

УДК 615.282.012:582.288

STUDY OF INFLUENCING ANTIMYCOTIC ESULANUM ON LIPID COMPOSITION AND FUNCTIONS OF CYTOPLASMIC MEMBRANE OF YEAST *CANDIDA TROPICALIS*

S. Starovoitova

National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine

L. Oryabinska

National Technical University of Ukraine "KPI", Kyiv, Ukraine

V. Lubenec

Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine

The potential mechanism of action of antimycotic Esulanum on model of yeast Candida tropicalis was studied. Esulanum had membranotropic and fungistatic effect at subfungicide concentrations was shown. The characteristic shape of the curve "effect-dose" indicated a high degree of cooperativity structural transitions of C. tropicalis cell membranes in the presence of Esulanum. Qualitative changes in the composition of membrane lipids of yeast cells under the influence of Esulanum were found, but in the quantitative content of individual lipid fractions were detected significant changes. At the same time, subfungicide Esulanum concentration leads to decrease in the concentration of all phospholipids fractions.

Keywords: *Esulanum, antimycotic, Candida tropicalis, lipids, cytoplasmic membrane.*

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ АНТИМІКОТИКУ ЕСУЛАНУ НА ЛІПІДНИЙ СКЛАД ТА ФУНКЦІЇ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA TROPICALIS*

С.О. Старовойтова

Національний університет харчових технологій, м. Київ

Л.Б. Орябінська

Національний технічний університет України «КПІ», м. Київ

В.І. Лубенець

Національний університет «Львівська Політехніка», м. Львів

*У статті вивчено потенційний механізм дії вітчизняного антимікотика Есулану на моделі дріжджів *Candida tropicalis*. Показано, що Есулан володіє мембранотропним ефектом при фунгістатичних та субфунгіцидних концентраціях. Характерна форма кривої «ефект-доза» свідчить про високу ступінь кооперативності структурних переходів мембран клітин *C. tropicalis* в присутності Есулану. Жодних якісних змін у складі мембранних ліпідів дріжджових клітин під впливом Есулану не було виявлено, але в кількісному вмісту окремих ліпідних фракцій були виявлені значні зміни. У той же час, субфунгіцидна концентрація Есулану призводила до зменшення концентрації майже всіх фракцій фосфоліпідів.*

Ключові слова: *Есулан, антимікотик, *Candida tropicalis*, ліпіди, цитоплазматична мембрана.*

ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ АНТИМИКОТИКА ЕСУЛАНА НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ И ФУНКЦИИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA TROPICALIS*

С.А. Старовойтова

Национальный университет пищевых технологий, г. Киев

Л.Б. Орябинская

Национальный технический университет Украины «КПИ», г. Киев

В.И. Лубенец

Национальный университет «Львовская Политехника», г. Львов

*В статье изучен потенциальный механизм действия отечественного антимикотика Эсулана на модели дрожжей *Candida tropicalis*. Показано, что Эсулан обладает мембранотропным эффектом при фунгистатических и субфунгицидных концентрациях. Характерная форма кривой «эффект-доза» свидетельствует о высокой степени кооперативности структурных переходов мембран клеток *C. tropicalis* в присутствии Эсулана. Качественных изменений в составе мембранных липидов дрожжевых клеток под*

воздействием Эсулана не было обнаружено, но в количественном содержании отдельных липидных фракций были обнаружены значительные изменения. В то же время, субфунгицидная концентрация Эсулана приводит к уменьшению концентрации почти всех фракций фосфолипидов.

Ключевые слова: Есулан, антимикотик, *Candida tropicalis*, липиды, цитоплазматическая мембрана.

Лікарські засоби на основі тіосульфокислот та їх естерів є структурними аналогами природних фітонцидів, наприклад, часнику, цибулі, глибоководної морської водорості *Echinocardium cordatum*. Лікувальні властивості часнику і цибулі відомі з давніх часів. Сучасна медицина розглядає лікування препаратами з цих рослин як перспективний напрямок терапії атеросклерозу, коронарного тромбозу, астми і мікробних інфекцій. Відомо, що синтетичні естери тіосульфокислот також проявляють широкий спектр біологічної активності, що часто перевищує ефективність природних аналогів. Немало з них запропоновано як лікарські засоби, консерванти фруктів та овочів, засоби захисту рослин, рістрегулятори, біоциди, інсектициди, радіопротектори [1].

Есулан – S-етил-4-аміно-бензентіосульфонат, засіб для лікування епідермофітії стоп з малою токсичністю, високою фунгіцидною активністю і кератолітичними властивостями. Препарат розроблено у Національному університеті «Львівська Політехніка» спільно з науковцями Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

За фізико-хімічними властивостями субстанція Есулану - кристалічний порошок блідо-кремового кольору чи безбарвний, погано розчинний у гарячій воді, добре розчинний у спирті, ефірі, ацетоні та інших органічних розчинниках із специфічним запахом [1, 2].

Мета роботи – дослідження впливу оригінального вітчизняного препарату Есулану на ліпідний склад та функції цитоплазматичної мембрани на моделі дріжджів *Candida tropicalis*.

Матеріали і методи. Як тест-культуру використано гриб *C. tropicalis* з музею культур кафедри промислової біотехнології НТУУ «КПІ».

Дослідження впливу Есулану на проникність цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) *C. tropicalis* визначали фотометрично за виходом низькомолекулярних сполук з максимумом поглинання при λ -260нм. Дводобову культуру *C. tropicalis*, вирощену на МПА з 2% глюкози, двічі відмивали від поживного середовища. Культуру ресуспендували у фізіологічному розчині до одиничної густини та інкубували при 37°C 60хв з відповідною концентрацією препарату. Далі визначали оптичну густину (ОД) при λ -260нм.

Дослідження особливостей ліпідного складу дріжджей проводили методом тонкошарової хроматографії. Вологу клітинну біомасу в кількості 100 мг (з розрахунку на суху речовину), вирощену на м'ясо-пептонному агарі з 2% глюкози та субфунгіцидною концентрацією Есулану та відмити від поживного середовища, розводили дистильованою водою до 1мл. Суспензію переносили до центрифужних пробірок і додавали 5 мл суміші хлороформ: етанол (1:1). Суміш перемішували і залишали при кімнатній температурі на 2-3 години для екстракції, періодично перемішуючи. Клітини осаджували при 3000 об/хв протягом 15-20 хв. До осаду додавали 5 мл суміші хлороформ: етанол (1:1) та перемішували. Центрифугували при 3000 об/хв протягом 15-20 хв.

Надосадову рідину об'єднували, додавали по 2,5 мл хлороформу та води. Перемішували і знову центрифугували при 3000 об/хв протягом 15-20 хв.

Нижній хлороформний шар відбирали мікропіпеткою. Додавали бензол у співвідношенні 1:1 і випаровували на роторному випаровувачі. Залишок розчиняли у мінімальному об'ємі (250мкл) суміші хлороформ: етанол (1:1).

Далі проводили тонкошарову хроматографію. Для визначення загальних ліпідів використовували систему бензол:етилацетат:оцтова кислота (85:15:1). Для визначення фосфоліпідів - систему хлороформ:метанол:вода (65:25:4). Як проявник використано 10% розчин сірчаної кислоти в метанолі.

Відсоткове розподілення фракцій ліпідів в клітинах дріжджей *C. tropicalis* під впливом субфунгіцидної концентрації Есулану проводили

денситометруванням хроматографічних пластин на денситометрі Laser Densitometer LKB ULTRASCAN XL Bromma Sweden [3].

Усі досліди проводили не менш трьох повторів із використанням відповідних контролів. Статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів Microsoft Excel, достовірність змін встановлювали за t-критерієм Стюдента. Різницю вважали достовірною при значенні $P < 0,05$ [4].

Результати та їх обговорення.

Не дивлячись на широкий спектр антимікробної активності Есулану як тест культуру використано гриб *C. tropicalis*. Оскільки саме грибам роду *Candida* належить одне з перших місць в етіології грибкових захворювань людини та тварин.

Як відомо, ЦПМ є головним бар'єром, що володіє вибірковою проникністю для багатьох речовин, включаючи антимікотики.

Переважає більшість протигрибкових препаратів діють на рівні ЦПМ. До них відносяться велика група полієнових антибіотиків, ніккоміцини, прадиміцини тощо, а також антисептики та дезінфектанти, яким властивий детергентоподібний вплив [5,6]. Антимікотики, що діють по типу детергентів визивають структурні зміни мембран, що супроводжуються підвищенням бар'єру проникності.

Характерною властивістю сполук цієї групи є здатність зв'язуватися з мембранами клітин мікроорганізмів, приводячи до витоку з клітин життєво необхідних метаболітів, іонів калію, неорганічного фосфору, сахарів, амінокислот, пуринових та піримідинових основ [5].

Відомо, що хіміотерапевтичні препарати, дія яких направлена на клітинну мембрану, поділяються на дві групи: речовини, які порушують надмолекулярну структуру клітинної мембрани, що приводить до вивільнення внутріклітинних речовин та речовини, які відіграють роль переносників специфічних іонів (іонофори) і визивають аномальні накопичення іонів в середині клітини.

Хоча хіміотерапевтичні препарати, що діють на клітинну мембрану, різняться за механізмами дії, вони мають загальні властивості: більшість з них володіє низькою вибірковістю (пригнічують ріст як бактеріальних клітин, так і клітин вищих організмів), як наслідок вони токсичні і призначаються для місцевого застосування.

Виходячи з літературних даних припустили, що ЦПМ дріжджей може бути залучена до механізму дії Есулану. Функціональний стан мембран *S. tropicalis* оцінювали за виходом з клітин низькомолекулярних сполук нуклеотидної природи – піримідинових та пуринових основ при впливі на них різних концентрацій Есулану.

Результати вимірів виходу з клітин *S. tropicalis* сполук з максимумом адсорбції при 260 нм показав, що цей процес починається одразу після внесення Есулану в середовище інкубації (рис.1). Зміна концентрації Есулану від 0 до 62,5 мкг/мл підвищує вихід пуринів та піримідинів з клітини в 4,8 рази в порівнянні з контролем. В діапазоні концентрації 62,5 – 125 мкг/мл препарат визивав повну втрату пула цих сполук внаслідок чого на рис.1 відмічається плато. Отримані результати свідчать, що Есулан володіє мембранотропним ефектом при фунгістатичних та субфунгіцидних концентраціях. Характерна форма кривої «ефект-доза» (рис.1) свідчить про високу ступінь кооперативності структурних переходів мембран клітин *S. tropicalis* в присутності Есулану.

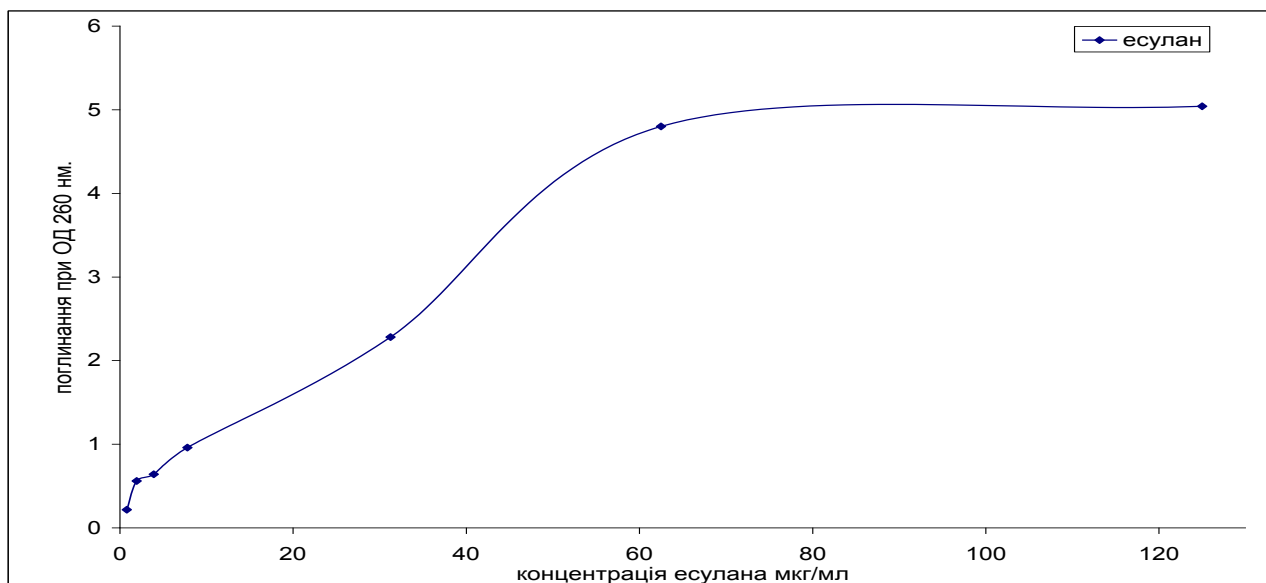


Рис.1. Проникність клітинної мембрани *S. tropicalis* під дією Есулану.

У літературі є свідчення про кореляцію бар'єру проникності з ліпідним складом мембран. Наявність у мембрані в складі фосфоліпідів цис-ізомерів жирних кислот робить бішар рихлим і здатним утворювати зони дефектів, що покращують його проникність для речовин різної природи [7]. Висока насиченість мембран ліпідами може бути причиною підвищення проникності мембран під впливом як різних концентрацій Есулану, так і різного часу його експозиції з клітинами *C. tropicalis*. Зміна проникності мембран під дією Есулану, вірогідно, пов'язана з її динамічною структурою.

Отже, Есулан взаємодіючи з поверхневими структурами клітини, в тому числі і ЦПМ, ініціює в ній глибокі структурні перебудови, наслідком яких є підвищення проникності і, можливо, пригнічення її фізіологічних функцій.

Фізичні та хімічні фактори (в тому числі хіміотерапевтичні препарати) різної природи визивають: затримку росту та онтогенетичного розвитку грибних культур, що веде до збільшення вмісту полярної фракції та ненасичених жирних кислот у ліпідах, зниження рівня триацилгліцеридів [8].

Результати дослідження складу загальних ліпідів клітин *C. tropicalis* під впливом Есулану наведені в табл. 1. З якої видно, що у складі мембранних ліпідів клітин не виявлено якісних змін. В усіх випадках присутні однакові ліпідні фракції, але в кількісному вмісті фракцій виявлені суттєві відмінності.

Таблиця 1. Фракційний склад загальних ліпідів *C. tropicalis* під впливом субфунгіцидної концентрації Есулану (125 мкг/мл)

| Клас ліпідів | Контроль | | Есулан | | |
|---|----------------|------|----------------|------|----------------|
| | мкг/г дріжджей | % | мкг/г дріжджей | % | % від контролю |
| Фосфоліпіди | 72,5±8,1 | 32,7 | 34,4±10,9 | 10,5 | 47,4 |
| Моногліцериди | 123,0±6,1 | 5,6 | 16,0±5,4 | 5,7 | 13 |
| Дигліцериди | 6,1±1,5 | 4,1 | 14,8±5,4 | 4,7 | 242,6 |
| Холестерин | 33,2±8,6 | 16,4 | 51,6±9,9 | 16,7 | 155,4 |
| Тригліцериди | 14,8±4,1 | 6,1 | 17,2±5,8 | 5,4 | 116,2 |
| Вільні жирні кислоти | 18,4±4,9 | 9,3 | 13,5±4,8 | 4,0 | 73,4 |
| Метиліві ефіри жирних кислот та сквален | 61,5±34,4 | 27,3 | 166,0±13,8 | 52,9 | 269,9 |

Перерозподіл загальних ліпідів під впливом Есулану має велике біологічне значення для клітин *C. tropicalis*. Підвищення концентрації тригліцеридів під впливом Есулану може вказувати на підвищення частки ліпідів, виконуючих роль запасних енергетичних речовин. Відомо, що тригліцериди, внаслідок великої швидкості обміну мембранних ліпідів можуть бути використані через диацильований інтермедіат для біосинтезу фосфоліпідів [9], концентрація яких під впливом Есулану зменшується.

Саме з стеролами пов'язаний механізм дії більшості антимікотиків. Ергостерол у клітинах грибів обов'язковий для проліферації. Його зникнення може стати причиною зупинки росту культури. Крім того, ергостерол у ЦПМ грибів подібно до холестерину в мембрані клітин ссавців контролює текучість, цілісність та біологічні функції мембрани.

З експериментальних даних (табл. 1) видно, що під впливом Есулану відбувається значне сумарне накопичення сквалену та метилових ефірів жирних кислот – до 269,9%. Можна припустити, що механізм дії Есулану подібний до механізму дії Толнафтату, що пригнічує синтез ергостеролу за рахунок дії на фермент скваленоксидазу, контролюючий утворення одного з ранніх попередників ергостеролу. Як результат вміст ергостеролу зменшується, але підвищується вміст сквалену. Фунгістатичний ефект може бути пов'язаний саме з пригніченням синтезу мембрани внаслідок нестачі ергостеролу. Гибель клітин може відбуватися внаслідок повного пригнічення синтезу ергостеролу, але вірогідніше за все це відбувається внаслідок накопичення великих кількостей сквалену, що руйнує мембрану клітини. Паралельно з накопиченням сквалену відбувається накопичення дигліцеридів – 242,6%, холестерину – 155,4% та незначне збільшення концентрації тригліцеридів – 116,2%, поряд з цим зменшуються концентрації фосфоліпідів – 47,4% та моногліцеридів – 13% та невелике зменшення вільних жирних кислот – 73,4% від контролю.

Враховуючи адаптаційну роль мембранних ліпідів, можна припустити, що перерозподіл ліпідів сприяє регулюванню структурно-функціонального стану мембран, внаслідок чого змінюється чутливість клітин до препарату.

Визначальна роль в структурі та функціях ЦПМ відводиться фосфоліпідам. Специфічний набір фосфоліпідів індукує необхідну конформацію локалізованих у мембрані ферментів і забезпечує активність їх рецепторних областей. Склад фосфоліпідів впливає на структурну лабільність та проникність ЦПМ [10].

Враховуючи важливість фосфоліпідів в структурній організації мембран і участь в стійкості клітин до хіміотерапевтичних препаратів, досліджено фосфоліпідний склад мембран *C. tropicalis* під дією Есулану. Отримані дані (табл.2) свідчать про те, що субфунгіцидна концентрація Есулану приводить до зниження концентрації майже всіх класів фосфоліпідів по відношенню до контрольних клітин: глікофосфоліпідів – до 68,3%, фосфатидилінозиту – до 39,9%, фосфатидилетаноламіну – до 62,5%, нейтральних ліпідів та ефірів холестерину – до 88,2%. Спостерігається збільшення концентрації лізофосфатидилхоліну – до 162,5% та фосфатидилхоліну – до 111,1%.

Таблиця 2. Фракційний склад фосфоліпідів *C. Tropicalis* під впливом субфунгіцидної концентрації Есулану (125 мкг/мл)

| Клас ліпідів | Контроль | | Есулан | | |
|--|----------------|------|----------------|------|----------------|
| | мкг/г дріжджей | % | мкг/г дріжджей | % | % від контролю |
| Глікофосфоліпіди | 51,4±3,0 | 23,8 | 35,1±3,0 | 20,3 | 68,3 |
| Лізофосфатидилхолін | 21,6±3,0 | 9,5 | 35,1±3,0 | 20,3 | 162,5 |
| Фосфатидилінозит | 54,1±3,0 | 24,8 | 21,6±0,3 | 12,5 | 39,9 |
| Фосфатидилхолін | 24,3±3,0 | 10,7 | 27,0±3,0 | 15,6 | 111,1 |
| Фосфатидилетаноламін | 21,6±0,3 | 10,0 | 13,5±3,0 | 7,8 | 62,5 |
| Нейтральні ліпіди та ефіри холестерину | 49,5±3,0 | 21,3 | 40,5±0, | 23,4 | 88,2 |

Перерозподіл у вмісті різних класів фосфоліпідів під впливом Есулану може відбуватися внаслідок його впливу на ферменти та ферментні системи, що функціонують при переході одного виду фосфоліпідів до іншого.

Висновки. Досліджено потенційний механізм дії Есулану на моделі клітин *C. tropicalis*. Показано, що Есулан взаємодіючи з поверхневими структурами клітини, в тому числі і цитоплазматичною мембраною, ініціює в ній глибокі структурні перебудови, наслідком яких є підвищення проникності.

Встановлено, що у складі загальних ліпідів клітин не виявлено якісних змін під впливом Есулану. Виявлено, що субфунгіцидна концентрація Есулану приводить до зниження концентрації майже всіх класів фосфоліпідів клітин, але спостерігається збільшення концентрації лізофосфатидилхоліну та фосфатидилхоліну. У подальшому планується дослідити інші можливі механізми дії Есулану на грибну клітину.

Література:

1. *Лубенець В.І.* Хімія похіднихтіосульфокислот. Автореф. дис. ... док. хім. наук. – Л., 2006. – 20 с.
2. *Яремкевич О.С., Бура М.В., Мандзинець С.М. та ні.* Вплив похідних тіосульфокислот на транспортні системи зародків холонокровних // *Фізика живого.* – 2012. – Т.19, №1. – С. 70 – 77.
3. Хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу біологічних макромолекул: Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу «Методи аналізу в біотехнології» /Уклад.: В.Ю. Черненко – К.: ІВЦ «Видавництво «Політехніка»», 2004. – 30 с.
4. *Бейли Н.* Статистические методы в биологии / Норман Бейли. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. – 260 с.
5. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках. – М.: Наука, 2004. – 528 с.
6. *Burke A. Cunha* Antibiotic Essentials. – England: Jones and Barlett Learning; 12 edition, 2013 – 778 p.
7. *Eschanfeldt W.H., Zhang Y., Samaha H. et al.* Transformation of fatty acids catalyzed by cytochrome P450 monooxygenase enzymes of *Candida tropicalis* // *Applied and Environmental Microbiology* – 2003. - V.69, №10. – P. 5992-5999.
8. *Козлов Л.И., Казанцев Ю.Е., Алентьева Е.С.* Состав липидов микроорганизмов в зависимости от источников сырья и режимов культивирования: Микробиологическое производство: Обзор. Информ. – М.: ВНИИСЭТИИ Минмедпрома СССР, 1990. – Вып. 2. – 30 с.

9. Мысякина И.С., Фунтикова Н.С. Исследование состава липидного гриба *Micor* штамм ИНМИ в условиях задержки роста Нистатином // Микробиология. – 1991. – Т.60, №4. – С. 645-651.

10. Конев С.В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. – Минск: Наука и техника. – 1987. – 240 с.

Одержана редколегією 27.12.2014

e-mail: svetik_2004@mail.ru