



Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

Mgr farm. Jakub Król

**Aktywność wybranych leków niebędących lekami przeciwgrzybiczymi
wobec grzybów z rodzaju *Candida***

Rozprawa doktorska.

Streszczenie

Promotor rozprawy

dr hab. n. med. Marzenna Bartoszewicz, prof. nadzw.

Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii WUM.

Promotor pomocniczy

dr n. med. Urszula Nawrot

Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii WUM.

Wrocław 2019

STRESZCZENIE

Drożdżaki z rodzaju *Candida* są częstym czynnikiem etiologicznym grzybic powierzchownych i głębokich, odpowiadają za około 15% przypadków sepsy szpitalnej. Wśród dostępnych w leczeniu leków przeciwgrzybiczych najczęściej stosowane są związki z grupy triazoli (zarówno starszej, jak i nowszej generacji). W cięższych przypadkach sięga się po polieny (amfoterycyna B) oraz echinokandyny (anidulafungina, kaspofungina, mikafungina). Rzadziej stosowana jest również flucytozyna, najczęściej w politerapii. Poza tymi grupami leków właściwie nie ma środków skutecznych przeciwko grzybicom układowym. Ograniczony arsenał dostępnych leków, a także ich wady (rozwijająca się oporność na azole i flucytozynę, wysoka cena echinokandyn oraz toksyczność amfoterycyny) zachęcają naukowców do poszukiwania nowych terapii. Ciekawą alternatywą wydaje się być zbadanie już zarejestrowanych środków leczniczych pod kątem ich aktywności przeciwgrzybiczej.

Celem przedstawionej pracy doktorskiej było określenie wpływu wybranych przedstawicieli z grupy leków przeciwbólowych oraz leków przeciwnowotworowych na grzyby z rodzaju *Candida*, włączając kolekcję szczepów *C. albicans* o genotypach A, B, C (klasyfikacja pod kątem obecności intronu w 25S rDNA). Zbadane zostały również interakcje testowanych środków z tradycyjnymi lekami przeciwgrzybiczymi. W przypadku najaktywniejszego związku zbadano jego zdolność do eradykacji dojrzałego biofilmu. Analizie został poddany również wpływ obecności intronu 25S rDNA *C. albicans* na podatność patogenu na leki przeciwnowotworowe.

W badaniach użyto łącznie 78 szczepów różnych gatunków *Candida*. Ocena lekowrażliwości została przeprowadzona metodą mikrorozcieńczeniową, zgodnie z protokołem European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Aktywność leków wobec biofilmów *Candida* badano metodą z wykorzystaniem barwienia fioletem krystalicznym, w której poziom absorbancji, mierzony spektrometrycznie, jest proporcjonalny do gęstości biofilmu oraz metodą testu metabolicznego z resazuryną. Przeprowadzono także testy cytotoksyczności 5- fluorouracylu i flucytozyny oraz ich połączeń z kwasem folinowym na liniach komórkowych mysich fibroblastów (L-929) według protokołu ISO 10993-5. Do oceny statystycznej otrzymanych wyników posłużono się programem Statistica 13 firmy StatSoft.

W testowanym zakresie stężeń pięciu leków przeciwbólowych tylko ibuprofen wykazał mierzalną aktywność przeciwgrzybiczą przeciwko osiemnastu badanym szczepom *Candida spp.* (mediana 5 mmol). Poza własną aktywnością wykazywał synergizm z tradycyjnymi lekami przeciwgrzybiczymi z grupy triazoli. Synergistyczne działanie ibuprofenu było obserwowane

z każdym z użytych w doświadczeniu leków przeciwgrzybiczych (flukonazolu, worikonazolu, itrakonazolu, posakonazolu oraz izawukonazolu). Zaobserwowano również reakcje antagonistyczne, w tym ibuprofenu z flukonazolem oraz metamizolu z flukonazolem.

W ocenie lekowrażliwości środków przeciwnowotworowych największą aktywność wykazywały bleomycyna oraz 5-fluorouracyl z MIC na poziomie odpowiednio 15,51 oraz 43,36 mg/L. 5-fluorouracyl był bardziej aktywny w stosunku do szczepów zawierających intron ($p < 0,05$). Aktywność pozostałych testowanych leków, w tym użytej jako kontroli flucytozyny, nie zależała statystycznie od obecności intronu w genomie *C. albicans*. Dodatek kwasu folinowego do 5-fluorouracylu ponad dwukrotnie zwiększył jego średnią aktywność, przy czym dla grupy szczepów bezintronowych wzrost aktywności był niemal czterokrotny.

5-fluorouracyl okazał się bardzo aktywny w stosunku do izolatów *C. glabrata* (mediana MIC= 0,25 mg/L). Również w przypadku tych szczepów kwas folinowy wzmacniał działanie 5-fluorouracylu, sam nie wykazując żadnego wpływu na wzrost grzybów. W testach z flucytozyną folinian znosił oporność testowanych izolatów klinicznych z obniżoną wrażliwością na lek z gatunków *C. tropicalis*, *C. fabianii* oraz *C. glabrata*. Testowane połączenie okazało się być skuteczne w eradykacji dojrzałego biofilmu, utworzonego przez różne gatunki *Candida*. 5-fluorouracyl, jak i flucytozyna, użyte w wyższych dawkach (64 mg/L) w obecności kwasu folinowego mogą wykazać działanie grzybobójcze. Co więcej, pomimo znacznego podniesienia skuteczności przeciwgrzybiczej flucytozyny, kwas folinowy nie zwiększył jej toksyczności w stosunku do komórek ssaków. Zastosowanie tego skojarzenia mogłoby więc okazać się korzystne w niektórych sytuacjach klinicznych, np. grzybicach wywołanych patogenami wielolekoopornymi.

Przedstawione wyniki pracy stanowią dobrą podstawę do dalszych badań zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, oraz mają potencjał na ich praktyczne wykorzystanie w terapii grzybiczej. Szczególnie wzbogacenie terapii flucytozyny o kwas folinowy, który znaczący zwiększa siłę leku bez podnoszenia toksyczności, może być atrakcyjne z klinicznego punktu widzenia.

SUMMARY

Yeast of genus *Candida* are a frequent etiological factor of superficial and deep seated mycoses, accounting for approximately 15% of cases of hospital sepsis. Among the drugs available for treatment, the most commonly used drugs are compounds from the group of triazoles (including both new and earlier generations of drugs). To treat more serious cases, polyenes are introduced (amphotericin B) and echinocandins (anidulafungin caspofungin and micafungin). Flucytosine is also used, but very rarely and only in polytherapy. Apart from these groups of drugs, there are actually no effective medicines for systemic fungal infections. The limited range of available drugs, as well as their disadvantages (the evolving resistance to azoles and flucytosine, a high price of echinocandins and the toxicity of amphotericin) encourage scientists to search for new therapies. An interesting option seems to be the examination of already registered medications in terms of their antifungal activity.

The aim of this doctoral thesis was to determine the influence of selected representatives from a group of analgesic drugs and anticancer drugs on the fungi of the *Candida* species, including the selection of *C. albicans* strains with A, B and C genotypes (based on the presence of an intron in 25S rDNA). The interactions between the tested agents and traditional antifungal medications were also examined. For the most active compound, its ability to eradicate a mature biofilm was examined. In addition, the influence of the presence of an intron in *C. albicans* 25S rDNA on the pathogen susceptibility to anticancer drugs was also analyzed.

In total, 78 strains of different *Candida* species were used in the research. The susceptibility testing was conducted with the use of the microdilution method in accordance with the guidance documents by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The activity of tested agents against *Candida* biofilms was examined with the method using the crystal violet dye, in which the spectral absorbance level is proportionate to the biofilm density and with the resazurin metabolism test. Furthermore, the cytotoxicity tests of 5-fluorouracil and flucytosine, as well as their combinations with folic acid on mouse fibroblast cell lines (L-929) in accordance with the ISO 10993-5 protocol were also conducted. To statistically assess of the obtained results the Statistica 13 program by the StatSoft company was used.

Within the tested concentration range of five analgesic drugs, only ibuprofen showed measurable antifungal activity against eighteen tested *Candida spp.* strains (median 5 mmol). Apart from its own activity it showed synergy with a traditional antifungal drugs from the triazoles group. The synergistic action of ibuprofen was observed with all of the antifungal

drugs used in the experiment (fluconazole, voriconazole, itraconazole, posaconazole and isavuconazole). Antagonistic reactions were also observed, including ibuprofen with fluconazole and metamizole with fluconazole.

In the susceptibility testing of anticancer drugs, the highest activity was shown by bleomycin and 5-fluorouracil with MIC amounting respectively to 15.51 and 43.36 mg/L. 5-fluorouracil was more active against intron harboring strains ($p < 0.05$). The activity of other tested drugs, including flucytosine that was used for control, did not statistically depend on the presence of intron in the *C. albicans* genome. The addition of folinic acid to 5-fluorouracil, increased its average activity over twice, whereas for the group of intronless strains the activity increased almost four times.

5-fluorouracil showed to be remarkably active against *C. glabrata* isolates (MIC median = 0.25 mg/L). Also for these strains, folinic acid enhanced the activity of 5-fluorouracil, and at the same time it did not influence in any noticeable way the growth of fungi. In tests with flucytosine, folinate reversed the resistance in tested clinical isolates with lowered sensitivity to the drug from *C. tropicalis*, *C. fabianii* and *C. glabrata* species. The described combination proved to be effective in eradication of mature biofilms formed by different *Candida* species. 5-fluorouracil and flucytosine used in higher dosages (64 mg/L) and in the presence of folinic acid, may show fungicidal activity. Furthermore, despite considerably increasing the antifungal efficiency of flucytosine, folinic acid has not increased its toxicity to mammalian cells. Therefore, the usage of this combination, might prove to be beneficial in some clinical situations, for instance in fungal infections caused by multidrug-resistant pathogens.

The presented results of the thesis represent a good basis for further research both *in vitro* and *in vivo* and their potential may be harnessed in practice for antifungal therapy. Especially, enriching the flucytosine therapy with folinic acid, which considerably increases the drug's activity without increasing its toxicity, may be attractive from the clinical perspective.