

УДК 615.282.012:582.288

THE STUDY OF POTENTIAL MECHANISM OF ACTION OF DOMESTIC ANTIFUNGAL DRUG ESULANUM

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. Experimentally proved that Esulanum in subfungicide concentration (125 ug/ml) inhibits the synthesis of both nucleic acids in C. tropicalis cells. The obtained IR spectra found that Esulanum not affect the external profile polysaccharide C. tropicalis cells. The increases of intracellular concentrations of all investigated microelements C. tropicalis cells under the influence of Esulanum were demonstrated. A more detailed study of the mechanism of Esulanum action on yeast cell planned in future experiments.

Keywords: *Esulanum, antifungal drug, Candida tropicalis, mechanism of action.*

ВИВЧЕННЯ ПОТЕНЦІЙНОГО МЕХАНІЗМУ ДІЇ ВІТЧИЗНЯНОГО ПРОТИГРИБКОВОГО ПРЕПАРАТУ ЕСУЛАНУ

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 антимікотику Есулану на моделі дріжджів Candida tropicalis. Експериментально доведено, що

*Есулан у субфунгіцидній концентрації (125 мкг/мл) пригнічує синтез обох нуклеїнових кислот в клітинах *C. tropicalis*. Отримані ІЧ-спектри виявили, що Есулан не впливає на зовнішній полісахаридний профіль клітин *C. tropicalis*. Продемонстровано, що під впливом субфунгіцидної концентрації Есулану відбувається збільшення концентрації всіх досліджених мікроелементів усередині клітин *C. tropicalis*. Більш детальне вивчення механізму дії Есулану на грибну клітину планується провести в подальших дослідях.*

Ключові слова: *Есулан, антимікотик, *Candida tropicalis*, механізм дії.*

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОТИВОГРИБКОВОГО ПРЕПАРАТА ЕСУЛАНА

С.А. Старовойтова

Национальный университет пищевых технологий, г. Киев

Л.Б. Орябинская

Национальный технический университет Украины «КПИ», г. Киев

В.И. Лубенец

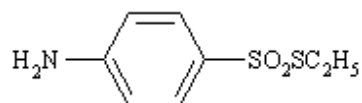
Национальный университет «Львовская Политехника», г. Львов

*В статье изучен потенциальный механизм действия отечественного антимикотика Эсулана на модели дрожжей *Candida tropicalis*. Экспериментально доказано, что Эсулан в субфунгицидной концентрации (125 мкг/мл) подавляет синтез обеих нуклеиновых кислот в клетках. Полученные ИК-спектры обнаружили, что Эсулан не влияет на внешний полисахаридный профиль *C. tropicalis*. Продемонстрировано, что под влиянием субфунгицидной концентрации Эсулана происходит увеличение концентрации исследованных внутриклеточных микроэлементов *C. tropicalis*. Более детальное изучение механизма действия Эсулана на грибную клетку планируется провести в дальнейших исследованиях.*

Ключевые слова: *Есулан, антимікотик, *Candida tropicalis*, механізм дії.*

Одержана редколлегією: 19 грудня 2014р.

Есулан – S-етилловий естер параамінобензолтіосульфанилової кислоти (S-етил-4-аміно-бензентіосульфонат), засіб для лікування епідермофітії стоп, що вирізняється 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 органічних розчинниках.

Есулан застосовують у вигляді 1% мазі, що за активністю є близькою до цефазоліну та поліміксину і переважає за антибактеріальною дією ампіцилін. Препарат - це маса м'якої консистенції білого кольору з кремовим відтінком та специфічним запахом. Клінічні дослідження показали гарний терапевтичний ефект. Подразнюючої дії чи побічних явищ не виявлено [1, 2].

Лікарські засоби на основі тіосульфокислот та їх естерів є структурними аналогами природних фітонцидів. Використовуються як лікарські засоби, консерванти фруктів та овочів, засоби захисту рослин, рістрегулятори, біоциди, інсектициди, радіопротектори [1].

Мета роботи – дослідження потенційного механізму дії оригінального вітчизняного препарату Есулану на моделі дріжджової *Candida tropicalis*.

Матеріали і методи. В якості тест-культури використано дріжджовий гриб *C. tropicalis* з музею культур кафедри промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки НТУУ «КПІ».

Визначення вмісту нуклеїнових кислот (НК) в клітинах дріжджової під впливом Есулану проводили спектрофотометрично за методикою Спіріна [3], розділення ДНК та РНК проводили методом Schmidt та Tannhauser [3].

Визначення впливу Есулану на полісахаридний профіль клітин *C. tropicalis* проводили методом ІЧ-спектроскопії [4] на спектрофотометрі FT-IR Spectrometer Spectrum 1000 (Perkin Elmer Int. Inc., Switzerland).

Встановлення впливу препарату на ендогенне дихання *C. tropicalis* проводили полярографічно на полярографі LP 60 з відкритим електродом [5].

Мікроелементний склад *C. tropicalis*, вирощених в присутності Есулану досліджували рентгено-флюоресцентним методом на рентгенофлюоресцентному спектрометрі “Elvax” (“Елватех”, Україна).

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 $P < 0,05$ [6].

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

Відома низка антимікробних препаратів, механізм дії яких пов'язаний з порушенням функції НК або ферментів, що приймають участь у їх синтезі. В зв'язку з цим проведено дослідження впливу Есулану на стан НК *C. tropicalis*.

Антимікотики змінюють концентрацію РНК та ДНК трьома способами: пригнічують синтез пуринів та піримідинів; пригнічують синтез НК; утворюють комплекси з НК змінюючи їх функціональну активність [7, 8].

Як видно з табл. 1 Есулан у субфунгіцидній концентрації (125 мкг/мл) пригнічує синтез обох НК у клітинах *C. tropicalis* майже з однаковою інтенсивністю: залишкова концентрація ДНК у клітинах становила $10,68 \pm 0,01$ мкг/мл та РНК - $49,74 \pm 0,05$ мкг/мл, що відповідало 27,52% та 39,13%. Тобто концентрація НК у клітинах *C. tropicalis* під впливом антимікотику зменшилась для ДНК у 3,63 рази, а для РНК – у 2,56 рази, відповідно. Отже, для

Есулану спостерігалось одночасне пригнічення декількох різних макромолекул, таке явище спостерігається, коли препарат діє на процес утворення енергії, необхідної для синтезу НК або впливає на цілісність клітинної мембрани. Можна припустити, що Есулан пригнічує матричні функції ДНК, тобто процес реплікації та транскрипції. Можливі два варіанти: 1) блокування матриці – утворення нефункціонального комплексу з ДНК; 2) зміна структури ДНК (розриви ланцюгів, вищеплення основ, утворення ковалентних зв'язків між двома ланцюгами), внаслідок чого вона більше не може слугувати матрицею для синтезу РНК. Утворення комплексу Есулан-ДНК перешкоджає переміщенню РНК-полімерази вздовж ДНК-матриці, і як наслідок пригнічує синтез РНК. Пригнічення реплікації ДНК може бути пов'язано з тим, що ДНК в комплексі з Есуланом стає більш стабільною і гірше розплітається [7, 8].

Таблиця 1. Зміна концентрацій НК у клітинах *C. tropicalis* під впливом Есулану

| Зразок | ДНК | | РНК | |
|------------------|------------|----------------|-------------|----------------|
| | мкг/мл | % від контролю | мкг/мл | % від контролю |
| Контроль | 38,81±0,02 | 100,00 | 127,11±0,75 | 100,00 |
| Есулан 125 мг/мл | 10,68±0,01 | 27,52 | 49,74±0,05 | 39,13 |

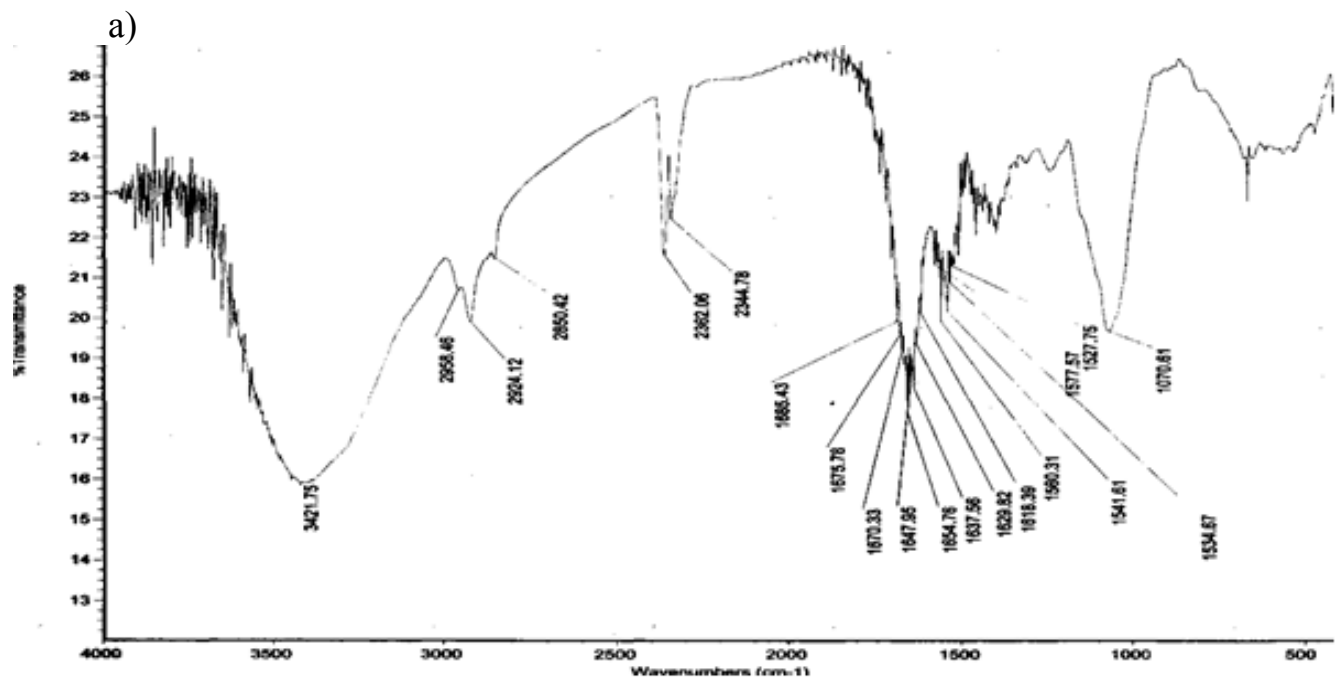
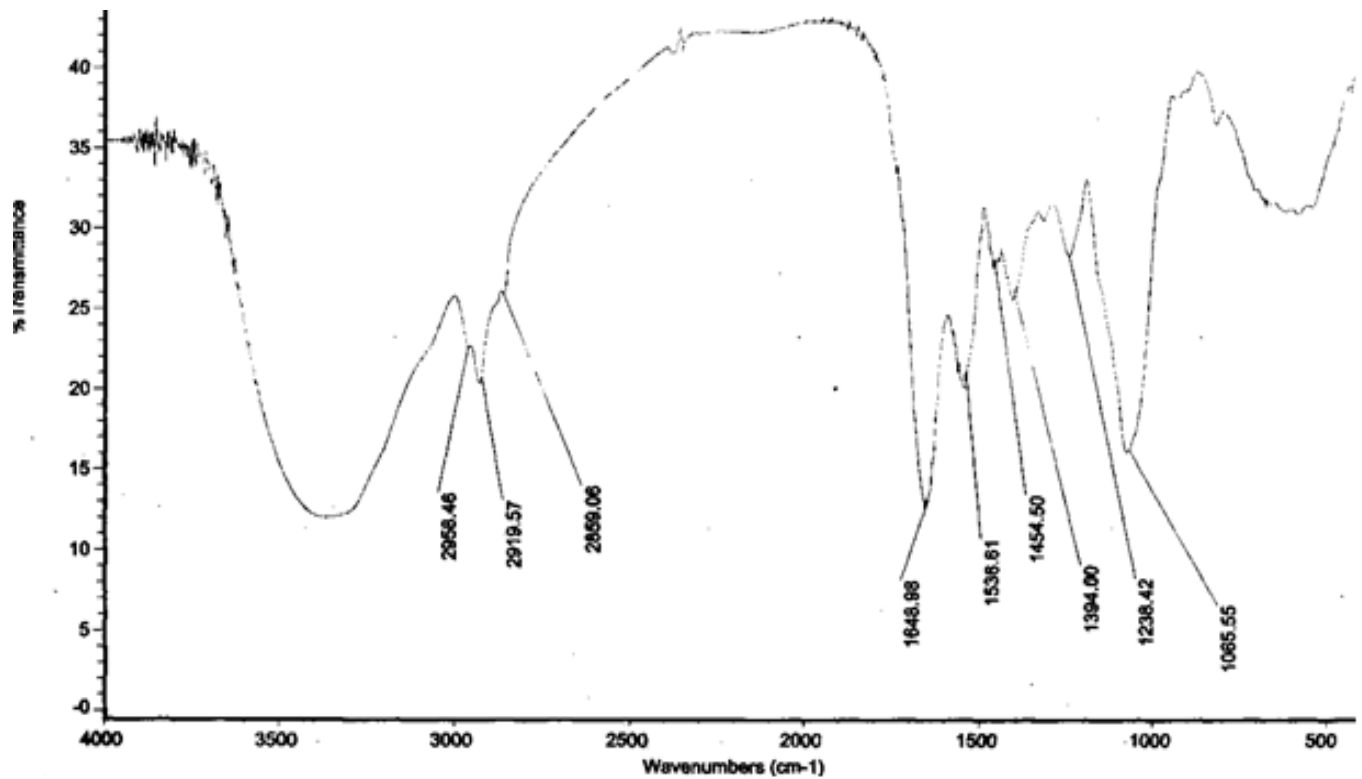
Для більш точного встановлення механізму впливу Есулану на синтез НК у клітинах *C. tropicalis* необхідне детальніше вивчення впливу препарату на ферменти відповідальні за синтез та функціонування даних компонентів клітин.

Не менш значущими в ланцюгу реакцій механізму дії антимікотиків є полісахаридні комплекси дріжджів. Полісахариди дріжджів за функціональними властивостями поділяються на три групи: структурні - надають клітинам, органам і цілим організмам механічну міцність; водорозчинні - високо гідратовані і запобігають висиханню клітин і тканин; резервні - слугують енергетичним ресурсом [9].

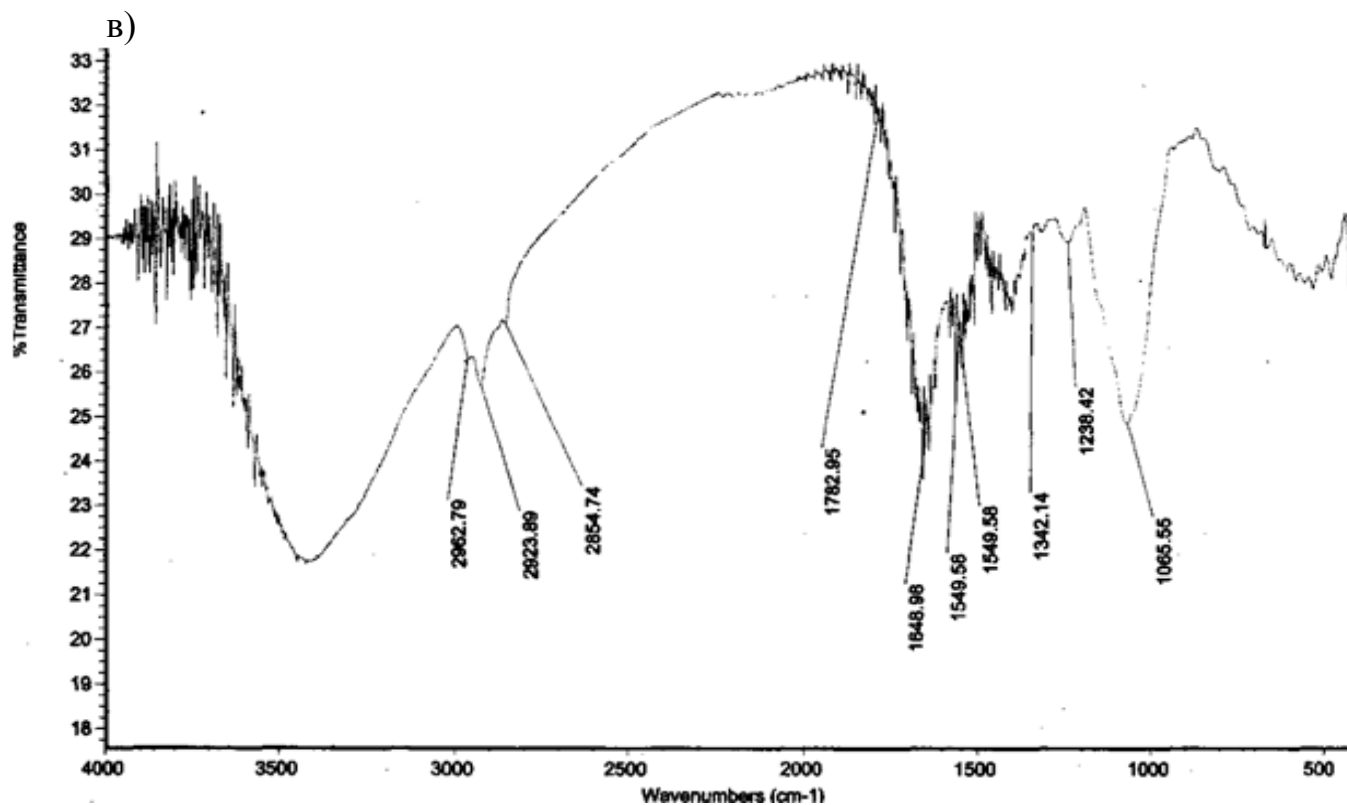
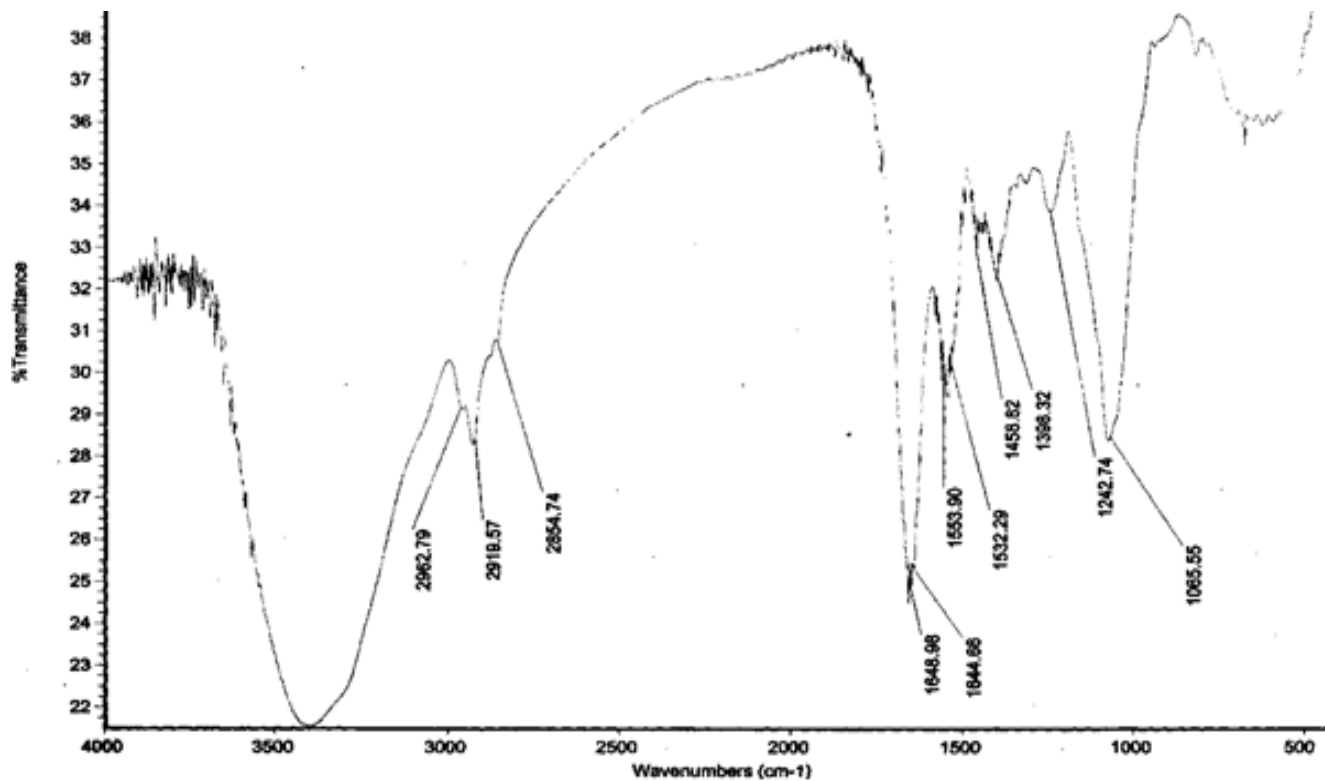
У грибів роду *Candida* основними полісахаридами є: маннани, глюкани та хітин, з яких побудована клітинна стінка. Полісахариди, особливо зовнішні, відіграють величезну роль в патогенезі кандидозів – з цими структурами пов'язані

антигенні властивості мікроорганізмів. Тому було досліджено вплив Есулану на зовнішній полісахаридний профіль *C. tropicalis*, що оцінювався при двох режимах вирощування клітин, статичному та динамічному (за аерації).

Вплив препарату на біосинтез полісахаридних комплексів *C. tropicalis* оцінювали за ІЧ спектрами клітин, вирощених на середовищах з 15,6 мкг/мл Есулану. Отримані результати представлені у вигляді ІЧ-спектрограм (рис.1).



б)



Г)

Рис.1. ІЧ-спектрограма полісахаридних комплексів *C. tropicalis* вирощених: а) за стаціонарних умов; б) в умовах аерації; в) за стаціонарних умов з 15,6мкг/мл Есулану; г) в умовах аерації з 15,6мкг/мл Есулану.

На усіх спектрограмах (рис.1) спостерігається широка смуга в області 1000-1170 cm^{-1} , що відноситься до НК та вуглеводів. Вона характеризується дуплетом з максимумами при 1050 cm^{-1} , перший з них характеризує зв'язок P-O-C. На фоні цієї смуги мало інтенсивні смуги при 1190 і 1160 cm^{-1} , що відносяться до коливань P-O-CH₃ та P-O- C₂H₅ груп [5, 10].

Поглинання в області 1735 cm^{-1} характерно для ефірів жирних кислот. Смуги поглинання в області 1220-1260 cm^{-1} мають не стале положення і можуть відноситися до коливань ефірних зв'язків C-O-C (1250 cm^{-1}), так і зв'язків O-P (1222 cm^{-1}) та O=P (1255 cm^{-1}). Тому ідентифікацію ефірних груп проводили за смугою поглинання при 1735 cm^{-1} . Всі спектри характеризуються інтенсивним поглинанням в області 1660 – 1500 cm^{-1} . Перша з цих смуг відноситься до коливань подвійних зв'язків, а друга – до коливань C-N [10].

В усіх спектрах спостерігалось поглинання в області 970 cm^{-1} , характерне для коливання зв'язків C=C в «транс» положенні, і сліди поглинання в області 790 cm^{-1} , властиве для зв'язків 1→3. Є низка смуг поглинання в спектрах, але інтерпретація їх в об'єктах, що містять домішки НК та білку, ускладнена.

Порівняння отриманих адсорбційних смуг (рис.1) із смугами, що описані в літературі, дозволило припустити, що полісахариди клітин *C. tropicalis* представляють собою α -аномери [5, 10].

Паралельно з проведенням ІЧ-спектроскопії зразків клітин *C. tropicalis*, було проведено ІЧ-спектроскопіювання Есулану. Отримані ІЧ-спектри свідчать про те, що Есулан не впливає на зовнішній полісахаридний профіль культури *C. tropicalis*. Незначні зміни в ІЧ-спектрах спостерігалися лише при різних умовах вирощування (аеробні та анаеробні умови вирощування), що пояснюється різною ступеню ацетилювання спиртових груп, а також частковим або повним окисленням альдегідних та спиртових груп під впливом дії кисню середовища.

Candida – факультативні анаероби, що володіють досконалою та складною системою перетворення енергії. Відмінною рисою дріжджів є наявність складніше влаштованого, в порівнянні з вищими організмами, дихального ланцюгу з

альтернативними шляхами для «вводу» та «скиданню» відновлювальних еквівалентів. Це дозволяє йому виконувати складніші функції, ніж просто енергозабезпечення і пояснює надзвичайні адаптаційні властивості дріжджів [11].

Отже процес дихання дріжджів має велике значення для їх життєдіяльності, тому було проведено дослідження впливу Есулану на пригнічення дихання мікроорганізмів, як одного з можливих механізмів його дії. Як відомо хіміотерапевтичні препарати, що впливають на дихальні процеси мікроорганізмів поділяються на ті, що безпосередньо пригнічують дихання (інгібітори сукцинатдегідрогенази, термінальних систем переносу електронів тощо) та ті, що пригнічують окислювальне фосфорилування [12].

Пригнічення ендogenous дихання дріжджів під впливом антимікоту було досліджено полярографічним методом. За отриманими полярограмами розраховано споживання наноатомів кисню в процесі дихання *C. tropicalis* в присутності Есулану та без нього. Результати обрахунку наведено в табл.2.

Таблиця 2. Значення ендogenous дихання дріжджів *C. tropicalis* під впливом субфунгістатичних концентрацій Есулану

| Зразок | Концентрація наноатомів кисню, O ₂ /хв/мг білку | Пригнічення дихання, % від контролю |
|-------------------------------|--|-------------------------------------|
| Клітини <i>C. tropicalis</i> | 264±5,84 | 0 |
| Есулан спиртовий розчин | 34,3±7,8 | 87 |
| Есулан водно-спиртовий розчин | 48±19,6 | 81,8 |

З отриманих даних видно, що спиртовий розчин Есулану пригнічує дихання клітин *C. tropicalis* на 87%. Щоб уникнути вплив спирту на дихання клітин експеримент модифіковано і замість спиртового розчину Есулану до експерименту взято водно-спиртовий розчин, повністю вилучити спирт неможливо, оскільки препарат не розчиняється у воді. Використання водно-спиртового розчину показало пригнічення екзогенного дихання *C. tropicalis* на 81,8%, що свідчить про виражений характер пригнічення ендogenous дихання клітин Есуланом.

Відомо, що зміна концентрації мікроелементів, зокрема іонів металів, в середовищі чинить суттєвий вплив на метаболізм мікроорганізмів, оскільки вони є

інтегральними компонентами багатьох ферментів та білків. Одне з перших місць за своєю важливістю і розповсюдженістю в біологічних системах займають іони цинку і заліза [13, 14]. Для дріжджових клітин цинк і залізо – це перш за все алкогольдегідрогеназа, цитохроми, каталаза, аконітаза і фумараза.

Деякі хіміотерапевтичні препарати утворюють міцні сполуки з дво- та трьох-валентними металами (хелати). Ці реакції визивають інактивацію ферментів, впливаючих на синтез білку. Пригнічення нітратредуктази під дією тетрациклінів пояснюється взаємодією з Mn^{2+} , а фосфорилювання – з Mg^{2+} .

Іони магнію слугують кофакторами багатьох ферментів: синтетаз НК, ферментів, що приймають участь в активації амінокислот, гліколітичних ферментів, АТФ-аз тощо. Зв'язування Mg^{2+} виводить їх з реакції обміну створюючи їх дефіцит, в результаті порушується функція клітинних мембран, стабілізація спіралі ДНК тощо. Деякі хіміотерапевтичні препарати роз'єднують окислювальне фосфорилювання в залежності від наявності K^+ [8]. Регуляторну роль в процесі ліпогенезу відіграють фосфати та магній. При надлишку фосфору відбувається інтенсивний синтез фосфоліпідів. Селен впливає на ліпідний склад і склад жирних кислот [9].

Мікро- та макроелементи відіграють визначальну роль у життєдіяльності мікроорганізмів, тому проаналізовано мікроелементний склад клітин *C. tropicalis* під впливом Есулану (табл.3). Як видно з табл.3 під впливом субфунгіцидної концентрації Есулану підвищуються концентрації майже всіх елементів в клітині. Це можна пояснити тим, що препарат виступає в ролі переносника мікроелементів до клітини. Можна припустити, що механізм переносу мікроелементів препаратом нагадує механізм переносу іонів K^+ валіноміцином. Есулан може утворювати просторові конформації у вигляді кільця, захоплюючи в середину мікроелемент і переносючи в середину клітини, де під впливом певних факторів кільце препарату розривається, мікроелемент виходить і накопичується в клітині [8].

Не виключений і інший механізм переносу іонів металів - утворення хелатів, що проникають в клітину одним з механізмів транспорту поживних речовин.

Таблиця 3. Мікроелементний склад клітин *C. tropicalis*, вирощених в присутності Есулану

| Елемент | Концентрація елементів в пробі, мкг/мл | | |
|---------|--|----------------------|----------------|
| | Контроль | Есулан 125мкг/мл | % від контролю |
| K | 18860,2900±621,66000 | 21789,3900±690,54000 | 115,53 |
| S | 1231,3990±364,00000 | 2285,5720±512,49000 | 185,61 |
| Ca | 696,3136±98,03900 | 756,7830±105,63000 | 108,68 |
| Cl | 404,3462±73,28200 | 223,8059±56,34400 | 55,35 |
| Fe | 316,6979±15,92100 | 300,9114±16,03900 | 95,02 |
| Zn | 134,4687±6,77350 | 168,3545±7,83260 | 125,20 |
| Cu | 32,0620±4,24260 | 40,3721±4,92000 | 125,92 |
| Cr | 22,6454±7,59550 | 35,6741±9,85220 | 157,53 |
| Ti | 11,7741±8,10350 | 77,4353±21,47700 | 657,67 |
| Mn | 11,7043±3,09150 | 17,3456±3,88940 | 148,20 |
| Se | 7,7507±1,26290 | 7,8384±1,31250 | 101,13 |
| Pb | 6,0616±1,04300 | 4,3231±0,91026 | 71,32 |
| Br | 3,2553±0,61764 | 4,2277±0,72742 | 129,87 |
| Ni | 3,3462±1,19140 | 3,5738±1,27240 | 106,80 |
| Rb | 2,2562±0,47861 | 0,5301±0,23976 | 23,50 |
| Sr | 1,9068±0,39288 | 2,9106±0,50164 | 152,64 |
| Cd | 0,3718±0,19561 | 0,6346±0,31725 | 170,68 |

Підвищення концентрації мікроелементів в порівнянні з нормальною їх концентрацією може впливати на різні процеси по різному як пригнічуючи, так і стимулюючи їх. Але як гіпер- та і гіпофункції процесів пов'язаних з життєдіяльністю клітин призведе в кінцевому випадку до загибелі клітин [9].

Висновки. Досліджено потенційний механізм дії Есулану на моделі клітин *C. tropicalis*. Встановлено пригнічення синтезу нуклеїнових кислот. Доведено, що Есулан не впливає на зовнішній полісахаридний профіль культури *C. tropicalis*. Показано виражений характер пригнічення ендогенного дихання клітин Есуланом. Під впливом субфунгіцидної концентрації Есулану відбувається підвищення концентрації майже всіх мікроелементів в клітині.

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 холоднокровних // Фізика живого. – 2012. – Т.19, №1. – С. 70 – 77.
3. Химия и биохимия нуклеиновых кислот / под ред. И.Б. Збарского и С.С. Дебова – Л.: Медицина, 1968. – 429 с.
4. Ефременко В.И., Ефимцева Е.П. Изучение полисахаридных комплексов методом инфракрасной спектроскопии // Антибиотики. – 1969.- №3. – С. 470-477.
5. Методы изучения мембран растительных клеток. Учеб. пособие / Под ред. В.В. Полевого, Т.Б. Максимова, Н.Ф. Синютиной – Л.: Издательство Ленинград. ун-та, 1986. – 192 с.
6. Бейли Н. Статистические методы в биологии / Норман Бейли. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. – 260 с.
7. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Наука, 2004. – 528 с.
8. Cunha V.A. Antibiotic Essentials. – England: Jones & Barlett Learn., 2013 – 778 p.
9. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
10. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. – М.: Мир, 1963. – 592 с.
11. Звягильская Р.А. Митохондрии дрожжей: отличительные свойства, вклад в решение общих проблем энергетики. (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т.31, №1. – С. 50-59.
12. Ильченко А.П., Фаусек Е.А., Сингх Н.Н. и др. Сравнительное изучение физиологических и биохимических особенностей двух штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica* при их выращивании на среде с этанолом // Микробиология. – 1996. – Т.65, №2. – С. 189-195.
13. Яблочкова Е.Н., Болотникова О.И., Михайлова Н.П. и др. Исследование активности ксилоредуктазы и ксилитдегидрогеназы у дрожжей // Микробиология. – 2003.- Т.75, №4. – С. 466-469.
14. Яблочкова Е.Н., Болотникова О.И., Михайлова Н.П. и др. Особенности ферментации D-ксилозы и D-глюкозы ксилозоассимилирующими дрожжами // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003.- Т.39, №3. – С. 302-306.

e-mail: svetik_2004@mail.ru