

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

S. Starovoitova

National University of Food Technologies

L. Oryabinska

National Technical University of Ukraine "KPI"

V. Lubenets

Lviv Polytechnic National University

Key words:

Esulanum

Antimycotic

Candida tropicalis

Lipids

Cytoplasmic membrane

Article history:

Received 12.01.2015

Received in revised form
24.02.2015

Accepted 03.03.2015

Corresponding author:

S. Starovoitova

E-mail:

svetik_2004@mail.ru

ABSTRACT

The potential mechanism of action of antimycotic Esulanum on model of yeast *Candida tropicalis* was studied. It is shown that Esulanum has membranotropic and fungistatic effect at subfungicide concentrations. The characteristic shape of the effect-dose curve 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 significant changes were detected. At the same time, subfungicide Esulanum concentration leads to decrease in the concentration of all phospholipids fractions.

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

С.О. Старовойтова

Національний університет харчових технологій

Л.Б. Орябінська

Національний технічний університет України «КПІ»

В.І. Лубенець

Національний університет «Львівська Політехніка»

*У статті вивчено потенційний механізм дії вітчизняного антимікотичу Есулану на моделі дріжджів *Candida tropicalis*. Показано, що Есулан володіє мембранотропним ефектом при фунгістатичних і субфунгіцидних концентраціях. Характерна форма кривої «ефект-доза» свідчить про високий ступінь кооперативності структурних переходів мембран клітин *C. tropicalis* за наявності Есулану. Жодних якісних змін у складі мембранних ліпідів*

дріжджових клітин під впливом Есулану не виявлено, але в кількісному вмісті окремих ліпідних фракцій були виявлені значні зміни. Разом з тим, субфунгіцидна концентрація Есулану призводила до зменшення концентрації майже всіх фракцій фосфоліпідів.

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

Постановка проблеми. 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 мають широкий спектр біологічної активності, що часто перевищує ефективність природних аналогів, тому їх пропонують використовувати 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 в 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 зі специфічним запахом [1, 2].

Мета статті. Дослідження впливу оригінального вітчизняного препарату Есулану на ліпідний склад і функції цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) 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 $\lambda=260$ нм. Дводобову культуру *C. tropicalis*, вирощену на МПА з 2 % глюкози, двічі відмивали від поживного середовища. Культуру ресуспендували у фізіологічному розчині до одиначної густини та інкубували при 37 °С 60 хв з відповідною концентрацією препарату. Далі визначали оптичну густину (ОД) при $\lambda=260$ нм.

Дослідження особливостей ліпідного складу дріжджів 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 й субфунгіцидною концентрацією Есулану та відмиту від поживного середовища, розводили дистильованою водою до 1 мл. Суспензію переносили до центрифужних пробірок і додавали 5 мл суміші хлороформ: етанол (1:1).

Суміш перемішували і залишали при кімнатній температурі на 2—3 год 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 (250 мкл) суміші хлороформ: етанол (1:1).

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

Відсоткове розподілення фракцій ліпідів у клітинах дріжджів *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 менше 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 Ст'юдента. Різницю вважали достовірною при значенні $P < 0,05$ [4].

Результати і обговорення. Незважаючи на широкий спектр антимікробної активності Есулану, як тест культуру використано дріжджоподібний гриб *C. tropicalis*, оскільки саме грибам роду *Candida* належить одне з провідних місць в етіології грибкових захворювань людини й тварин.

Як відомо, ЦПМ є головним бар'єром, що має вибіркочну проникність для багатьох речовин, включаючи антимікотики. Переважна більшість проти-грибкових препаратів діють на рівні ЦПМ. До них відносяться велика група полієнових антибіотиків, нікоміцини, прадиміцини тощо, а також антисептики та дезінфектанти, яким властивий детергентоподібний вплив [5, 6]. Антимікотики, що діють по типу детергентів, призводять до структурних змін мембран, що супроводжуються підвищенням бар'єру проникності.

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

Відомо, що хіміотерапевтичні препарати, дія яких спрямована на клітинну мембрану, поділяються на дві групи: речовини, які порушують надмолекулярну структуру клітинної мембрани, що призводить до вивільнення внутрішньоклітинних речовин, і речовини, які відіграють роль переносників специфічних іонів (іонофори) і призводять до аномального накопичення іонів усередині клітини.

Хоча хіміотерапевтичні препарати, що діють на клітинну мембрану, різняться за механізмами дії, вони мають загальні властивості: більшість з них володіє низькою вибіркочістю (пригнічують ріст як бактеріальних клі-

тин, так і клітин вищих організмів), як наслідок, вони токсичні і призна-чаються для місцевого застосування.

ЦПМ дріжджів може бути залучена до механізму дії Есулану. Функціо-нальний стан мембран *C. tropicalis* оцінювали за виходом з клітин низько-молекулярних сполук нуклеотидної природи — піримідинових і пуринових основ при впливі на них різних концентрацій Есулану.

Результати вимірів виходу з клітин *C. tropicalis* сполук з максимумом адсорбції при 260 нм показав, що цей процес починається одразу після вне-сення Есулану в середовище інкубації (рис.). Зміна концентрації Есулану від 0 до 62,5 мкг/мл підвищує вихід пуринів і піримідинів з клітини в 4,8 раза порівняно з контролем. У діапазоні концентрації 62,5—125 мкг/мл препарат спричиняв повну втрату пулу цих сполук, внаслідок чого на рис. відмічається плато. Отримані результати свідчать, що Есулан володіє мембранотропним ефектом при фунгістатичних і субфунгіцидних концентраціях. Характерна форма кривої «ефект-доза» (рис.) свідчить про високий ступінь кооператив-ності структурних переходів мембран клітин *C. tropicalis* за наявності Есулану.

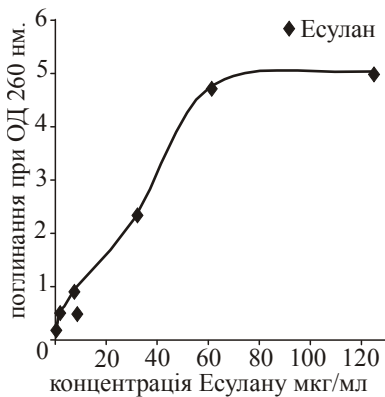


Рис. Проникність клітинної мембрани *C. tropicalis* під дією Есулану

У літературі є свідчення про коре-ляцію бар'єру проникності з ліпідним складом мембран. Наявність у мембра-ні в складі фосфоліпідів цис-ізомерів жирних кислот робить бішар пухким і здатним утворювати зони дефектів, що покращують його проникність для речовин різної природи [7]. Висока насиченість мембран ліпідами може бути причиною підвищення проник-ності мембран під впливом як різних концентрацій Есулану, так і різного ча-су його експозиції з клітинами *C. tropi- calis*. Зміна проникності мембран під дією Есулану, ймовірно, 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 призводять до затримки росту й онтогенетичного розвитку грибних культур, 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 наявні однакові ліпідні фракції, але в кількісному вмісті фракцій виявлені суттєві відмінності.

Перерозподіл загальних ліпідів під впливом Есулану має велике біоло-гічне значення для клітин *C. tropicalis*. Підвищення концентрації тригліце-ридів під впливом Есулану може вказувати на підвищення частки ліпідів, які

виконують 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.

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

Клас ліпідів	Контроль		Есулан		
	мкг/г дріжджів	%	мкг/г дріжджів	%	% 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
Метиллові ефіри жирних кислот і сквален	61,5±34,4	27,3	166,0±13,8	52,9	269,9

Саме зі стеролами пов'язаний механізм дії більшості антимікотиків. Ерго-стерол у клітинах грибів обов'язковий для проліферації, його зникнення може стати причиною зупинки росту культури. Крім того, ергостерол у ЦПМ грибів, як і холестерин у мембрані клітин ссавців, контролює плинність, цілісність і 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, контролюючи 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 через брак ергостеролу. Загибель клітин може відбуватися внаслідок повного пригнічення синтезу ергостеролу, але ймовірніше за все це через 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 %, зменшення концентрації фосфоліпідів — 47,4 % та моногліцеридів — 13 % і незначне 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 у структурі та функціях ЦПМ належить фосфоліпідам. Специфічний набір фосфоліпідів індукуює необхідну конформацію локалізованих у мембрані ферментів і забезпечує активність їх рецепторних областей. Склад фосфоліпідів впливає на структурну лабільність і проникність ЦПМ [10].

Враховуючи важливість фосфоліпідів у структурній організації мембран і участь у 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 призводить до зниження концентрації майже всіх класів фосфоліпідів порівняно з контрольними клітинами: 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 дріжджів	%	мкг/г дріжджів	%	% від контролю
Глікофосфоліпід	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 призводить 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 грибку клітину.

Література

1. Лубенець В.І. Хімія похідних тіосульфокислот: автореф. дис. ... док. хім. наук / В.І. Лубенець. — Л., 2006. — 20 с.
2. Яремкевич О.С. Вплив похідних тіосульфокислот на транспортні системи зародків холоднокровних / О.С. Яремкевич, М.В. Бура, С.М. Мандзинець та ін. // 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 / Н.С. Егоров. — М.: Наука, 2004. — 528 с.
6. Burke A. Cunha Antibiotic Essentials / Burke A. Cunha. — England: Jones and Barlett Learning; 12 edition, 2013. — 778 p.
7. Transformation of fatty acids catalyzed by cytochrome P450 monooxygenase enzymes of *Candida tropicalis* / W.H. Eschanfeldt, Y. Zhang, H. Samaha et al. // Applied and Environmental Microbiology. — 2003. — V. 69, # 10. — P. 5992—5999.
8. Козлов Л.И. Состав липидов микроорганизмов в зависимости от источников сырья и режимов культивирования: Микробиологическое производство: Обзор. информ./ Л.И. Козлов, Ю.Е. Казанцев, Е.С. Алентьева. — М.: ВНИИСЭТИИ Минмедпрома СССР, 1990. — Вып. 2. — 30 с.
9. Мысякина И.С. Исследование состава липидного гриба *Mucor* штамм ИНМИ в условиях задержки роста Нистатином / И.С. Мысякина, Н.С. Фунтикова // Микробиология. — 1991. — Т. 60, № 4. — С. 645—651.
10. Конев С.В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы / С.В. Конев. — Минск: Наука и техника, 1987. — 240 с.

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

С.А. Старовойтова

Национальный университет пищевых технологий

Л.Б. Орябинская

Национальный технический университет Украины «КПИ»

В.И. Лубенец

Национальный университет «Львовская Политехника»

*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 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: Эсулан, антимикотик, *Candida tropicalis*, липиды, цитоплазматическая мембрана.