporium cladosporioides*.
2. Badania oddziaływania leków przeciwgrzybiczych z melaniną mogą posłużyć ocenie skuteczności tych leków w terapii chorób wywołanych grzybem zawierającym melaninowy pigment.

## PIŚMIENNICTWO

1. Plomer-Niezgoda E., Baran E., Maj E., Czarnecka A., Hryncewicz-Gwóźdź A. Patogenność grzybów z rodzaju *Alternaria*, *Cladosporium* i *Chrysosporium*. Mikol. Lek. 1998; 5: 187–190.
2. Tasic S., Miladinovic-Tasic N. *Cladosporium spp.* – cause of opportunistic mycoses. Acta Fac. Med. Naiss. 2007; 24: 15–19.
3. Buttler M.J., Day A.W. Fungal melanins: a review. Can. J. Microbiol. 1998; 44: 1115–1136.
4. Langfelder K., Streibel M., Jahn B., Haase G., Brakhage A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. Fungal Genet. Biol. 2003; 38: 143–158.
5. Revankar S.G. Therapy of infections caused by *Dematiaceous* fungi. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2005; 3: 601–612.
6. Vermes A., Guchelaar H.J., Dankert J. Flucytosine: a review its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. J. Antimicrob. Chemother. 2000; 46: 171–179.
7. Henson J.M., Buttler M.J., Day A.W. The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 1999; 37: 447–471.
8. Jacobson E.S. Pathogenic roles of fungal melanins. Clin. Microbiol. Rev. 2000; 13: 708–717.
9. Bagiński M., Sternal K., Czub J., Borowski E. Molecular modeling of membrane activity of amphotericin B a polyene macrolide antifungal antibiotic. Acta Biochim. Pol. 2005; 52: 655–658.
10. Lambert H.P., O Grady F.W. Antybiotyki i chemoterapia. Wydawnictwo Medyczne, Warszawa 1994.
11. Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlowska A. Leki współczesnej terapii. Wyd. Split Trading, Warszawa, 2007.
12. Maleszka R., Baran E. Lecznictwo mikologiczne w końcu dwudziestego wieku. Mikol. Lek. 2000; 7: 45–55.
13. Guarro J., Llop C., Agular C., Pujol J. Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41: 2760–2762.
14. Latg J.P., Bouziane H., Diaguin M. Ultrastructure and composition of the conidial wall of *Cladosporium cladosporioides*. Can. J. Microbiol. 1988; 34: 1325–1329.
15. Nosanchuk J. D., Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50: 3519–3528.
16. Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L. The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill Medical Publishing Division, eleventh edition, New York 2006.
17. Farmakopea Polska VI. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2005.
18. Diamond R. D. Atlas of Fungal Infections. Current Medicine, Philadelphia 2000.
19. Witoszyńska T., Buszman E. Wiązanie flucytozyny do upigmentowanych grzybów mikroskopowych *Cladosporium cladosporioides*. Farm. Przegl. Nauk. 2008; 5: 55–57.