

Ocena aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej *in vitro* i *in vivo* produktu Camelyn M

Benedikte Maglakelidze¹, Guguli Abashidze¹, Inga Dadeshidze², Vakxtang Mshvildadze³, Andre Pichete³, Vincent Perreten⁴, Shota Tsanava⁵, Nata Shubladze⁶, Koba Gurielidze^{1*}

- 1*. Firma naukowo-farmaceutyczna „Camelyn”, 0127, Kindzmarauli str. 7, Tbilisi, Gruzja.
2. Instytut Farmakochemii im. G. Kutateladze, 0159, Sarajishvili str. 36, Tbilisi, Gruzja.
3. Laboratoire LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi, 555, Boulevard de l' Université, Chicoutimi, Que., Kanada G7H 2B1.
4. Instytut bakteriologii weterynaryjnej, Uniwersytet w Bernie, Postfach Langgass-Strasse 122, CH-3001 Berno, Szwajcaria.
5. National Center for Disease Control & Medical Statistics (Narodowe Centrum Kontroli Chorób i Statystyki Medycznej, 0177, Asatiani 9, Tbilisi, Gruzja.
6. National Center for Tuberculosis and Lung Diseases (Narodowe Centrum Gruźlicy i Chorób Płuc), 0101, Maruashvili 50, Tbilisi, Gruzja.

* Korespondencję należy kierować na adres: Scientific-Pharmaceutical Company “Camelyn”, 0127, Kindzmarauli str. 7, Tbilisi, Gruzja. E-mail: HUKurielidze@yahoo.comU

Minimalne stężenie hamujące (MIC) aktywnego związku produktu Camelyn M otrzymanego ze specjalnego rodzaju miodu w jednym z regionów Gruzji zostało określone w stosunku do niektórych szczepów bakterii i grzybów, zarówno metodą agarową, jak i metodą rozcieńczeń w bulionie. Przeciwbakteryjne działanie produktu Camelyn M badano następnie w modelach zwierzęcych. Stwierdzono, że produkt Camelyn M wykazuje silne działanie hamujące (0,012–0,150 µg/ml) wobec większości badanych bakterii w badaniach *in vitro*. Badania *in vivo* wykazały, że lek zapewniał znamienne ochronę ($p < 0,001$) myszom narażonym na wirulentną bakterię.

In vitro produkt Camelyn M wykazywał silną aktywność przeciwko opornym na flukonazol szczepom *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* i *Candida krusei*, a wartość MIC dla zahamowania 90% izolatów wyniosła 0,012 µg/ml.

Słowa kluczowe: Camelyn M, miód, przeciwdrobnoustrojowy, Candida, MIC.

Wprowadzenie

Antybiotyki są jedną z naszych najważniejszych broni w walce z zakażeniami bakteryjnymi i grzybiczymi, a od czasu ich wprowadzenia przyczyniły się one w znacznym stopniu do poprawy jakości ludzkiego życia. Jednak w ciągu ostatnich kilku dekad te korzyści zdrowotne są zagrożone, ponieważ liczne powszechnie stosowane antybiotyki stają się coraz mniej skuteczne w leczeniu niektórych chorób, nie tylko dlatego, że wiele z nich powoduje reakcje toksyczne, ale również z powodu pojawienia się lekoopornych bakterii i grzybów (2,3,4,5,6,7,8).

Składniki produktu Camelyn M zostały wyizolowane ze specjalnych gatunków miodu pochodzącego z jednego z regionów Gruzji (1).

Camelyn M to mieszanina różnych związków biologicznie czynnych: aldehydów, ketonów i kwasów bioorganicznych (6). Różne parametry fizykochemiczne związków zawartych w produkcie Camelyn M, takie jak rozpuszczalność, struktura pierwszorzędowa, masa cząsteczkowa i inne właściwości, odgrywają istotną rolę w aktywności biologicznej tego produktu (6). Nasze badania wykazały, że produkt Camelyn M posiada silne działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze w stosunku do wielu różnych gatunków bakterii i grzybów. Camelyn M działa jak detergent na błony komórkowe bakterii i grzybów oraz wybiórczo hamuje mechanizmy życiowe komórek bakteryjnych i grzybiczych.

W niniejszej pracy szczegółowo przedstawiono działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze produktu Camelyn M *in vitro* i *in vivo*.

Material i metodyka

Pożywki

Pożywki płynne wykorzystane w tym badaniu to: woda peptonowa [PW; Oxoid brand bacteriological peptone 1% [w/v] plus Analar NaCl 0,5% [w/v]], bulion odżywczy (NB; Oxoid), bulion Mueller Hinton (MHB; Difco). Pożywki stałe to agar peptonowy (PA), agar bulionowy z laktozą i błękitem chińskim (BLA), agar odżywczy (NA) i agar Mueller Hinton (MHA), uzyskiwany przez zestalenie pożywki płynnej za pomocą agaru 1,2% (w/v) (Oxoid nr 3).

Preparaty przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Camelyn M to produkt miodopochodny, którego składniki zostały wyizolowane z miodu do badań *in vitro* i *in vivo* według opisanej wcześniej metody (1). Na potrzeby badań *in vitro* ekstrahowano flukonazol (FLC) i itrakonazol (ITC) z preparatów komercyjnych zakupionych od spółki PSP Pharmaceuticals, Inc. (Tbilisi, Gruzja).

Organizmy:

Bakterie i grzyby: Wszystkie szczepy bakterii i grzybów uzyskano z amerykańskiego centrum zasobów biologicznych – American Type Culture Collection. Pożywki

Pożywki płynne wykorzystane w tym badaniu to: woda peptonowa [PW; Oxoid brand bacteriological peptone 1% [w/v] plus Analar NaCl 0,5% [w/v]], bulion odżywczy (NB; Oxoid), bulion Mueller Hinton (MHB; Difco). Pożywki stałe to agar peptonowy (PA), agar bulionowy z laktozą i błękitem chińskim (BLA), agar odżywczy (NA) i agar Mueller Hinton (MHA), uzyskiwany przez zestalenie pożywki płynnej za pomocą agaru 1,2% (w/v) (Oxoid nr 3). W przypadku BLA.

Badania in vitro Wartość MIC dla badanych organizmów oznaczono metodą mikrorozcieńczenia bulionu opisaną w dokumencie M27-A2 NCCLS (3,4,5). Wartość MIC dla produktu Camelyn M zdefiniowano jako najniższe stężenie, które powodowało niewielki wzrost (zahamowanie rzędu około 90%) lub brak wzrostu po 48 h.

Badania in vivo

Do badań *in vivo* użyto samców szwajcarskiego szczepu białych myszy o masie ciała 18–20 g. Zjadliwość badanego szczepu *S. typhimurium* NCTC 74 spotęgowano przez wielokrotne pasażowanie na myszach, a mediana dawki letalnej (MLD lub LD50) przepasażowanego szczepu odpowiadająca $0,95 \times 10^9$ CFU/mysz (bakterie zawieszone w 0,5 ml NB) posłużyła jako dawka prowokacyjna¹⁷ dla wszystkich grup zwierząt. W celu zapewnienia powtarzalności dawki prowokacyjnej dokonano standaryzacji jej gęstości optycznej w kolorymetrze Klett-Summerson przy długości fali 640 nm oraz określono liczbę CFU w NA.

W celu ustalenia toksyczności produktu Camelyn M użyto 40 myszy, z których 20 wstrzyknięto 60 g leku, a pozostałe 20 otrzymały 30 g produktu Camelyn M. Myszy pozostawały w obserwacji do 100 godzin. Dwie grupy myszy, po 20 zwierząt na grupę (każda mysz ważyła około 20 g) trzymano w oddzielnych klatkach. W grupie I podawano dootrzewnowo 30 g produktu Camelyn M na mysz (0,1 ml roztworu Camelyn M o stężeniu 300 g/ml), a grupie II podawano 60 g leku na mysz (0,1 ml roztworu Camelyn M o stężeniu 600 g/ml). Po 3 godzinach każdej grupie (I i II) podano 50 MLD pałeczek *S. typhimurium* NCTC 74. Grupie kontrolnej obejmującej 60 myszy wstrzyknięto ten sam szczep bakteryjny, a zamiast produktu Camelyn M wstrzykiwano w tej grupie po 0,1 ml jałowej soli fizjologicznej.

Zdolność ochronną leku ustalono rejestrując umieralność myszy w różnych grupach do 100 godzin po podaniu leku i bakterii. W analizie statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano test χ^2 . W innym eksperymencie wykorzystano 4 grupy myszy, po 5 zwierząt na grupę. Mysiom z grup 1 i 3 podano po 60 g produktu Camelyn M, natomiast mysiom z grup 2 i 4 podano po 0,1 ml jałowej soli fizjologicznej.

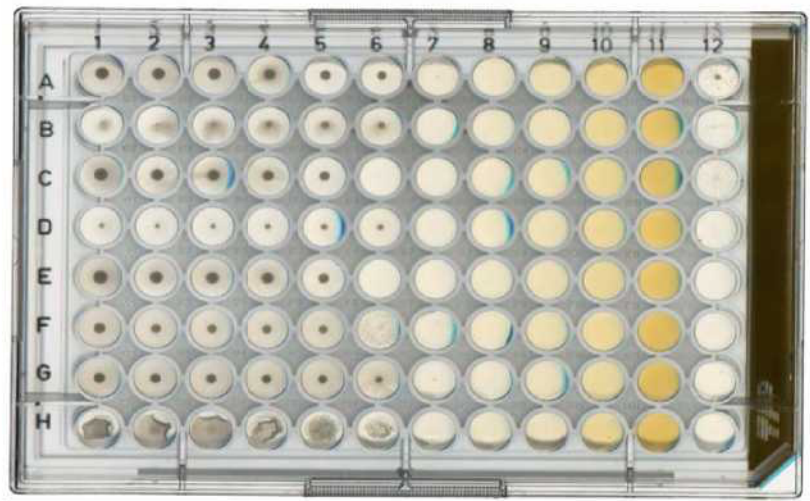
Po 3 godzinach mysiom z wszystkich grup podano po 50 MLD pałeczek *S. typhimurium* NCTC 74. Po [kolejnych] 2 godzinach zabito myszy z grup 1 i 2. Od zabitych myszy pobierano aseptycznie krew z serca; również aseptycznie pobierano od tych myszy wątroby i śledziony, które homogenizowano w homogenizatorach tkankowych. Osobno oznaczono wartości CFU poszczególnych narządów. Te same procedury przeprowadzono w grupach 3 i 4, 18 godzin po podaniu bakterii. Analizę statystyczną danych uzyskanych *in vivo* przeprowadzono przy użyciu testu *t* Studenta.

Stężenie produktu Camelyn M we krwi myszy oceniano poprzez pomiar średnicy stref zahamowania za pomocą nasączonych surowicą krążków papieru filtracyjnego (średnica 6 mm, grubość 3 mm, Millipore, absorbujące objętość 0,03 ml) na powierzchni zalanej bakteriami z 18-godzinnej hodowli *S. typhimurium* 74 w bulionie na agarze peptonowym. Stężenia leku w surowicy ustalano przez odniesienie tych wartości do standardowej krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla znanych stężeń leku.

Wyniki:

Stwierdzono, że wszystkie badane szczepy bakterii są odporne na wiele antybiotyków. Natomiast produkt Camelyn M wykazywał silne działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko wszystkim bakteriom. Produkt Camelyn M w zakresie stężeń 0,156-3,0 µg/ml hamował wszystkie szczepy bakterii:

Ryc. 1. Wartości MIC produktu Camelyn M dla konkretnych bakterii antybiotykoopornych ustalone metodą rozcieńczeń bulionu przy użyciu bulionu Mueller Hinton.



Pionowo – szczepy bakterii:

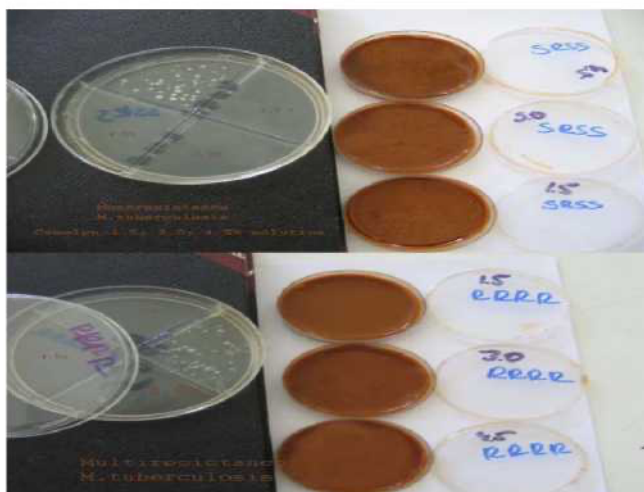
- A)** - *E. faecium* SF11770
- B)** - *B. anthracis* Chad18
- C)** - *S. aureus* BM3318
- D)** - *B. anthracis* JFS854
- E)** - *S. typhimurium* NCTC 74
- F)** - *S. sciuri* CSLA3
- G)** - *S. haemolyticus* VPS617
- H)** - *B. cereus* AND934

Poziomo – wartości MIC produktu Camelyn M

- 1)** - 0.002 **9)** - 0.62
- 2)** - 0.004 **10)** - 1.25
- 3)** - 0.009 **11)** - 2.50
- 4)** - 0.019
- 5)** - 0.039
- 6)** - 0.078
- 7)** - 0.156
- 8)** - 0.310



Ryc. 2. Wartości MIC produktu Camelyn M dla *Bacillus anthracis* opornego na konkretne antybiotyki – A – po 4-godzinnej inokulacji i B – po 4-godzinnej inokulacji



Ryc. 3. Wartości MIC produktu Camelyn M w odniesieniu do poszczególnych szczepów *M. tuberculosis* – opornych na jeden lek i wieloopornych.

Aktywność przeciwgrzybicza *in vitro*.

Tabela 1 przedstawia spektrum działań produktu Camelyn M i innych produktów referencyjnych w odniesieniu do różnych szczepów grzybów. Produkt Camelyn M wykazywał silne działania przeciwko *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* i *C. neoformans*, z wartościami MIC w zakresie od 0,012 µg/ml dla wszystkich wyżej wymienionych przypadków. W Tabeli 2 przedstawiono wartości MIC produktu Camelyn M i innych środków referencyjnych dla klinicznego izolatu drożdży *C. albicans*. Tabela 2 przedstawia wyniki dla *C. albicans*, oddzielnie dla szczepów wrażliwych na FLC (FLC-S) (MIC FLC ≤8 µg/ml) i wrażliwych na FLC w zależności od dawki (FLC-S-DD) oraz szczepów opornych na FLC (FLC-R) (MIC FLC ≥16 µg/ml), zgodnie z wytycznymi dokumentu M27-A2 NCCLS (14). Produkt Camelyn M wykazywał silne działanie przeciwko *C. albicans* (FLC-S), przy czym wartość MIC, przy której uzyskiwano zahamowanie 90% izolatu (MIC_{90s}), wyniosła 0,012 µg/ml. Produkt Camelyn M wykazywał również silne działanie przeciwko szczepom *C. albicans* FLC-S-DD i FLC-R (zakres MIC, 0,012 µg/ml).

TABELA 1. Spektrum przeciwgrzybicze produktu Camelyn M

Organizm i szczep	MIC (µg/ml)			
	Camelyn M	FLC	ITC	AMB
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	0.012	0.25	0.016	0.12
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0.012	4.00	0.12	0.12
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	0.012	2.00	0.06	0.25
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	0.012	2.00	0.03	0.5
<i>Candida krusei</i> TIMM3378	0.012	32.00	0.06	0.25
<i>Candida guilliermondii</i> ATCC 9390	0.012	2.00	0.03	0.06

TABELA 2. Działanie przeciwgrzybicze produktu Camelyn M *in vitro* przeciwko klinicznemu izolatowi *Candida albicans*.

Organizm (izolaty kliniczne) i środek	MIC (µg/ml)	
	50%	90%
<i>Candida albicans</i>		
“Camelyn M”	0.012	0.012
FLC	0.25-8	1.00
ITC	0.016	0.03
AMB	0.12	0.12

Produkt Camelyn M należy do naturalnych środków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych o złożonym mechanizmie działania. Bardzo interesujący jest fakt, że produkt Camelyn M zawiera bardzo aktywne biologicznie związki fenolowe. Związki te, które występują w liściach i kłęczach wielu roślin, zapewniają odporność tych roślin na różne czynniki patogenne. Naturalne związki fenolowe charakteryzują się silnymi właściwościami detergcyjnymi, a w przypadku występowania w małych organizmach powodują destrukcję błony komórkowej. Na podstawie powyższych danych można założyć, że aktywność biologiczna produktu Camelyn obejmuje powyższe mechanizmy, co jest przedmiotem badań pogłębiających.

Jak wynika z Tabel 1 i 2, produkt Camelyn M wykazuje silną aktywność *in vitro* w odniesieniu do wszystkich badanych szczepów w tym samym stężeniu – MIC (µg/ml)= 0,012. Jest to stężenie niższe od stężeń wszystkich badanych przez nas antybiotyków.

Podsumowując, wyniki obecnego badania sugerują, że Camelyn M to obiecujący produkt, w szczególności w leczeniu zakażeń rozsiażanych lub bakteryjnych oraz zakażeń błon śluzowych wywoływanych przez *C. albicans*, w tym szczepy odporne na FLC.

Piśmiennictwo:

- [1] B. Maglakelidze. "Antitumoral properties of "Camelyn" and mechanism of activity" Monograf. Tbilisi, 2004 (in Georgian)
- [2] Berdy, J., 1967. Recent developments of Antibiotic Research and Classification of Antibiotics According to Chemical Structure, *Advances in Applied Microbiology*, 309.
- [3] Bergey's manual of determinative bacteriology, 2000. Actinomycetales. 9th edition.
- [4] Hugo, W.B., Russel, A. D., 1983. *Pharmaceutical Microbiology*, 3rd edition, Blackwell Scientific publications.
- [5] Barchiesi, F., A. M. Tortorano, L. F. Di Francesco, M. Cogliati, G. Scalise, and M. A. Viviani. 1999. In-vitro activity of five antifungal agents against uncommon clinical isolates of *Candida* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 43:295-299.
- [6] Kamai, Y., M. Kubota, T. Fukuoka, Y. Kamai, N. Maeda, T. Hosokawa, T. Shibayama, K. Uchida, H. Yamaguchi, and S. Kuwahara. 2003. Efficacy of CS-758, a novel triazole, against experimental fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:601-606
- [7] Herberos, E., M. J. Almela, S. Lozano, F. Gomez de las Heras, and D. Gargallo-Viola. 2001. Antifungal activities and cytotoxicity studies of six new azasordarins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3132-3139.
- [8] Herberos, E., C. M. Martinez, M. J. Almela, M. S. Marriott, F. Gomez de las Heras, and D. Gargallo-Viola. 1998. Sordarins: in vitro activities of new antifungal derivatives against pathogenic yeasts, *Pneumocystis carinii*, and filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2863-2869.