

## VLIV AMPHOTERICINU B, CHITOSANU A BAICALEINU NA TVORBU BIOFILMU *Trichosporon cutaneum* CCY 30-5-10

PETRA KAŠPAROVÁ, EVA VAŇKOVÁ, OLGA MAŽÁTKOVÁ a JAN MASÁK

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
olga.matatkova@vscht.cz

Došlo 18.1.18, přepracováno 9.8.18, přijato 13.11.18.

Klíčová slova: *Trichosporon cutaneum*, trichosporonóza, amphotericin B, baicalein, chitosan, biofilm, Cellavista

### Úvod

*Trichosporon* spp. patří mezi kvasinky, které jsou významnou součástí lidského kožního mikrobiomu, gastrointestinálního traktu a dýchacích cest<sup>1</sup>. Vedle mnohem známějšího rodu *Candida* patří zástupci rodu *Trichosporon* mezi druhé nejvíce rozšířené fungální podmíněné patogeny<sup>1,2</sup>. Onemocnění způsobená zástupci rodu *Trichosporon* (*T. asahii*, *T. asteroides* nebo *T. mucoides*) jsou často spojena s tvorbou biofilmu, který umožňuje osídlení povrchu tkání v hostitelském organismu, katetrů a dalších medicínských materiálů<sup>2,3</sup>. Biofilm je konsorcium buněk mikroorganismů pevně přichycených k povrchu a k sobě navzájem pomocí extracelulární matrix, kterou si samy vytvářejí<sup>4,5</sup>. Přítomnost matrice biofilmu snižuje možnosti imunitního systému hostitelského organismu zneškodnit toto společenství a významně přispívá ke vzniku antibiotecké rezistence buněk v něm obsažených<sup>6</sup>. Méně sledovaným, avšak velmi častým podmíněným patogenem této skupiny, je *T. cutaneum*, kterému je věnována tato práce. Způsobuje alergické pneumonie a je v důsledku původcem kožních onemocnění<sup>1,2</sup>. Přestože se jedná o relativně neškodná onemocnění, důsledkem stále se zvyšující rezistence k antimikrobiálním látkám těchto zástupců rodu *Trichosporon* dochází u imunosuprimovaných pacientů k rozvoji invazivní formy infekcí a k výskytu vysoce rezistentních kmenů odolných k antifungálním azolům, kaspofunginu nebo i amphotericinu B (cit.<sup>1</sup>).

Tato práce se zaměřuje na použití tří biologicky aktivních látek s potenciálním antibiofilmovým účinkem. Jedná se o chitosan, přírodní polysacharid získávaný částečnou *N*-deacetylací z chitinu s významným antimikrobiálním potenciálem, baicalein, flavonoid izolovaný ze *Scutellaria baicalensis* s prokázáním antibiofilmovým účinkem u některých gramnegativních bakterií a amphotericin B, polyenové antibiotikum typické pro fungální terapii<sup>7,8</sup>. Schopnost těchto látek interferovat s procesem tvorby bio-

filmu *T. cutaneum* byla sledována v různých stádiích tvorby biofilmu.

### Experimentální část

Použitý mikroorganismus a růstové médium

*Trichosporon cutaneum* CCY 30-5-10 byl získán z mikrobiologické sbírky Zbierka kultur kvasiniek (Culture Collection of Yeast) Chemického ústavu Slovenské akademie vied. Mikroorganismus byl uchovávan v 50% glycerolu při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jako růstové médium byl použit Živný bujón (Carl Roth, Německo), připravený v koncentraci  $8\text{ g l}^{-1}$ . Kultivace inokula probíhala do pozdní exponenciální fáze (72 h) na orbitální třepačce při  $150\text{ min}^{-1}$  a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Antimikrobiální látky

Amphotericin B (Sigma-Aldrich, USA) byl rozpuštěn v růstovém médiu do finálních koncentrací 2,5; 5; 7,5; 10 a  $20\text{ mg l}^{-1}$ . Nízkomolekulární chitosan (50–190 kDa; Sigma-Aldrich, USA) byl připraven rozpuštěním v okysele-ném růstovém médiu (1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; Penta, Česká republika) pomocí sonikace a byl dále použit ve finálních koncentracích 5; 10; 15; 20 a  $40\text{ mg l}^{-1}$ . Baicalein (Aldrich Chemistry, Čína) byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (Carl Roth, Německo) a dále byl použit ve finálních koncentracích 20; 40; 50; 60 a  $80\text{ mg l}^{-1}$  a přidán do růstového média tak, aby dimethylsulfoxid tvořil maximálně 1 % celkového objemu (dimethylsulfoxid v této koncentraci neovlivnil kultivaci, pro další experimenty byla použita kontrola bez přídavku dimethylsulfoxidu). Jako kontrola byl použit experiment sledující růst mikroorganismu bez přítomnosti antimikrobiálních látek, pouze v přítomnosti růstového média. Všechny experimenty byly provedeny v 16 paralelách.

Tvorba biofilmu

Kultivace buněk za účelem analýzy tvorby biofilmu probíhala v 96jamkových mikrotitračních sterilních polystyrenových destičkách (TPP AG, Švýcarsko). Inokulum (příprava viz výše) bylo odstředěno (23 000 g, 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a buňky byly resuspendovány v růstovém médiu. Optická densita suspenze buněk byla upravena na  $\text{OD}_{600\text{ nm}} = 0,800$ . Každá jamka obsahovala 210  $\mu\text{l}$  této suspenze buněk. Obsah jamky byl doplněn 70  $\mu\text{l}$  média a případně antimikrobiální látky v závislosti na daném experimentu:

1. sledování vlivu antimikrobiálních látek na adhezi buněk biofilmu: antimikrobiální látky byly přidány do suspenze buněk na počátku kultivace (72 h při  $150\text{ min}^{-1}$  a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),
2. sledování vlivu antimikrobiálních látek na rozvoj rostoucího biofilmu: antimikrobiální látky byly přidány po 48 hodinách kultivace při  $150\text{ min}^{-1}$  a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bio-

film byl dále kultivován při stejných podmínkách 24 h,

3. sledování eradikace vzniklého biofilmu pomocí antimikrobiálních látek: po 48 h kultivace při  $150 \text{ min}^{-1}$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  byla suspenze buněk v jamkách odsáta a biofilm byl třikrát promyt  $200 \mu\text{l}$  fyziologického roztoku (0,9% NaCl (aq); Penta, Česká republika), následně byl přidán roztok antimikrobiální látky v růstovém médiu v objemu  $200 \mu\text{l}$  a biofilm byl dále inkubován 24 h při  $150 \text{ min}^{-1}$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

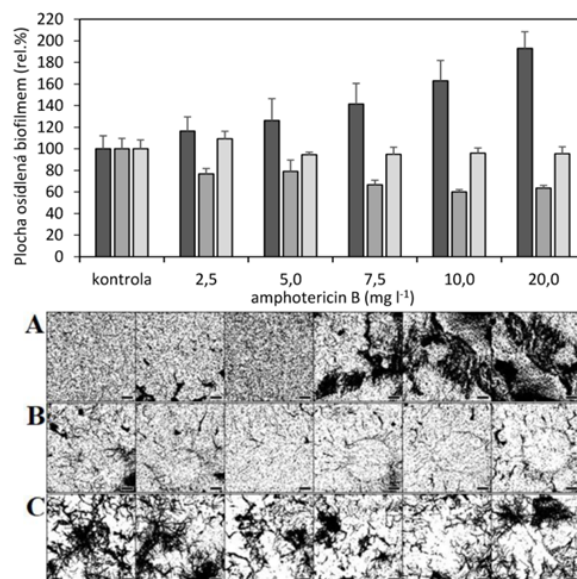
#### Analýza biofilmu

Pro vyhodnocení vlivu antimikrobiálních látek na tvorbu a eradikaci biofilmu *T. cutaneum* byl použit automatický inverzní světelný mikroskop Cellavista (SynenTec, Německo), podrobný postup byl publikován<sup>9</sup>. Biofilm byl po ukončení kultivace promyt třikrát  $200 \mu\text{l}$  fyziologického roztoku a pomocí zařízení Cellavista byla stanovena plocha dna jamky osídlená buňkami biofilmu v relativních procentech vztažených ke kontrolním jamkám obsahujícím biofilm bez přídavku antimikrobiálních látek. Bylo pořízeno 25 snímků ( $5 \times 5$ ,  $0,2 \text{ m}^2$ ,  $2048 \times 2048 \text{ px}$ , 8 MB, světelná mikroskopie) biofilmu ve středu každé jamky. Parametry zařízení byly nastaveny na expoziční čas 25 ms, citlivost 16krát, objektiv 20krát, a 100% intenzitu. Pořízené snímky byly převedeny do binárního zobrazení a analýzou obrazu byla vyhodnocena plocha osídlení dna jamky biofilmem (Cell Confluence, software Cellavista)<sup>3,9</sup>.

#### Výsledky a diskuse

V této práci byl sledován vliv tří antimikrobiálních látek – amphotericinu B, chitosanu a baicaleinu na adhezi buněk *T. cutaneum* CCY 30-5-10, rozvoj biofilmu a následnou eradikaci již vzniklého biofilmu. Amphotericin B byl vybrán jako zástupce klinicky významných antibiotik, chitosan a baicalein byly vybrány na základě jejich biologické aktivity a známých interakcí s podmíněně patogenními kvasinkami např. z rodu *Candida* a jejich biofilmem<sup>10,11</sup>. V naší práci bylo zjištěno, že amphotericin B značně stimuluje adhezi buněk k polystyrenovému povrchu (obr. 1).

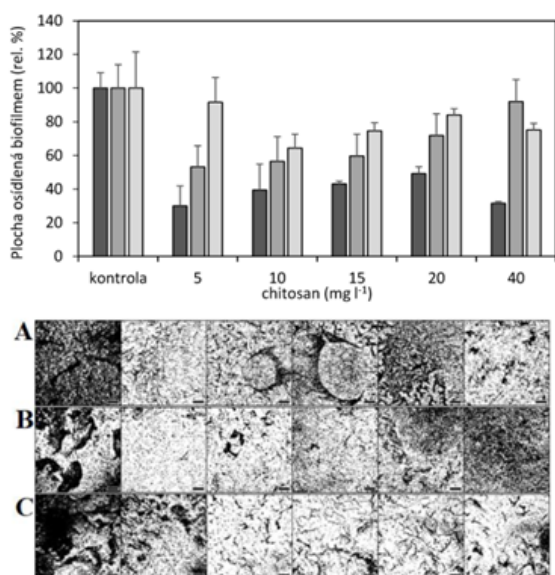
Jak naznačují i snímky (obr. 1), *T. cutaneum* tvoří v přítomnosti amphotericinu B kompaktní shluky. Při koncentraci  $10 \text{ mg l}^{-1}$  došlo v přítomnosti amphotericinu B ke zvýšení adheze *T. cutaneum*, a to až o 40 % osídlené plochy oproti kontrole. Tento efekt může být způsoben např. obrannou reakcí mikroorganismu na přítomnost antibiotika v podobě zvýšené tvorby biofilmu. V literatuře je uváděno, že již při koncentraci amphotericinu B  $1 \text{ mg l}^{-1}$  došlo k 50% snížení tvorby biofilmu *Trichosporon* spp.<sup>12</sup>. Amphotericin B v naší práci neměl významný vliv na eradikaci již vytvořeného biofilmu, v tomto uspořádání experimentu nedošlo k ovlivnění osídlené plochy o více než 10 %.



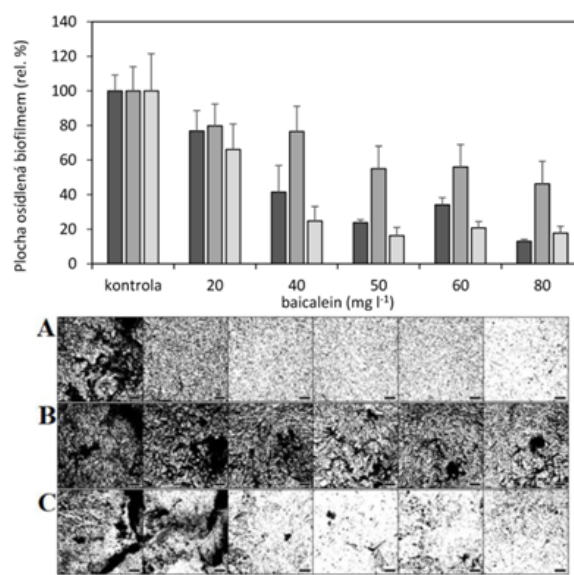
Obr. 1. Vliv amphotericinu B na adhezi buněk (■), tvorbu biofilmu (▣) a eradikaci biofilmu (◻) *T. cutaneum* CCY 30-5-10 (72 h,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $150 \text{ min}^{-1}$ ). Binárně zpracované snímky (A: adheze, B: tvorba biofilmu, C: eradikace biofilmu) znázorňují vliv amphotericinu B na plochu osídlenou biofilmem (tmavé oblasti). Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 16 paralel. Úsečka v pravém dolním rohu obrázků představuje měřítko ( $200 \mu\text{m}$ )

Účinek chitosanu na kvasinky je studován převážně na zástupcích rodu *Candida*, vliv chitosanu na rod *Trichosporon* zatím detailně studován nebyl. V naší práci již nejnižší použitá koncentrace chitosanu ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ) způsobila 71% pokles plochy osídlené biofilmem *T. cutaneum* při sledování jeho účinku na adhezi buněk. Podobný efekt měla nejvyšší použitá koncentrace chitosanu ( $40 \text{ mg l}^{-1}$ ), která způsobila inhibici adheze buněk o 69 %, viz obr. 2. Při sledování vlivu chitosanu na tvorbu biofilmu bylo zjištěno, že koncentrace chitosanu  $5 \text{ mg l}^{-1}$  zmenšila plochu osídlenou biofilmem o 47 %. Významný vliv na eradikaci biofilmu nebyl pozorován. Nízkomolekulární chitosan ( $50 \text{ kDa}$ ) byl schopen z 50 % inhibovat tvorbu biofilmu různých kmenů *Candida parapsilosis* v rozmezí koncentrací  $20\text{--}80 \text{ mg l}^{-1}$ , u různých kmenů *C. krusei* se toto rozmezí koncentrací pohybovalo převážně mezi  $40$  a  $80 \text{ mg l}^{-1}$ . Kmeny *C. albicans* vykazovaly vyšší odolnost – rozmezí koncentrací chitosanu inhibující tvorbu biofilmu z 50 % se pohybovalo mezi  $80$  až  $630 \text{ mg l}^{-1}$  (cit.<sup>13</sup>). U suspenzí buněk *Saccharomyces cerevisiae* byl popsán vliv chitosanu jako induktoru stresových odpovědí a s tím souvisejících změn v transkripci<sup>14</sup>.

Nejvyšší účinek vykazoval ze studovaných látek baicalein, který výrazně inhiboval adhezi buněk *T. cutaneum* (při nejvyšší testované koncentraci  $80 \text{ mg l}^{-1}$  o 87 %) (obr. 3). Baicalein v koncentraci  $50 \text{ mg l}^{-1}$  způsobil 45% zmenšení plochy osídlené biofilmem (inhibice tvorby biofilmu). Baicalein byl nejvíce účinný proti již vytvořenému



Obr. 2. Vliv chitosanu na adhezi buněk (■), tvorbu biofilmu (▨) a eradikaci biofilmu (◻) *T. cutaneum* CCY 30-5-10 (72 h, 30 °C, 150 min<sup>-1</sup>). Binárně zpracované snímky (A: adheze, B: tvorba biofilmu, C: eradikace biofilmu) znázorňují vliv chitosanu na plochu osídlenou biofilmem (tmavé oblasti). Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 16 paralel. Úsečka v pravém dolním rohu obrázků představuje měřítko (200 μm)



Obr. 3. Vliv baicaleinu na adhezi buněk (■), tvorbu biofilmu (▨) a eradikaci biofilmu (◻) *T. cutaneum* CCY 30-5-10 (72 h, 30 °C, 150 min<sup>-1</sup>). Binárně zpracované snímky (A: adheze, B: tvorba biofilmu, C: eradikace biofilmu) znázorňují vliv baicaleinu na plochu osídlenou biofilmem (tmavé oblasti). Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku z 16 paralel. Úsečka v pravém dolním rohu obrázků představuje měřítko (200 μm)

zralému biofilmu a ze všech sledovaných látek nejlépe eradikoval vytvořený biofilm *T. cutaneum*. Značný pokles obsahu plochy osídlené biofilmem byl zaznamenán již od koncentrace baicaleinu 40 mg l<sup>-1</sup> (o 76 %). Inhibice metabolické aktivity buněk biofilmu *C. albicans* na 50 % byla v literatuře zjištěna již při koncentraci baicaleinu 4 mg l<sup>-1</sup>, čtyřnásobná koncentrace (16 mg l<sup>-1</sup>) způsobuje 90% inhibici<sup>8</sup>. Vliv baicaleinu byl v publikované literatuře pozorován již v nižších koncentracích, námi sledovaná nejnižší koncentrace 20 mg l<sup>-1</sup> neměla významný inhibiční efekt ani na adhezi, ani na tvorbu či eradikaci biofilmu.

Ze zjištěných dat vyplývá významný potenciál v rámci kombinace inhibičních vlastností přírodních látek s antibiotiky. V literatuře je zmiňováno synergické působení baicaleinu s amphotericinem B, přičemž MIC (minimální inhibiční koncentrace) samotného baicaleinu pro *C. albicans* je 4 mg l<sup>-1</sup> a MIC amphotericinu B 0,75 mg l<sup>-1</sup> (cit.<sup>15</sup>). V kombinaci se pak jednotlivé MIC snížily na koncentrace 0,5 a 0,0234 mg l<sup>-1</sup>. Baicalein je tak jednoznačně látkou vysoce účinnou proti fungálním patogenům, jeho výhodou je dále i schopnost synergismu s řadou antibiotik, na což bude navazovat náš další výzkum.

## Závěr

*T. cutaneum* je významným fungálním podmíněným patogenem, jehož virulence je spjata s tvorbou biofilmu. Tato studie se zaměřila na vliv tří antimikrobiálních látek (amphotericinu B, chitosanu a baicaleinu) na biofilm *T. cutaneum*. Bylo zjištěno, že z těchto látek byl baicalein nejvíce účinným při ovlivňování adheze i eradikace biofilmu. Také chitosan výrazně snížil tvorbu biofilmu tohoto mikroorganismu. Nejslabší antibiofilmový efekt byl pozorován u amphotericinu B, který měl na biofilm *T. cutaneum* naopak značně stimulační vliv.

Tato práce byla realizována v rámci projektů OPPK CZ.2.16/3.1.00/21537 a CZ.2.16/3.1.00/24503 za podpory projektu NPU I LO1601.

## LITERATURA

- Colombo A. L., Padovan A. C. B., Chaves G. M.: Clin. Microbiol. Rev. 24, 682 (2011).
- Cordeiro R. D. a 12 spoluautorů: J. Med. Microbiol. 64, 1277 (2015).
- Matatkova O., Kolouchova I., Kvasnickova E., Jezdik R., Masak J., Cejkova A.: Chem. Pap. 71, 1471 (2017).

4. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P.: *Science* 284, 1318 (1999).
5. Paldrychová M., Kvasničková E., Mařátková O., Masák J.: *Chem. Listy* 111, 637 (2017).
6. Boháčová M., Pazlarová J.: *Chem. Listy* 112, 215 (2018).
7. Cao Y. Y., Dai B. D., Wang Y., Huang S., Xu Y. G., Cao Y. B., Gao P. H., Zhu Z. Y., Jiang Y. Y.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 32, 73 (2008).
8. Cobrado L., Silva-Dias A., Azevedo M. M., Pina-Vaz C., Rodrigues A. G.: *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 126 (2013).
9. Kvasnickova E., Matatkova O., Cejkova A., Masak J.: *J. Microbiol. Methods* 118, 106 (2015).
10. Salazar-Aranda R., Granados-Guzman G., Perez-Meseguer J., Gonzalez G. M., de Torres N. W.: *Molecules* 20, 17903 (2015).
11. Jang E. J., Cha S. M., Choi S. M., Cha J. D.: *Arch. Oral Biol.* 59, 1233 (2014).
12. Subramanya S. H., Sharan N. K., Baral B. P., Hamal D., Nayak N., Prakash P. Y., Sathian B., Bairy I., Gokhale S.: *BMC Microbiol.* 17, 1 (2017).
13. Silva-Dias A., Palmeira-De-Oliveira A., Miranda I. M., Branco J., Cobrado L., Monteiro-Soares M., Queiroz J. A., Pina-Vaz C., Rodrigues A. G.: *Med. Microbiol. Immunol.* 203, 25 (2014).
14. Zakrzewska A., Boorsma A., Brul S., Hellingwerf K. J., Klis F. M.: *Eukaryot. Cell* 4, 703 (2005).
15. Fu Z. J., Lu H., Zhu Z. Y., Yan L., Jiang Y. Y., Cao Y. Y.: *Biol. Pharm. Bull.* 34, 214 (2011).

**P. Kašparová, E. Vaňková, O. Mařátková, and J. Masák** (*Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **The Effect of Amphotericin B, Chitosan and Baicalein on Biofilm Formation of *Trichosporon cutaneum* CCY 30-5-10**

*Trichosporon cutaneum* is the second most significant opportunistic pathogen of genus *Trichosporon* after *T. asahii*. Its virulence is strongly tied to biofilm formation and colonization of various medical materials. *Trichosporon* spp. infections are ordinarily treated with antifungal azoles or polyene antibiotics. Nowadays, this type of therapy often fails and there is a great effort aimed at finding new antimicrobial substances, often originating from plant sources. These sources are frequently used as the components of traditional medicine.

This study is focused on the effect of antibiotic amphotericin B, polysaccharide chitosan, and flavonoid baicalein on the biofilm formation of *T. cutaneum* CCY 30-5-10. Their effects were studied by inverse microscope Cellavista using the image analysis evaluation of the area colonized by the biofilm in 96well microtitre plates. Baicalein was the most effective substance (concentration 40 mg L<sup>-1</sup> caused 50% inhibition of cell adhesion and 75% eradication of mature biofilm). A significant effect was also observed when chitosan was applied (concentration 40 mg L<sup>-1</sup> caused 69% inhibition of cell adhesion). Polyene antibiotic amphotericin B had distinctly stimulating effect on cell adhesion and only slightly eradicated the mature biofilm of *T. cutaneum* CCY 30-5-10.

**Keywords:** *Trichosporon cutaneum*, trichosporonosis, amphotericin B, baicalein, chitosan, biofilm, Cellavista