УДК 615.282.012:582.288

STUDY OF POTENTIAL MECHANISM OF ACTION OF UKRAINIAN ANTIFUNGAL DRUG ESULANUM

S. Starovoitova
National University of Food Technologies
L. Oryabinska
National Technical University of Ukraine "KPI"
V. Lubenets
Lviv Polytechnic National University

Key words:
Esulanum
Antifungal drug
Candida tropicalis
Mechanism of action

Article history:
Received 21.02.2015
Received in revised form 21.03.2015
Accepted 16.04.2015

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 has been 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 showed that Esulanum does not affect the external polysaccharide profile of *C. tropicalis* cells. The increase of intracellular concentrations of all investigated micro-elements of *C. tropicalis* cells under the influence of Esulanum was demonstrated. A more detailed study of the mechanism of Esulanum action on yeast cell is planned in future experiments.

ВИВЧЕННЯ ПОТЕНЦІЙНОГО МЕХАНІЗМУ ДІЇ ВІТЧИЗНЯНОГО ПРОТИГРИБКОВОГО ПРЕПАРАТУ ЕСУЛАНУ

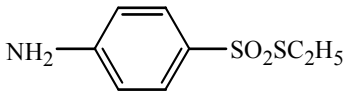
С.О. Старовойтова
Національний університет харчових технологій
Л.Б. Орябінська
Національний технічний університет України «КПІ»
В.І. Лубенець
Національний університет «Львівська Політехніка»

У статті вивчено потенційний механізм дії вітчизняного антимікотику Есулану на моделі дріжджів Candida tropicalis. Експериментально доведено, що Есулан у субфунгіцидній концентрації (125 мкг/мл) пригнічує синтез обох нуклеїнових кислот у клітинах C. tropicalis. Отримані ІЧ-спектри підтвердили, 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 дослідах.

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

Постановка проблеми. Есулан — S-етиловий естер параамінобензолтіосульфанілової 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 органічний 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 і 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, що використовуються як лікарські засоби, консерванти фруктів та овочів, засоби захисту рослин, рістрегулятори, біоциди, інсектициди, радіопротектори [1].

Мета статті. Дослідження потенційного механізму дії оригінального вітчизняного препарату Есулану на моделі дріжджів *Candida tropicalis*.

Матеріали і методи. Як тест-культуру використано дріжджовий гриб *C. tropicalis* з музею культур кафедри промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки НТУУ «КПІ». Визначення вмісту нуклеїнових кислот (НК) у клітинах дріжджів під впливом Есулану проводили спектрофотометрично за методикою Спіріна [3], розділення ДНК та РНК проводили методом Schmidt і Tannhauser [3].

Визначення впливу Есулану на полісахаридний профіль клітин *C. tropicalis* проводили методом ІЧ-спектроскопії [4] на спектрофотометрі FT-IR Spectrometr 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 за наявності Есулану, досліджували рентгено-флюоресцентним методом на рентгенофлуоресцентному 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 Стьюдента. Різницю вважали достовірною при значенні $P < 0,05$ [6].

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

Відома низка антимікробних препаратів, механізм дії яких пов'язаний з порушенням функції НК або ферментів, що беруть 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 і 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±0,01 мкг/мл та РНК — 49,74±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 раза, а для РНК — у 2,56 раза відповідно. Отже, для Есулану спостерігалося 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 й 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 і 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 — високогідратовані 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 важливу 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).

На всіх спектрограмах спостерігається широка смуга в області 1000—1170 $см^{-1}$, що відноситься до НК і вуглеводів, яка характеризується дуплетом з максимумами при 1050 $см^{-1}$, перший з них характеризує зв'язок Р-О-С. На фоні цієї смуги малоінтенсивні смуги при 1190 і 1160 $см^{-1}$, що відносяться до коливань Р-О-CH_3 та Р-О-C_2H_5 груп [5, 10].

Поглинання в області 1735 $см^{-1}$ характерне для ефірів жирних кислот. Смуги поглинання в області 1220—1260 $см^{-1}$ мають не стале положення і можуть відноситися до коливань ефірних зв'язків С-О-С (1250 $см^{-1}$), так і зв'язків О-Р (1222 $см^{-1}$) та О=Р (1255 $см^{-1}$), тому ідентифікацію ефірних груп проводили за смугою поглинання при 1735 $см_{-1}$. Усі спектри характеризуються інтенсивним поглинанням в області 1660—1500 $см^{-1}$. Перша з цих смуг відноситься до коливань подвійних зв'язків, а друга — до коливань С-N [10].

В усіх спектрах спостерігалося поглинання в області 970 $см^{-1}$, характерне для коливання зв'язків С=С у транс-положенні, і сліди поглинання в області 790 $см^{-1}$, властиве для зв'язків 1→3. Є низка смуг поглинання в спектрах, але інтерпретація їх в об'єктах, що містять домішки НК та білка, ускладнена.

Порівняння отриманих адсорбційних смуг (рис. 1) із смугами, що описані в літературі, дозволило припустити, що полісахариди клітин *C. tropicalis* являють 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 різним степенем ацетилування спиртових груп, а також частковим або повним окисленням альдегідних і 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, порівняно з вищими організмами, дихального ланцюга 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), й ті, що пригнічують окислювальне фосфорилювання [12].

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

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

Зразок	Концентрація наноатомів кисню, O_2/хв/мг білка	Пригнічення дихання, % від контролю
Клітини *C. tropicalis*	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 впливу спирту на дихання клітин, експеримент модифіковано і замість спиртового розчину Есулану використано водно-спиртовий розчин, оскільки повністю вилучити спирт неможливо, тому що препарат не розчиняється у воді. Використання водно-спиртового розчину показало пригнічення екзогенного дихання *C. tropicalis* на 81,8 %, що свідчить про виражений характер пригнічення ендогенного дихання клітин Есуланом.

Відомо, що зміна концентрації мікроелементів, зокрема іонів металів, у середовищі чинить суттєвий вплив на метаболізм мікроорганізмів, оскільки вони є інтегральними компонентами багатьох ферментів і 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 передусім алкогольдегідрогенеза, цитохроми, каталаза, аконітаза і фумараза.

Деякі хіміотерапевтичні препарати утворюють міцні сполуки з дво- та тривалентними металами (хелати). Ці реакції спричиняють інактивацію ферментів, що впливають на синтез білка. Пригнічення нітратредуктази під дією тетрациклінів пояснюється взаємодією з Mn^{2+}, а фосфорилування — з Mg^{2+}.

Іони магнію слугують кофакторами багатьох ферментів: синтетаз НК, ферментів, що беруть участь в активації амінокислот, гліколітичних ферментів, АТФ-аз тощо. Зв'язування Mg^{2+} виводить їх з реакції обміну, створюючи дефіцит, в результаті чого порушується функція клітинних мембран, стабілізація спіралі ДНК тощо. Деякі хіміотерапевтичні препарати роз'єднують окислювальне фосфорилування залежно від наявності K^+ [8]. Регуляторну роль у 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 у 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 мікроелемент і переносячи його всередину 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 у клітину одним із механізмів транспорту поживних речовин.

Таблиця 3. **Мікроелементний склад клітин *C. tropicalis*, вирощених з додаванням Есулану**

Елемент	Концентрація елементів в пробі, мкг/мл		
	Контроль	Есулан 125мкг/мл	% від контроля
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 порівняно з нормальною їх концентрацією може впливати на різні процеси по-різному, пригнічуючи та стимулюючи їх. Але як гіпер-, так і гіпофункції процесів, пов'язаних з життєдіяльністю клітин, призведе в результаті 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 у клітині.

Література

1. *Лубенець В.І.* Хімія похідних тіосульфокислот. Автореф. дис. ... док. хім. наук. — 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. *Химия* и биохимия нуклеиновых кислот / под ред. И.Б. Збарского и С.С. Дебова. — Л.: Медицина, 1968. — 429 с.

4. *Ефременко В.И.* Изучение полисахаридных комплексов методом инфракрасной спектроскопии / В.И. Ефременко, Е.П. Ефимцева // 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 / Н. Бейли. — М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. — 260 с.

7. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров. — М.: Наука, 2004. — 528 с.

8. *Cunha B.A.* Antibiotic Essentials. — England: Jones & Barlett Learn., 2013 — 778 p.

9. *Кольман Я.* Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.Г. Рем. — М.: Мир, 2000. — 469 с.

10. *Беллами Л.* Инфракрасные спектры сложных молекул / Л. Беллами. — М.: Мир, 1963. — 592 с.

11. *Звягильская Р.А.* Митохондрии дрожжей: отличительные свойства, вклад в решение общих проблем энергетики (Обзор) / Р.А. Звягильская // Прикладная биохимия и микробиология. — 1995. — Т. 31, № 1. — С. 50—59.

12. *Ильченко А.П.* Сравнительное изучение физиологических и биохимических особенностей двух штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica* при их выращивании на среде с этанолом / А.П. Ильченко, Е.А. Фаусек, Н.Н. Сингх и др. // Микробиология. — 1996. — Т.65, № 2. — С. 189—195.

13. *Яблочкова Е.Н.* Исследование активности ксилозоредуктазы и ксилитдегидрогеназы у дрожжей / Е.Н. Яблочкова, О.И. Болотникова, Н.П. Михайлова и др. // Микробиология. — 2003. —Т. 75, № 4. — С. 466—469.

14. *Яблочкова Е.Н.* Особенности ферментации D-ксилозы и D-глюкозы ксилозоассимилирующими дрожжами / Е.Н. Яблочкова, О.И. Болотникова, Н.П. Михайлова и др. // Прикладная биохимия и микробиология. — 2003. — Т. 39, № 3. — С. 302—306.

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОТИВОГРИБКОВОГО ПРЕПАРАТА ЭСУЛАНА

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. Экспериментально доказано, что Эсулан в субфунгицидной концентрации (125 мкг/мл) подавляет синтез обеих нуклеиновых кислот в клетках. Полученные ИК-спектры подтвердили, 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: *Эсулан, антимикотик, Candida tropicalis, механизм действия.*