

© Дудікова Д.М., Войчук С.І., Вринчану Н.О.

УДК: 579.23+615.282.84+547.435

Дудікова Д.М.¹, Войчук С.І.², Вринчану Н.О.¹

¹ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України", відділ фармакології протимікробних засобів (вул. Ежена Потье, 14, м.Київ, 03680, Україна); ²Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, відділ фізіології промислових мікроорганізмів (вул. Академіка Заболотного, 154, м. Київ, 03680, Україна)

УЛЬТРАСТРУКТУРА *CANDIDA ALBICANS* ПРИ ДІЇ 1-[4-(1-АДАМАНТИЛ)-ФЕНОКСИ]-3-(N-БЕНЗИЛ, N-ДИМЕТИЛАМІНО)2-ПРОПАНОЛ ХЛОРИДУ

Резюме. В статті представлені результати дослідження впливу похідного адамантану KBM-97 на ультраструктуру клітин дріжджоподібного гриба *Candida albicans*. Дослідження проведені з використанням методу трансмісійної електронної мікроскопії. Встановлено, що при дії сполуки в фунгіцидній концентрації вже через 1 год. спостерігаються зміни у цитоплазмі та у структурі мітохондрій, що свідчить про можливі порушення енергетичних процесів у клітинах грибів.

Ключові слова: похідне адамантану, *Candida albicans*, антифунгальна дія, ультраструктура.

Вступ

В теперішній час в усіх країнах світу відмічається збільшення кількості мікозів. В Україні впродовж 1980-1990 років кількість мікозів збільшилась більш ніж у 2 рази і продовжує зростати [Руденко и др., 2007]. Різноманітні патологічні стани здатні обумовити мікроміцети, дерматоміцети та дріжджоподібні гриби, зокрема представники роду *Candida*. Гриби *Candida spp.* є представниками нормальної мікробіоти, здатні колонізувати шкіру, шлунково-кишковий та уrogenітальний тракти, а при певних умовах (ендокринопатії, зловживання новоутворення; розповсюджені опіки та хірургічні втручання; застосування антибіотиків широкого спектра дії, глюкокортикостероїдів, імуносупресорів тощо) спричинити поверхневі (ураження слизових оболонок, шкіри та нігтів) та інвазивні мікози (кандидемія, гострий дисемінований кандидоз, кандидозний перитоніт, пневмонія та ін.). Летальність пацієнтів при інвазивних кандидозах може сягати 44,0-50,0%, при септицемії - до 80,0% [Елинов, 2001; Tortorano et al., 2004].

Пацієнтів з мікозами лікують згідно затверджених стандартів з урахуванням етіології, локалізації, форми та стадії мікотичного процесу. До складу схем лікування таких хворих входять і антифунгальні препарати (полієни, азоли, ехінокандіни, флюоропиримідини, алліламіни, морфоліни тощо) [Сергеев и др., 2003; Климко, 2008]. Але, не дивлячись на достатню кількість антифунгальних препаратів, проблема профілактики та лікування мікозів залишається актуальною. Основна причина недостатньої ефективності антифунгальних засобів - утворення та поширення резистентних до дії антимікотичних засобів мікроорганізмів.

Одним із шляхів подолання резистентності є створення нових ефективних лікарських препаратів. Джерелами отримання можуть бути речовини природного походження, продукти біотехнології, хімічна модифікація відомих антибіотиків, комбіноване використання лікарських засобів та синтез нових хімічних структур. У цьому плані на увагу заслуговують похідні адамантану, оскільки вони виявляють широкий спектр біологічної активності (анальгетична, протизапальна, імуномодулююча, психотропна, протівірусна), у тому числі

і антифунгальну дію [Финкельштейн и др., 2002; Вринчану, Максимов, 2003; Вринчану, 2006]. Наявність антифунгальної дії у похідних адамантану підтверджена і нашими дослідженнями щодо інгібуючої активності сполуки 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(N-бензил, N-диметиламіно)2-пропанол хлориду (шифр KBM-97) відносно широкого спектру грибів [Гриневич и др., 2011]. Так, МІК по відношенню до *C.albicans* складає 0,07мкг/мл, *C.tropicalis* та *C.glabrata* - 1,25 мкг/мл, *C.scottii* 0,3 мкг/мл.

Отримані дані свідчать про доцільність проведення поглиблених досліджень з метою встановлення механізму антифунгальної дії похідного 1-адамантанфенолу сполуки KBM-97.

Метароботи - виявити зміни ультраструктури *Candida albicans* при дії адамантанвмісної сполуки KBM-97.

Матеріали та методи

Антифунгальну активність похідного 1-адамантанфенолу визначали методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі Сабуро з використанням однідобової культури *Candida albicans* NCTC 885/653 [Вивчення специфічної активності ..., 2004]. Інгібуючу дію сполуки оцінювали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Щільність інокуляту складала 106 клітин/мл поживного середовища.

Для визначення змін ультраструктури грибів при дії похідного 1-адамантанфенолу використовували метод трансмісійної електронної мікроскопії. Тест-об'єктом в експериментах слугувала культура, вирощена на щільному середовищі Сабуро впродовж 18-24 год. при 35°C. Отриману культуру гриба *C.albicans* інкубували впродовж 1 год., 3 год., 6 год. та 24 год. у середовищі, яке містило сполуку KBM-97 в концентрації 2,0 МІК. Щільність інокуляту становила 105 кл/мл. Після закінчення терміну інкубації клітини відмивали 0,9% розчином натрію хлориду, отримували осад мікроорганізмів (центрифугування при 3000 об./хв. протягом 10 хв.) та здійснювали фіксацію сумішшю 2,5% глутарового альдегіду та 4,0% розчину формальдегіду, додатково фіксували 1,0% розчином тетрокису осмію на

фосфатному буфері (рН=7,4), зневоднювали у зростаючих концентраціях ацетону та полімеризували в смолі Ероне-812 [Bozzola, 2007]. Ультратонкі зрізи отримували, використовуючи ультрамікроскоп LKB-8800, які контрастували розчинами уранілу ацетату та цитрату свинцю [Ellis, 2007]. Зрізи аналізували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM-1400 (Jeol, Японія) при напрузі 80 кВ.

Результати. Обговорення

Отримані дані щодо ультраструктури інтактних грибів *C.albicans* свідчать, що клітини мали переважно подовжену форму, клітинна стінка двохшарова. Цитоплазма гранулярна, з незначним просвітленням в основному по периферії уздовж цитоплазматичної мембрани. Мітохондрії подовженої форми із кількома кристами низької електронної щільності та щільним внутрішнім

матриксом. В клітинах зустрічаються значні за розмірами поодинокі або невеликі і чисельні вакуолі, заповнені включенням низької електронної щільності. Ендоплазматичний ретикулум представлений кількома мембранними структурами ниткоподібної форми. Ядро поліморфне, часто повторює форму органел, що до нього примикають. Усі органели без ознак деструкції (рис. 1).

Через 1 год. експозиції зі сполукою КВМ-97 у концентрації 2,0 МІК (1,2 мкг/мл) цитоморфологічні зміни в клітинах *C.albicans* в основному були у характері однорідності цитоплазми: просвітлені ділянки з'являються по всій площині зрізу клітини (рис. 2). Такі ж зміни спостерігаються в клітинах дріжджоподібного гриба і через 3 год. інкубації з адамантанвмісною сполукою (рис. 3).

Після 6 год. культивування *C.albicans* зі сполукою

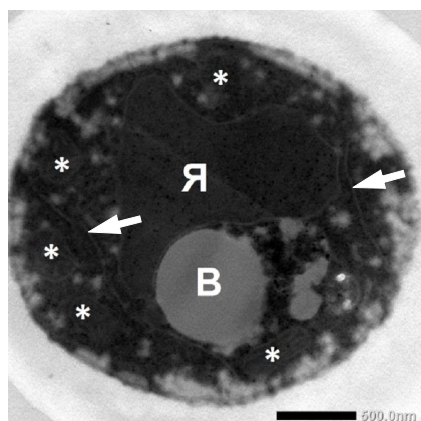


Рис. 1. Ультраструктура інтактних клітин *C.albicans*. Ядро (я), вакуоль (в), мітохондрії (*), стрілками вказаний ендоплазматичний ретикулум. Електронна мікроскопія. $\times 10000$.

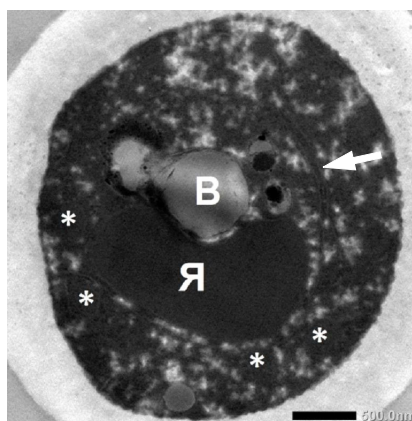


Рис. 2. Ультраструктурні зміни *C.albicans* після експозиції зі сполукою КВМ-97 впродовж 1 год. Ядро (я), вакуоль (в), мітохондрії (*), стрілками вказаний ендоплазматичний ретикулум. Електронна мікроскопія. $\times 8000$.

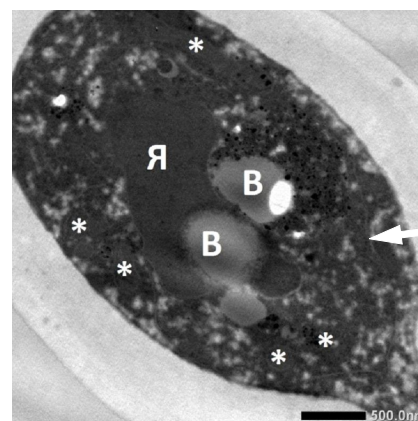


Рис. 3. Ультраструктурні зміни *C.albicans* після експозиції зі сполукою КВМ-97 впродовж 3 год. Ядро (я), вакуоль (в), мітохондрії (*), стрілками вказаний ендоплазматичний ретикулум. Електронна мікроскопія. $\times 8000$.

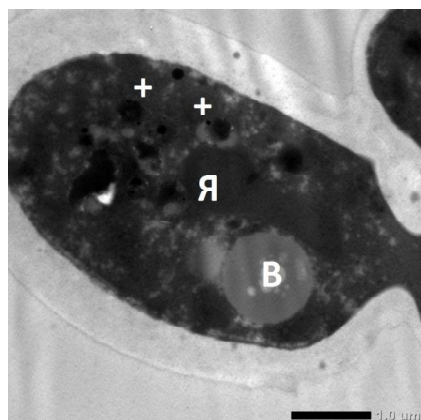


Рис. 4. Ультраструктурні зміни *C.albicans* після експозиції зі сполукою КВМ-97 впродовж 6 год. Ядро (я), вакуоль (в), дефектні мітохондрії (+). Електронна мікроскопія. $\times 5000$.

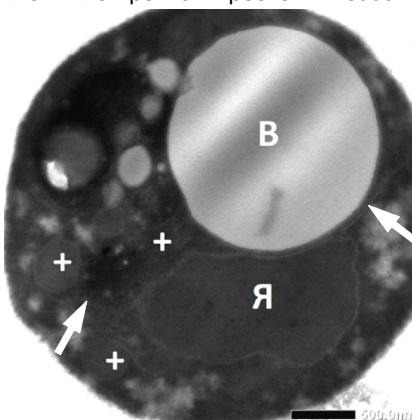


Рис. 5. Ультраструктурні зміни *C.albicans* після експозиції зі сполукою КВМ-97 впродовж 24 год. Ядро (я), вакуоль (в), дефектні мітохондрії (+), стрілками вказаний ендоплазматичний ретикулум. Електронна мікроскопія. $\times 8000$.

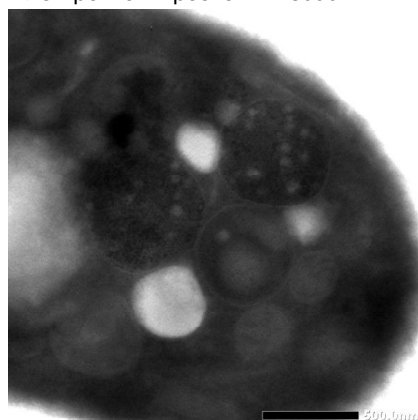


Рис. 6. Ультраструктурні зміни *C.albicans* після експозиції зі сполукою КВМ-97 впродовж 24 год. Електронна мікроскопія. $\times 12000$.

КВМ-97 відмічено зміни ультраструктури органел клітин, зокрема мітохондрії набували округлої форми і втрачали кристи (рис. 4). При цьому вакуолі, структури ендоплазматичного ретикулу та ядро не мали ознак зміненої морфології.

Збільшення часу інкубації до 24 год. призводило до збільшення кількості клітин із дефектними мітохондріями (рис. 5), а в ряді клітин спостерігали утворення чисельних везикул оточених подвійною мембраною, які містять органічні включення з різною електронною щільністю (рис. 6). В клітинах останнього морфотипу чітко оформлених органел не виявлено. Такі зміни є характерними ознаками розвитку процесу апоптозу.

Таким чином, проведені дослідження показали, що похідне адамантану КВМ-97 виявляє антифунгальну активність відносно дріжджоподібних грибів *C. albicans*. При дослідженні ультраструктури гриба за умови дії сполуки в фунгіцидній концентрації виявлені цитоморфологічні зміни, зокрема порушення ультраструктури органел, які реєструються вже через 1 год. впливу. При більш тривалій експозиції відбуваються зміни морфологічних особливостей структури мітохондрій. Отримані дані дають змогу припустити, що речовина КВМ-97 здатна викликати клітинну загибель шляхом апоптозу, який проявляється через 24 години впливу.

Загибель клітин реалізується через цитоплазму, яка першочергово реагує на присутність речовини, та мітохондрії, зміни яких, ймовірно, і запускають процеси апоптозу, оскільки інші структурні елементи клітин (клітинна стінка, ядро, вакуоль, ендоплазматичний ретикулум) не мали виразних цитоморфологічних змін.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Сполука 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(N-диметиламіно)2-пропанол хлорид виявляє антифунгальну активність, порушує ріст та розмноження грибів *C. albicans*.

2. У концентрації 2,0 МІК сполука КВМ-97 впливає на внутрішньоклітинні процеси, про що свідчать зміни структури цитоплазми та порушення ультраструктури органел, зокрема мітохондрій.

У подальшому необхідно визначити вміст ергостерину в клітинах грибів, з'ясувати вплив сполуки на функціонування цитоплазматичної мембрани та енергетичні процеси в клітинах мікроорганізмів, зокрема споживання кисню, функціонування дихального ланцюга, оскільки встановлення механізму дії сполуки є важливою складовою досліджень, які супроводжують розробку нового антимікробного препарату.

Список літератури

- Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: метод. рекомендації; під ред. Ю.Л. Волянського, Ш.С. Гриценко, В.П. Широкова та ін. - Київ, 2004. - 38с.
- Вринчану Н.О. Кандидозна інфекція. Антигрибкова активність нового похідного адамантану /Н.О.Вринчану, Ю.М.Максимов // Ліки.- 2003.- №5-6.- С.79-82.
- Врынчану Н.А. Терапевтическая эффективность 4-(адамантил-1)-1-(1-аминобутил)бензола при экспериментальной грибковой патологии / Н.А.Врынчану // Антибиотики и химиотерапия.- 2006.- Т.51, №11-12.- С.4-6.
- Гриневич С.В. Ингибирующее действие нового адамантансодержащего соединения ЮК-97 в отношении *Candida spp.* /С.В.Гриневич, Н.А.Врынчану, Ю.В.Короткий // Пробл. мед. микологии.- 2011.- Т.11, №2.- С.72.
- Елинов Н.П. *Candida species* и кандидемии. Состояние проблемы (обзор) / Н.П.Елинов // Пробл. мед. микологии.- 2001.- Т.3, №1.- С.4-15.
- Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение: рук. для врачей /Климко Н.Н.- [2-е изд. перераб. и доп.]- М.: Видеогрупп, 2008.- 336с.
- Онихомикоз. Диагностика, этиология, эпидемиология, лечение / [Руденко А.В., Коваль Э.З., Рыжко П.П., Заплавская Е.А.]- Киев: ЧП ВМБ, 2007.- 302с.
- Сергеев Ю.В. Фармакотерапия микозов / Ю.В.Сергеев, Б.И.Шригель, А.Ю.Сергеев.- М.: Медицина для всех, 2003.- 200 с.
- Финкельштейн Е.Е. Исследование биологической активности структурных аналогов адамантана /Е.Е.Финкельштейн, С.В.Курбатова, Е.А.Колосова // Вестник СамГУ. Естественно научная серия.- 2002.- №4 (26).- С.121-128.
- Bozzola J.J. Conventional specimen preparation techniques for transmission electron microscopy of cultured cells /J.J.Bozzola // Electron microscopy: methods and protocols; ed. John Kuo.- Totowa, NJ: Humana Press, 2007.- P.1-18.
- Ellis E.A. Poststaining grids for transmission electron microscopy /E.A.Ellis // Electron microscopy: methods and protocols; ed. John Kuo.- Totowa, NJ: Humana Press, 2007.- P.97-106.
- Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study /A.M.Tortorano, J.Peman, H.Bernhardt [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.- 2004.- Vol.23, №4.- P.317-322.

Дудикова Д.М., Войчук С.И., Врынчану Н.А.

УЛЬТРАСТРУКТУРА *CANDIDA ALBICANS* ПОД ДЕЙСТВИЕМ 1-[4-(1-АДАМАНТИЛ)-ФЕНОКСИ]-3-(N-БЕНЗИЛ, N-ДИМЕТИЛАМИНО)2-ПРОПАНОЛ ХЛОРИДА

Резюме. В статье представлены результаты исследования влияния производного адамантана КВМ-97 на ультраструктуру клеток дрожжеподобного гриба *Candida albicans*. Исследования проведены с использованием метода трансмиссионной электронной микроскопии. Установлено, что под действием соединения в фунгицидной концентрации уже через 1 ч. наблюдаются изменения в цитоплазме и в структуре митохондрий, что свидетельствует о возможных нарушениях энергетических процессов в клетках грибов.

Ключевые слова: производное адамантана, *Candida albicans*, антифунгальное действие, ультраструктура.

Dudikova D.M., Voychuk S.I., Vrynchanu N.O.

EFFECT OF 1-[4-(1-ADAMANTYL)-PHENOXY]-3-(N-BENZENE, N-DIMETHYLAMINO) 2-PROPANOL CHLORIDE ON THE *CANDIDA ALBICANS* ULTRASTRUCTURE

Summary. An effect of the adamantane KVM-97 derivative on the *Candida albicans* yeasts-like fungus cell ultrastructure is presented in the manuscript. The study was carried out with transmission electron microscopy. It was shown that the fungicidal concentration of compound caused changes of the ultrastructure of cytoplasm and mitochondria starting from 1 h of treatment, that indicates possible disorder in fungal cells energy process.

Key words: adamantane derivative, *Candida albicans*, antifungal action, ultrastructure.

Рецензент: д.мед.н., професор Шарикіна Н.І.

Стаття надійшла до редакції 11.06.2015 р.

Дудікова Дар'я Маратівна - мол. наук. сп. відділу фармакології протимікробних засобів ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАН України"; +38 044 456-83-32; dudikova@ift.org.ua

Войчук Сергій Іванович - к.біол.н., ст.наук.співроб. відділу фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України; +38 096 758-09-96; svoychuk@hotmail.com

Вринчану Ніна Олексіївна - д.мед.н., завідувач відділом фармакології протимікробних засобів ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАН України"; +38 044 456-78-62

© Калашніков А.В., Бруско А.Т., Кузів Є.Л., Вільцанюк О.О., Апуховська Л.І.

УДК: 616.72: 616.71-018.3: 615.357

Калашніков А.В.¹, Бруско А.Т.¹, Кузів Є.Л.⁴, Вільцанюк О.О.², Апуховська Л.І.³

¹ДУ "Інститут травматології та ортопедії НАН України" (вул. Воровського, 27, м.Київ, 04053, Україна); ³Інститут біохімії ім. В.О.Паладіна НАН України (вул. Леонтовича, 6, м.Київ, 01030, Україна); ²Вінницький національний медичний університет імені М.І.Пирогова (вул. Пирогова, 56, м.Вінниця, 21018, Україна); ⁴Військово-медичний клінічний центр Центрального регіону (вул. Свердлова, 185, м.Вінниця, 21021, Україна)

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ СУГЛОБОВОГО І ПРОКСИМАЛЬНОГО ЕПІФІЗАРНОГО ХРЯЩІВ ТА ДІАФІЗА СТЕГНОВОЇ КІСТКИ ЩУРІВ ПРИ КОРОТКОТРИВАЛОМУ ВВЕДЕННІ ПРЕДНІЗОЛОНУ

Резюме. В експерименті на 34 щурах лінії Вістар проведено вивчення морфологічних змін в кістковій тканині при введенні преднізолону короткотривалим курсом протягом 30 діб. В результаті проведених досліджень встановлено, що у тварин на фоні прийому преднізолону виникають дегенеративно-некротичні зміни в суглобовому та епіфізарному хрящах, у компактній та губчастій кістковій тканині епіфізу та метафізу. Ці зміни супроводжуються порушенням їх структур, сповільненням перебування компактною кістковою тканиною та росту кістки в довжину та її товщину.

Ключові слова: остеопороз, преднізолон, морфологічні зміни в кістковій та хрящовій тканині при прийомі преднізолону.

Вступ

Сучасні підходи до комплексного лікування різних патологічних станів пов'язані з прийомом глюкокортикоїдів. Поряд із позитивним впливом на перебіг основного захворювання такої терапії внаслідок прийому глюкокортикоїдів може виникати цілий ряд ускладнень, особливо при довготривалій гормонотерапії. Одним із таких ускладнень є остеопороз, який виникає внаслідок прийому глюкокортикоїдів [Беловол, Князькова, 2012]. Проблемі профілактики остеопорозу при прийомі глюкокортикоїдів присвячена велика кількість робіт, в яких вивчені механізми розвитку ускладнень, методи профілактики та їх лікування [Наумов, 2010; Дыдыкина, Алексеева, 2011]. Сьогодні в медичній практиці крім довготривалого призначення глюкокортикоїдів використовують призначення їх короткими курсами, але робіт щодо вивчення впливу на організм короткотривалого прийому глюкокортикоїдів обмаль. Тому виникла необхідність у вивченні впливу короткотривалого прийому глюкокортикоїдів на морфологічні зміни в кістковій та хрящовій тканині.

Мета дослідження - вивчити в експерименті морфологічні зміни в кістковій та хрящовій тканині при короткотривалому прийомі преднізолону.

Матеріали та методи

Експериментальні дослідження проведені у відповідності до основних біоетичних норм Гельсінської декларації про права людини та біомедицину (1975, 1977), Ванкуверської конвенції (1979, 1994) про біомедичні експерименти, відповідних положень ВООЗ, міжнародної ради медичних наукових товариств, міжнародного кодексу медичної етики (1983) та Закону України №3447-IV від 21.02.2006 р. "Про захист тварин від жорстокого поводження".

Експериментальні дослідження проведено на 34 щурах-самцях лінійної породи Вістар масою тіла 100,0±5,0г, які знаходились у віварії Інституту біохімії ім.В.О.Паладіна НАН України і утримувались відповідно до загальноприйнятих норм [Шалимов и др., 1989; Западнюк и др., 2003]. Перед проведенням дослідження відібрані для експерименту тварини знаходились 2 тижні на карантині на стандартному харчовому режимі віварію.

Експериментальні тварини були розділені на 2 серії дослідів. У 1 серії дослідів (контрольна) тваринам у шлунок за допомогою зонда вводили 0,5 мл води. В 2 серії дослідів (для визначення впливу преднізолону на зміни в організмі та його впливу на структурно-функціональну організацію тканинних структур кістки та суг-