

Wpływ pola elektromagnetycznego na przeżywalność, wrażliwość na antybiotyki, i przepuszczalność błony *Candida Albicans*

Streszczenie. *Candida albicans* jest patogenem oportunistycznym wywołującym grzybicę powierzchni (skóry, błon śluzowych) i narządów wewnętrznych. Grzyb ten m.in. przylega do nabłonka i powierzchni abiotycznych (zastawki, protezy) i tworzy trudno gojące się biofilmy. Obecnie lekarze borykają się z ogromnym problemem narastania odporności na szeroko stosowane związki przeciwgrzybicze. Chociaż grzyby z rodzaju *Candida* są wiodącym czynnikiem etiologicznym zakażeń oportunistycznych, liczba dostępnych i skutecznych leków przeciwgrzybiczych jest ograniczona. Poszukiwanie nowych antybiotyków i sposobów zwalczania *C. albicans* ma obecnie ogromne znaczenie. Nasze wcześniejsze badania wykazały pozytywny wpływ statycznego pola magnetycznego na komórki *C. albicans*. Komórki hodowane w polu magnetycznym wykazywały zmniejszoną intensywność wzrostu i zwiększoną wrażliwość na stosowane antybiotyki – flukonazol i amfoterycynę B. W związku z tym postanowiono kontynuować badania z wykorzystaniem pola magnetycznego 50 Hz.

Abstract. *Candida albicans* is an opportunistic pathogen that causes mycoses of the surface (skin, mucosa) and internal organs. This fungus, among others, adheres to the epithelium and abiotic surfaces (valves, prostheses) and creates difficult-to-heal biofilms. Currently, doctors struggle with the great problem of growing resistance to the widely used antifungal compounds. Although fungi of the genus *Candida* are the leading etiological agent of opportunistic infections, the number of available and effective antifungal drugs is limited. The search for new antibiotics and ways to combat *C. albicans* is now of great importance. Our earlier research showed a positive effect of a static magnetic field on *C. albicans* cells. Cells grown in a DC magnetic field showed reduced growth intensity and increased sensitivity to the antibiotics used - fluconazole and amphotericin B. Therefore, it was decided to continue the research using an 50 Hz magnetic field. (Effect of the electromagnetic field on survivability, sensitivity to antibiotics and permeability of the *Candida Albicans* membrane)

Słowa kluczowe: *Candida albicans*, pole elektromagnetyczne, flukonazol, amfoterycyna B

Keywords: *Candida albicans*, electromagnetic field, fluconazole, amphotericin B

Wstęp

Candida albicans to mikroorganizm wchodzący w skład mikroflory człowieka, który w warunkach immunosupresji powoduje infekcje oportunistyczne zwane kandydozami [1]. Obecnie zakażenia *C. albicans* charakteryzują się wzrostem oporności na tradycyjne środki przeciwgrzybicze, takie jak flukonazol (FLC) czy amfoterycyna B (AMB) [2]. Aktualne dane wskazują, że 7% wszystkich kandydoz ogólnoustrojowych charakteryzuje się zmniejszoną wrażliwością na działanie leków azolowych [3]. Rosnąca oporność *C. albicans* wiąże się z koniecznością rozwoju nowych strategii leczenia. Jedną z nich może być wykorzystanie pola elektromagnetycznego. Żywe organizmy są stale pod wpływem pola magnetycznego Ziemi (GMF), które wpływa na m. in. cykl życiowy komórek, replikację DNA czy aktywność enzymów [4]. Interesujące jest zatem wykorzystanie w badaniach procesów biologicznych statycznego (SMF) i przemienneho pola magnetycznego [5]. W wielu badaniach udowodniono wpływ zarówno statycznego, jak i przemienneho pola magnetycznego na hamowanie wzrostu bakterii i grzybów, a także spowalnianie ich namnażania [6]. Na przykład wykazano, że jednodniowe zastosowanie SMF (60 mT) zmniejszyło liczbę drobnoustrojów płytki nazębnej *in vitro* [7], a sześciogodzinna ekspozycja na MF spowodowała spadek liczby jednostek tworzących kolonie (CFU) w porównaniu z kontrolami dla *Staphylococcus aureus* (95,2%) i *Escherichia coli* (85%) [8].

W naszych wcześniejszych badaniach wykazano pozytywny wpływ SMF na *C. albicans*. Komórki hodowane w polu magnetycznym wykazywały zmniejszoną intensywność wzrostu i zwiększoną wrażliwość na stosowane antybiotyki – FLC i AMB [9]. Ponieważ istnieją ograniczone dane dotyczące wpływu przemienneho pola magnetycznego na mikroorganizmy, zwłaszcza patogenne

drożdżopodobne grzyby, celem niniejszego badania było sprawdzenie, czy przemienne pole magnetyczne ma wpływ na ogólną przeżywalność i przepuszczalność błon *C. albicans* oraz wpływa na podatność *C. albicans* na FLC i AMB.

Materiały i metody

Chemikalia, szczepy i warunki wzrostu

Odczynniki użyte w tym badaniu zakupiono z następujących źródeł: flukonazol i amfoterycyna B (Sigma-Aldrich; Poznań, Polska); D-glukoza oraz agar bakteriologiczny (Lab Empire; Rzeszów, Polska); ekstrakt peptonowy i drożdżowy (YE) (Diag-med; Warszawa, Polska); oraz płodowa surowica bydlęca (FBS) (Thermo Fisher; Warszawa, Polska).

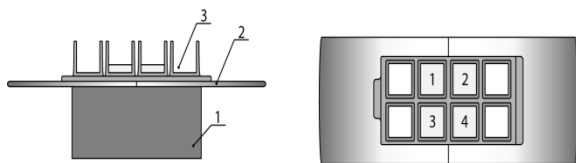
W badaniach wykorzystano dwa szczepy *Candida albicans* różniące się hydrofobowością: szczep hydrofilowy CAF2-1 (ura3Δ::imm434/URA3) oraz szczep hydrofobowy CAF4-2 (ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434). Oba szczepy były rutynowo hodowane w 28 °C na podłożu YPD (2% glukoza, 1% pepton, 1% YE) przy wstrząsaniu 120 obr./min. Agar w stężeniu końcowym 2% został użyty do zestalenia podłoża.

Ekspozycja materiału biologicznego na pole magnetyczne 50 Hz

Schematyczne przedstawienie stanowiska badawczego podano na rysunku 1. Aby utrzymać identyczne warunki wzrostu i jednakową ekspozycję na działanie pola magnetycznego 50 Hz o indukcji 35 mT, wykorzystywano 4 z 8 dołków komory hodowlanej LAB-TEK (ThermoScientific, USA). Eksperymenty kontrolne przeprowadzono w komorach hodowlanych nie wystawionych na działanie przemienneho pola magnetycznego 50 Hz.

Wpływ pola magnetycznego 50 Hz na przeżywalność *C. albicans*

24-godzinne prehodowle *C. albicans* (podłoże YPD; 120 rpm; 28 °C) odwirowywano (5 min, 4,5 tys. obr./min), przemywano świeżym YPD i ponownie zawieszano w podłożu YPD do uzyskania startowej gęstości optycznej $OD_{600}=0,1$.



Rys. 1. Ekspozycja materiału biologicznego w przemiennym polu magnetycznym 50 Hz. 1 - elektromagnes, 2 - podstawa, 3 - komory hodowlane; (b) rzut z góry

Przygotowaną hodowlę umieszczono w 8-dołkowej płytce LAB-TEK, tak jak opisano w „Ekspozycja materiału biologicznego na pole elektromagnetyczne”, w czterech dołkach w objętości 300 μ l na jeden dołek. Następnie, płytki inkubowano w warunkach przemiennego pola magnetycznego 50 Hz o indukcji 35 mT przez 24 godziny. Hodowle kontrolne umieszczano na osobnej płytce LAB-TEK w sposób identyczny do próby badanej i inkubowano 24 godziny w warunkach pozbawionych działania pola magnetycznego 50 Hz. Po inkubacji, materiał przenoszono do 96-dołkowej płytki i mierzono gęstość optyczną (A_{600}) (10-krotne rozcieńczenie) za pomocą czytnika mikroplitek ASYS UVM 340 (Biogenet).

Wpływ pola magnetycznego 50 Hz na podatność *C. albicans* na leki

24-godzinne prehodowle *C. albicans* (podłoże YPD; 120 obr./min; 28 °C) odwirowywano (5 min, 4,5 tys. obr./min), przemywano świeżym YPD i ponownie zawieszano w podłożu YPD do gęstości optycznej $A_{600}=0,1$. Komory hodowlane z dołkami zaszczepiono jak opisano w „Ekspozycja materiału biologicznego na pole elektromagnetyczne” do końcowej objętości 300 μ l. Do każdego dołka dodawano antybiotyki: flukonazol (stężenie końcowe 2 μ g/ml) lub amfoterycynę B (stężenie końcowe 0,063 μ g/ml). Tak przygotowane hodowle inkubowano przez 24 godziny w obecności przemiennego pola magnetycznego 50 Hz lub bez w 32 °C. Wybrano takie stężenia antybiotyków, które obniżają gęstość optyczną (A_{600}), ale nie zabijają komórek. Następnie materiał przenoszono do 96-dołkowej płytki i mierzono gęstość optyczną (A_{600}) (10-krotne rozcieńczenie) za pomocą czytnika mikroplitek ASYS UVM 340 (Biogenet), metoda ta jest opisana [10].

Wpływ pola magnetycznego 50 Hz na permeabilizację błony komórkowej *C. albicans*

Po 24 godzinach ekspozycji na pole elektromagnetyczne pobierano po 70 μ l hodowli z dołków LAB-TEK, odwirowano (8200 rpm; 5 min) i zawieszano w 1 ml podłoża YPD. Dodawano 2 μ l jodku propidyny (końcowe stężenie 6 μ M) celem wybarwienia uzyskanych komórek i całość inkubowano w 25 °C przez 5 min. Następnie, komórki dwukrotnie przemywano jałowym roztworem 0,9% NaCl (8200 RPM; 5 min). Przygotowano preparaty mikroskopowe, które obserwowano z użyciem mikroskopu Axio Imager A2 z kamerą Axiocam 503 i lampą rtęciową HBO100. Procent permeabilizacji określano licząc komórki wybarwione jodkiem propidyny w stosunku do całej populacji zaobserwowanych komórek.

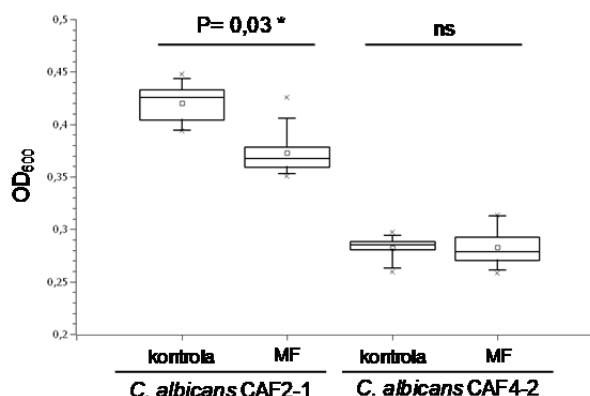
Analiza statystyczna

Każdy eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Istotność statystyczną określono za pomocą testu t-Studenta.

Wyniki.

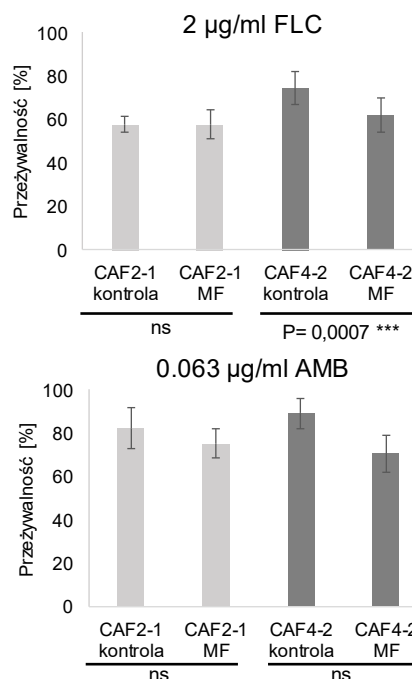
Pole magnetyczne 50 Hz hamuje wzrost *C. albicans*

Przeanalizowano wzrost szczepów *C. albicans* różniących się hydrofobowością przy braku i w obecności pola elektromagnetycznego. Szczepy inkubowane pod wpływem pola charakteryzowały się spowolnionym wzrostem. Zaobserwowany spadek wzrostu był większy dla szczepu hydrofilowego (*C. albicans* CAF2-1) w porównaniu do szczepu hydrofobowego (*C. albicans* CAF4-2), co zostało przedstawione na rysunku 2. Istotną statystycznie różnicę zauważono we wzroście szczepu hydrofilowego w zależności od obecności pola magnetycznego 50 Hz.



Rys. 2. Wpływ pola magnetycznego 50 Hz na wzrost szczepów *C. albicans*

Pole magnetyczne 50 Hz zwiększa wrażliwość *C. albicans* na flukonazol i amfoterycynę B

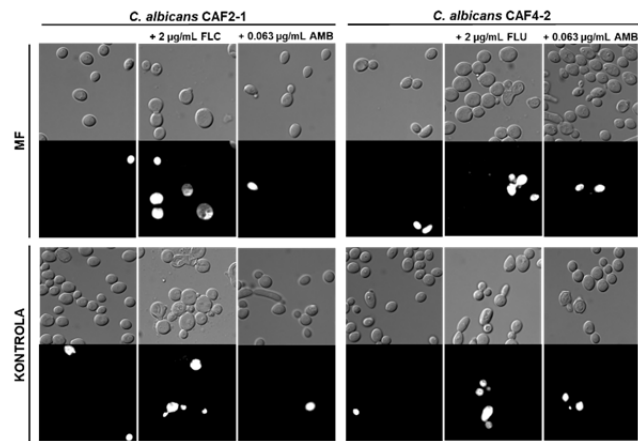


Rys. 3. Wpływ jednoczesnego działania pola magnetycznego 50 Hz oraz antybiotyków na wzrost szczepów *C. albicans*

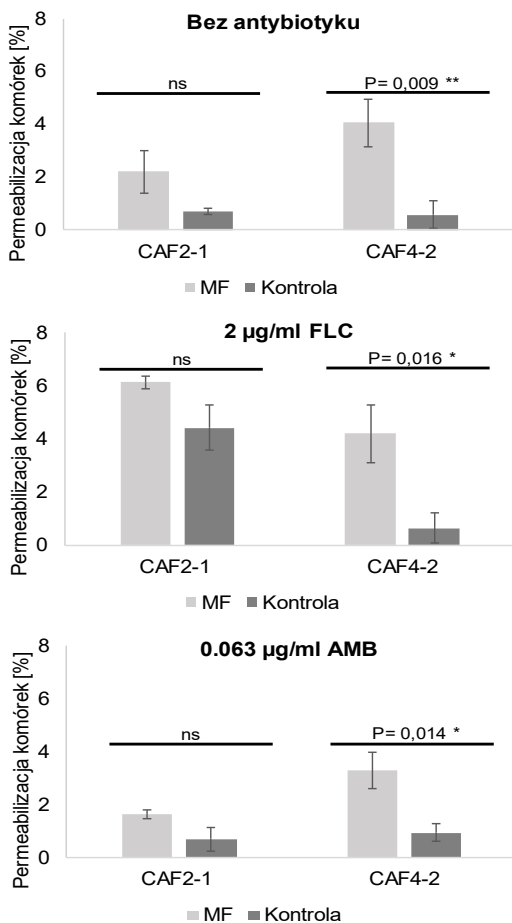
Oba badane szczepy *C. albicans* wykazywały większą wrażliwość na FLC w polu magnetycznym 50 Hz w porównaniu do warunków kontrolnych, przy czym szczep

hydrofobowy (*C. albicans* CAF4-2) był bardziej wrażliwy niż szczep hydrofilowy (*C. albicans* CAF2-1). Zastosowane w badaniach szczepy były również bardziej wrażliwe na AMB przy działaniu pola magnetycznego 50 Hz. Szczep hydrofobowy, podobnie jak w przypadku traktowania FLC okazał się bardziej wrażliwy niż szczep hydrofilowy. Wyniki eksperymentu przedstawiono na rysunku 3.

Pole magnetyczne 50 Hz powoduje zwiększoną permeabilizację błony komórkowej *C. albicans*



Rys. 4. Zdjęcia mikroskopowe spermeabilizowanych komórek *C. albicans* poddanych działaniu pola magnetycznego 50 Hz i antybiotyków



Rys. 5. Wpływ jednoczesnego działania pola magnetycznego 50 Hz i antybiotyków na permeabilizację błony komórkowej szczepów *C. albicans*

W przypadku działania pola magnetycznego 50 Hz zaobserwowano nieznaczny wzrost permeabilizacji komórek w porównaniu do warunków kontrolnych w przypadku obu szczepów *C. albicans* (rys. 4 i 5). Zauważono, że działanie FLC dodatkowo zwiększa ilość spermeabilizowanych komórek, efektu tego nie zaobserwowano dla działania AMB. Dla szczepu hydrofilowego nie wykazano istotnych statystycznie różnic dla żadnego z trzech wariantów doświadczenia. Z kolei wyniki dla szczepu hydrofobowego różniły się statystycznie.

Dyskusja

Mechanizmy oddziaływania pola magnetycznego 50 Hz na mikroorganizmy nie są jeszcze w pełni zrozumiane i ze względu na mnogość protokołów stosowanych w badaniach biologicznych nadal istnieje kontrast w doniesieniach literaturowych na ten temat [11]. Interesujące jest, że wielu badaczy opowiada się za faktem, iż pola elektromagnetyczne dezaktywują tylko patogenne drobnoustroje [7]. Należy jednak mieć na uwadze, że istotą zmian zachodzących u mikroorganizmów na skutek ekspozycji na pole magnetyczne 50 Hz jest wypadkowa gatunku oraz proporcji indukcji zastosowanego pola magnetycznego i czasu trwania ekspozycji [12].

W niniejszej pracy zbadano wpływ pola magnetycznego 50 Hz o indukcji 35 mT na komórki *C. albicans*, drożdżaka o zwiększającej się oporności na antybiotyki.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki wydaje się, że zastosowanie pola magnetycznego 50 Hz w terapii przeciwgrzybiczej może być nową opcją wspomagania leczenia zakażeń *Candida*. Jak udowodniono, pole magnetyczne 50 Hz hamuje wzrost *C. albicans*, jednakże należy zaznaczyć, że wywiera on silniejszy efekt na szczep hydrofilowy (*C. albicans* CAF2-1) niż hydrofobowy (*C. albicans* CAF4-2). Zastosowanie złożonego pola elektromagnetycznego (CMF) przez zespół badawczy D'Ercole i in. (2021) również spowodowało negatywny wpływ na wzrost *C. albicans*, a także jego adhezję do powierzchni tytanowych. Zaobserwowano niższe poziomy jednostek tworzących kolonie (CFU), zmniejszoną żywotność komórek oraz niższą aktywność metaboliczną [13]. Działanie CMF również istotnie zmniejszyło CFU oraz przyczepność i proliferację *C. albicans* do żywej akrylowej. Nie stwierdzono jednak przy tym znaczących różnic poprzez wydłużenie czasu trwania ekspozycji [14]. Brak znaczących różnic zaobserwowano również w przypadku 72-godzinnych biofilmów *C. albicans* poddanych działaniu SMF. Badania wykazały, że jedynie pole elektromagnetyczne o natężeniu 20 mT ma dodatni wpływ na dojrzalą biofilm *C. albicans* [15].

Literatura nie dostarcza jednak informacji o tym, jak pole elektromagnetyczne, zwłaszcza przemienne pole magnetyczne 50 Hz użyte w niniejszej pracy, wpływa na oporność *C. albicans* względem FLC czy AMB. Uzyskane w tej pracy wyniki pokazują, iż wpływ MF na wrażliwość szczepu hydrofilowego (*C. albicans* CAF2-1) na oba zastosowane antybiotyki był niewielki. Jednakże w przypadku szczepu hydrofobowego (*C. albicans* CAF4-2), wzrost wrażliwości był istotny, szczególnie w przypadku AMB. Przeprowadzone eksperymenty potwierdzają spadek przeżywalności *C. albicans* na skutek synergistycznego działania pola magnetycznego 50 Hz i antybiotyków. Sztafrowski i in. (2019) zaobserwowali statystycznie istotny wpływ na żywotność *C. albicans* w przypadku połączenia SMF z AMB.

Synergistyczne działanie tego środka przeciwgrzybiczego i SMF może wynikać z wpływu SMF na orientację domen w błonie plazmatycznej (PM). Taki efekt

wywołuje AMB wiążąc się z ergosterolem w błonie komórkowej [9].

W niniejszej pracy zaobserwowano również zwiększoną przepuszczalność błon komórkowych *C. albicans* obrazowaną za pomocą barwienia jodkiem propidyny. Okazało się, że działanie pola magnetycznego 50 Hz wpływa na permeabilizację błony, zwłaszcza w przypadku szczepu hydrofobowego. Dodatek FLC wzmacnia ten efekt, natomiast AMB w zastosowanym stężeniu (0,063 µg/ml) nie powoduje zmian w permeabilizacji w porównaniu do samego MF. Novickij i in. (2018) w swoich badaniach nad inaktywacją i permeabilizacją *C. albicans* stosowali między innymi milisekundowe pole magnetyczne (PMF). Traktowanie PMF w zależności od użytych parametrów, spowodowało utratę żywotności drożdży do 21%. Niestety, nie zaobserwowano żadnej wykrywalnej permeabilizacji komórek, gdy stosowano wyłącznie PMF. Statystycznie istotny wynik ($P < 0,05$) stwierdzono dopiero po zastosowaniu elektroporacji w połączeniu z impulsowym polem elektromagnetycznym o dużej mocy (PEMF) [16].

Podsumowanie

Podsumowując, wpływ różnego rodzaju pola elektromagnetycznego na komórki *C. albicans* stanowi ważny krok w kierunku przezwyciężenia zjawiska lekooporności u *C. albicans*. Niemniej jednak, pod kątem przyszłych zastosowań, wpływ pola elektromagnetycznego musi być dalej badany i ulepszany.

Autorzy: dr hab. Dariusz Sztáfrowski, Politechnika Wrocławska, Katedra Energoelektryki, ul. Janiszewskiego 8, 50-377 Wrocław, E-mail: dariusz.sztarfrowski@pwr.edu.pl; dr Jakub Muraszko, Uniwersytet Wrocławski, Zakład Biotransformacji, ul. F. Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław, E-mail: jakub.muraszko@hirsfeld.pl; Adam Jasiura, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Lekarski, Wybrzeże Ludwika Pasteura 1, 50-367 Wrocław, E-mail: adam8645@gmail.com; dr inż. Aneta K. Urbanek, Uniwersytet Wrocławski, Zakład Biotransformacji, ul. F. Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław, E-mail: anetaurbanek@uwr.edu.pl; dr hab. Anna Krasowska, Uniwersytet Wrocławski, Zakład Biotransformacji, ul. F. Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław, E-mail: annakrasowska@uwr.edu.pl

LITERATURA

- [1] Henriques M., Williams D. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Pathogens*, 9 (2020), 752
- [2] Costa-de-Oliveira S., Rodrigues A.G. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: the triad yeast-host-antifungal. *Microorganisms*, 22 (2020), 8(2), 154
- [3] Howard K.C., Dennis E.K., Watt D.S., Garneau-Tsodikova S. A comprehensive overview of the medicinal chemistry of antifungal drugs: perspectives and promise, *Chem Soc Rev*, 49 (2020), 2426-2480
- [4] Erdmann W., Kmita H., Kosicki J.Z., Kaczmarek Ł. How the geomagnetic field influences life on earth - an integrated approach to geomagnetobiology, *Orig Life Evol Biosph* 51 (2021), 3, 231-257
- [5] Sztáfrowski D., Aksamit-Stachurska A., Kostyn K., Mackiewicz P., Łukaszewicz M. Electromagnetic field seems to not influence transcription via CTCT motif in three plant promoters. *Front Plant Sci*, 8 (2017), 178
- [6] Strasak L., Vetterl V., Fojt L. Effects of 50 Hz magnetic fields on the viability of different bacterial strains. *Electromagn Biol Med.*, 24 (2005), 3, 293-300
- [7] Brkovic S., Postic S., Ilic D. Influence of the magnetic field on microorganisms in the oral cavity. *J Appl Oral Sci*, 23 (2015), 2, 179-186.
- [8] Bayır E., Bilgi E., Şendimir-Ürkmez A., Hameş-Kocabaş E.E. The effects of different intensities, frequencies and exposure times of extremely low-frequency electromagnetic fields on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Electromagn Biol Med.*, 34 (2015), 1, 14-18
- [9] Sztáfrowski D., Suchodolski J., Muraszko J., Sigler K., Krasowska A. The influence of N and S poles of static magnetic field (SMF) on *Candida albicans* hyphal formation and antifungal activity of amphotericin B. *Folia Microbiol*, 64 (2019), 6, 727-734
- [10] Korzeniewska, E.; Szczęsny, A.; Lipiński, P.; Drózdź, T.; Kielbasa, P.; Miernik, A. Prototype of a Textronic Sensor Created with a Physical Vacuum Deposition Process for *Staphylococcus aureus* Detection. *Sensors* 2021, 21, 183. <https://doi.org/10.3390/s21010183>
- [11] Dini L., Abbro L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron*, 36 (2005), 195-217
- [12] Beretta G., Mastorgio A.F., Pedrali L., Saponaro S., Sezenna E. The effects of electric, magnetic and electromagnetic fields on microorganisms in the perspective of bioremediation. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 18 (2019), 29-75
- [13] D'Ercole S., Di Lodovico S., Iezzi G., Pierfelice T.V., D'Amico E., Cipollina A., Piattelli A., Cellini L., Petri M. Complex electromagnetic fields reduce *Candida albicans* planktonic growth and its adhesion to titanium surfaces. *Biomedicine*, 9 (2021), 1261
- [14] Petri M., Di Lodovico S., Iezzi G., Cipollina A., Piattelli A., Cellini L., D'Ercole, S. Effects of complex electromagnetic fields on *Candida albicans* adhesion and proliferation on polyacrylic resin. *Appl Sci*, 11 (2021), 6786
- [15] Ostafin M., Lasatowicz P., Miernik A., Nawara P., Kielbasa P., Drózdź T., Malaga-Toboła U. Wpływ zmiennego pola elektromagnetycznego na biofilmy utworzone przez *Candida albicans*. *Prz Elektrotech*, 12 (2018), 130-133
- [16] Novickij V., Lastauskienė E., Švedienė J., Grainys A., Staigvila G., Paškevičius A., Girkontaitė I., Zinkevičienė A., Markovskaja S., Novickij J. Membrane permeabilization of pathogenic yeast in alternating sub-microsecond electromagnetic fields in combination with conventional electroporation. *J Membr Biol*, 251 (2018), 2, 189-195