

Н.О.Вринчану
О.В.Сергієнко
Ю.М.Максимов

ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України», м. Київ

Ключові слова: похідні адамантану, мікроорганізми, *Candida albicans*, клітинна оболонка.

Надійшла: 14.01.2009

Прийнята: 02.03.2009

УДК 542.272.37+616-092.7+579.23

ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕЯКИХ СТОРІН МЕХАНІЗМУ АНТИГРИБКОВОЇ ДІЇ НОВОГО ПОХІДНОГО АДАМАНТАНУ

Дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи "Встановити спектр антимікробної активності нових похідних аміноадмантану" (№ державної реєстрації 0106U000868).

Резюме. Механізм противірусної дії адамантан-вмісних препаратів обумовлений їх мембранотропними властивостями. Нами в скринінгових дослідженнях була виявлена сполука 4-адамантил-1-(1-амінобутил) бензол (шифр АМ-166) з широким спектром антимікробної дії. АМ-166 пригнічує ріст та розмноження бактерій (аеробних, анаеробних) та грибів (дріжджоподібних, пліснявих та дерматомицетів). На основі адамантан-вмісної речовини розроблена мазь для лікування гнійно-запальних процесів. Метою наших експериментів було вивчити деякі сторони механізму антигрибкової дії сполуки АМ-166 на ультрамікроскопічному рівні. Експерименти проведені по відношенню до *Candida albicans* NCTC885/653. Концентрація речовини складала 4 МПК. Ультратонкі зрізи, отримані на ультратомі LKB-880 U і контрастовані ацетатом уранілу та цитратом свинцю, досліджували в електронному мікроскопі EM-125 K. Встановлено, що сполука АМ-166 в концентрації 4 МПК спричиняє пошкодження клітинної оболонки та цитоплазматичних структур дріжджоподібного гриба *C.albicans*. Ці порушення реєструються з 1 год інкубації з речовиною АМ-166. Таким чином, проведені експерименти показали, що інгібуюча дія адамантан-вмісної речовини обумовлена, перш за все, впливом на клітинну мембрану гриба.

Морфологія. – 2009. – Т. III, № 2. – С. 24-27.

© Н.О.Вринчану, О.В.Сергієнко, Ю.М.Максимов, 2009

Vrynchanu N.A., Sergienko O.V., Maksimov Yu. N. Research of some sides of antifungal activity mechanism act of new adamantane derivative.

Summary. Mechanism of the antiviral action of adamantane-containing preparations caused by their membranotropic properties. In the screening studies we discovered the substance 4-adamantyl-1-(1-aminobutyl) benzene (substance AM-166) with the wide spectrum of antimicrobial action. AM-166 suppresses increase and multiplication of bacteria (aerobic, anaerobic) and fungi (yeast like, mold and dermatomyces). The ointment for treating the pyoinflammatory processes was developed on the basis of adamantane-containing substance. The purpose of our experiments was to learn some sides of the mechanism of the antifungal action of substance AM-166 at the ultramicroscopic level. Experiments were carried out on the *Candida albicans* NCTC885/653. Substance concentration was 4 MIC. Ultrathin sections obtained on the ultratome LKB-880 U and contrasted by acetate of uranyl and by citrate of lead, were investigated in the electron microscope EM-125 K. It is established, that the substance AM-166 in concentration 4 MIC causes the damage of cell wall and cytoplasmic structures of the yeast-like fungus of *C.albicans*. These disturbances were recorded after 1 h of incubation with the substance AM-166. Thus, our experiments showed that the inhibiting action of adamantane-containing substance is caused, first of all, by influence on the cellular membrane of fungus.

Key words: derivatives of adamantane, microorganisms, *Candida albicans*, cell wall.

Вступ

В медичній практиці для лікування та профілактики інфекційних захворювань застосовуються препарати різних хімічних класів, в тому числі і розроблені на основі похідних адамантану.

Адамантан-вмісні засоби застосовуються в основному для профілактики та лікування вірусних захворювань та хвороб нервової системи, тощо (Wang J. et al., 1997; Спасов А.А. та спі-

вавт., 2002). Дані літератури свідчать, що похідні адамантану є перспективним класом для пошуку сполук з антибактеріальними та протигрибковими властивостями (Calis U. et al., 2002; Вринчану Н.В. та співавт., 2004; Olson S. et al., 2005).

В скринінгових дослідженнях нами було виявлено сполуку 4-адамантил-1-(1-амінобутил) бензол (шифр АМ-166), яка виявляє виразні антибактеріальні та протигрибкові властивості. Речовина АМ-166 пригнічує ріст та розмноження

аеробних, анаеробних бактерій, дріжджоподібних, пліснявих грибів та дерматомицетів (Вринчану Н.О., 2007а; Вринчану Н.О. та співавт., 2007б). На основі сполуки АМ-166 нами розроблена мазь для лікування гнійно-запальних процесів.

Дослідження антимікробної активності методом мікрокалориметрії показало, що дія сполуки на мікробну клітину виявляється вже на 1 год та супроводжується зменшенням теплопродукції, тобто, може мати місце мембранотропний ефект (Вринчану Н.О. та співавт., 2007б).

Мета

Встановити вплив сполуки АМ-166 на ультраструктурну організацію мікроорганізмів.

Матеріали та методи

Експерименти проводили по відношенню до еталонного дріжджоподібного тест-штаму *Candida albicans* NCTC 885/653. 24-годинну культуру гриба, вирощеного на щільному поживному середовищі Сабуро, змивали стерильним 0,9 % розчином NaCl. Густина інокуляту складала 106 грибних елементів/мл середовища.

В пробірці з рідким поживним середовищем Сабуро вносили речовину АМ-166 в концентрації 4 МПК/мл (2,0 мкг/мл), гриби (106 грибних елементів/мл середовища) та інкубували в термостаті при 35° С. Через різні проміжки часу (1, 3 та 24 години) суміш центрифугували протягом 15 хв. при 1500 об./хв., отримували осад, фіксували 4 % розчином глутаральдегіду та тетроксиду осмію на фосфатному буфері (рН-7,4), зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації та поміщали в епоксидні смоли. Ультратонкі зрізи, отримані на ультратомі LKB-8800, контрастовані ацетатом уранілу і цитратом свинцю, досліджували та фотографували в електронному мікроскопі EM-125 K.

Результати та їх обговорення

Проведені експерименти показали, що в контролі (без сполуки АМ-166) клітини *C. albicans* через 1-3 год були схожими між собою за розмірами та структурою, виявляли ознаки дріжджової та міцеліальної фаз. Клітинна оболонка мала багат шарову будову, виявлялась не у всіх клітин достатньо чітко. Цитоплазма грибних клітин була гранулярна, з чітко диференційованими органелами та включеннями. В окремих випадках спостерігались міжклітинні контакти з формуванням псевдоміцелію (рис. 1, 2). Через 24 год поряд з грибними клітинами виявлялись псевдоконідії округлої або грушоподібної форми (рис. 3).

Через 1 год контакту *C. albicans* з речовиною АМ-166 в популяції переважали клітини з двококтурною оболонкою та зернистим вмістом (рис. 4).

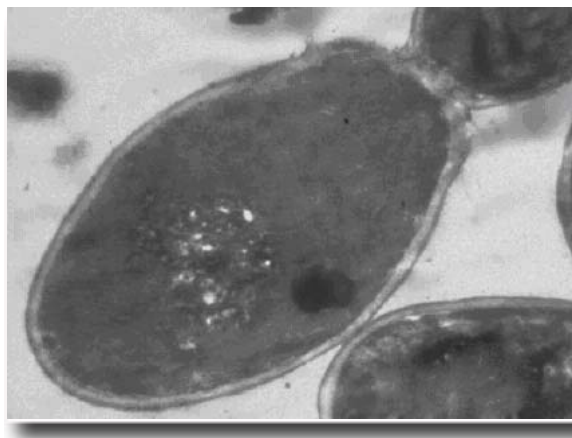


Рис. 1. Ультраструктура *C. albicans* (контроль, 1 год). ×8000.

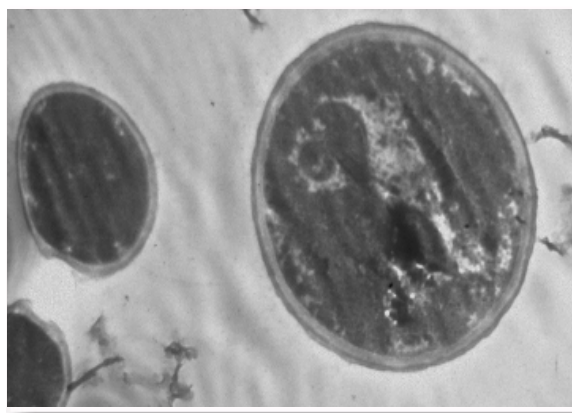


Рис. 2. Ультраструктура *C. albicans* (контроль, 3 год). ×4800.

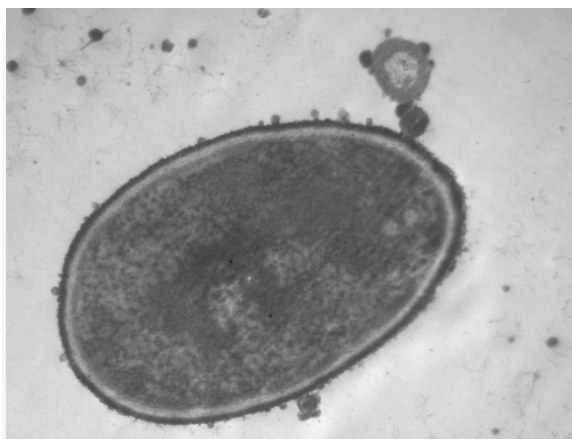


Рис. 3. Ультраструктура *C. albicans* (контроль, 24 год). ×12000.

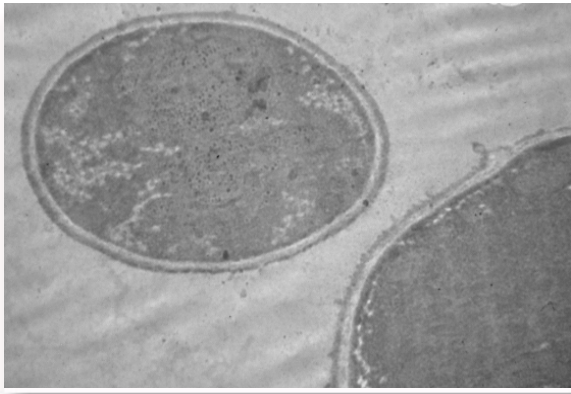


Рис. 4. Ультраструктура *Candida albicans* через 1 год експозиції з сполукою АМ-166. $\times 12000$.

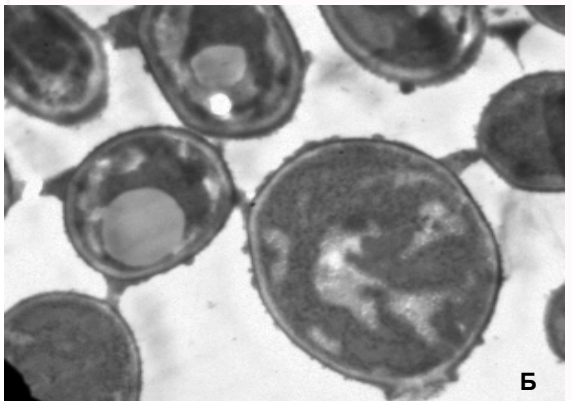
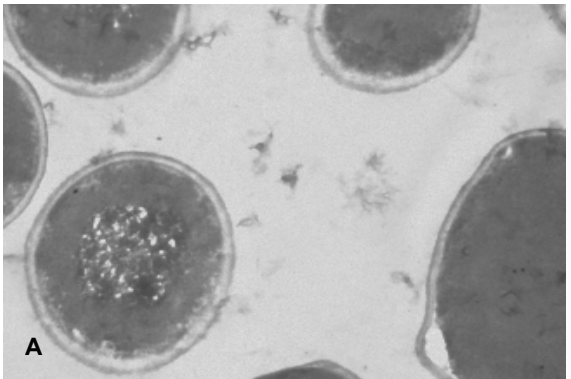


Рис. 5. Ультраструктура *Candida albicans* через 3 год експозиції з адамантан-вмісною сполукою. А – відшарування оболонки. $\times 6400$. Б- вакуолізація цитоплазми, розриви клітинної оболонки. $\times 6400$. В – дезінтеграція цитоплазми, зміна форми клітин. $\times 8000$.

Наприкінці третьої години експерименту ознаки ушкодження клітинної оболонки *C. albicans* посилювались: відмічались осередки відшарування клітинної стінки від цитоплазматичної мембрани (рис. 5А).

В більшості клітин при дії речовини на клітинній оболонці виявляються численні брилуваті осмофільні нашарування, реєструються розриви клітинної оболонки (рис. 5Б). Характер перебування оболонки, наявність на ній депозитів свідчать про мембранотоксичну дію, можливо взаємодію зазначених депозитів з некомпенсованими від'ємними зарядами клітинної поверхні. У деяких клітинах *C. albicans* через 3 год виявляються незворотні зміни (рис. 5, В).

Після 24-годинної дії вказаної сполуки, в популяції *C. albicans* відмічалась поява клітин з ознаками ущільнення та гомогенізації клітинної оболонки, яка втрачала багатошарову будову, виявляючись у вигляді гомогенного електроннощільного шару. В окремих клітинах цитоплазматичний матрикс просвітлювався, в інших з'являлись великокраплинні включення (рис. 6).

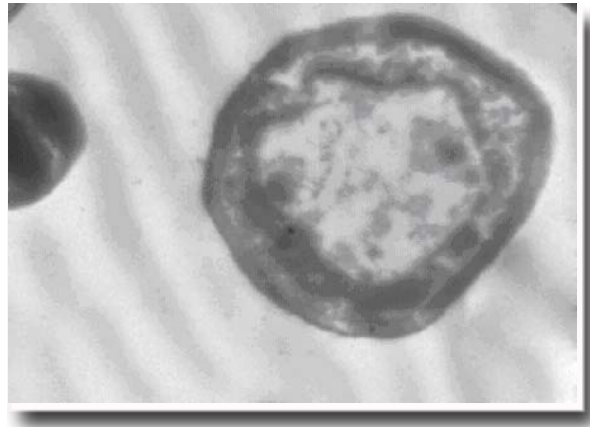


Рис. 6. Ультраструктура *Candida albicans* через 24 год експозиції з сполукою АМ-166. $\times 8000$.

Таким чином, проведені дослідження показали, що при дії адамантан-вмісної сполуки на *C. albicans*, в першу чергу, виявляються ушкодження клітинної оболонки (поява гомогенного електроннощільного шару, розриви зовнішньої мембрани) з наступною альтерацією цитоплазми та загибеллю клітин.

Підсумок

Сполука АМ-166 в концентрації 4 МПК справляє мембранотоксичну дію по відношенню до дріжджоподібного гриба *C. albicans*. Пошкодження клітинної мембрани виявляються на 1 год інкубації грибів з адамантан-вмісною речовиною.

Перспективи подальших рзробок

Встановлення механізму пригнічуючої дії має важливе значення при розробки на основі сполуки АМ-166 препаратів антимікробного

спрямування.

В подальшому необхідно вивчити вплив адамантан-вмісної речовини на мембранозв'язані

ферменти енергозабезпечення та обмінні процеси мікроорганізмів.

Літературні джерела

Взаємодія похідного адамантану з компонентами біомембран / Н. О. Вринчану, Г. Г. Горюшко, О. М. Величко, Ю. М. Максимов // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2007. - Т. 11, № 2/1. - С. 534-535.

Вринчану Н. О. Антибактеріальна дія 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензолу / Н. О. Вринчану // Мікробіологічний журнал. – 2007. - Т. 69, № 5. - С. 42–47.

Вринчану Н. О. Генералізована інфекція. Антимікробна активність нового похідного аміноадамантану / Н. О. Вринчану, Ю. М. Максимов // Медицина сьогодні і завтра. – 2004. - № 4. - С. 48-50.

Фармакологические и токсикологические свойства производных адамантана [обзор] / А. А. Спасов, Т. В. Хамидова, Л. И. Бугаева, И. С. Мо-

розов // Хим.-фарм. журнал. - 2002. - Т. 34, № 1.- С. 3-8.

In vitro antitumor and antimicrobial activities of N-substituents of maleimide by adamantane and diamantine / J. Wang, S. Wang, C. Lee [et al.] // Chemotherapy. - 1997. – Vol. 43, № 3. - P. 182–189.

Olson S. Adamantyl triazoles as selective inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type / S. Olson, S. Aster, K. Brown // Bioorganic and medicinal chemistry letters. - 2005. – Vol. 15, № 19. - P. 4359–4362.

Synthesis and antimicrobial activity evaluation of some new adamantane derivatives. / U. Calis, M. Yarim, M. Koksal, M. Ozalp // Arzneimittelforschung. - 2002. - Vol. 52, № 10. - P. 778-781.

Вринчану Н.А., Сергиенко О.В., Максимов Ю.Н. Исследование некоторых сторон механизма антигрибкового действия нового производного адамантана.

Резюме. Механизм противовирусного действия адамантан-содержащих препаратов обусловлен их мембранотропными свойствами. Нами в скрининговых исследованиях было обнаружено соединение 4-адамантил-1-(1-аминобутил) бензол (шифр АМ-166) с широким спектром антимикробного действия. АМ-166 угнетает рост и размножение бактерий (аэробных, анаэробных) и грибов (дрожжеподобных, плесневых и дерматомицетов). На основе адамантансодержащего вещества разработана мазь для лечения гнойно-воспалительных процессов. Целью наших экспериментов было изучить некоторые стороны механизма антигрибкового действия соединения АМ-166 на ультрамикроскопическом уровне. Эксперименты проведены по отношению к *Candida albicans* NCTC885/653. Концентрация вещества составляла 4 МПК. Ультратонкие срезы, полученные на ультратоме LKB-880 U и контрастированные ацетатом уранила и цитратом свинца, исследовали в электронном микроскопе ЭМ-125 К. Установлено, что соединение АМ-166 в концентрации 4 МПК вызывает повреждение клеточной оболочки и цитоплазматических структур дрожжеподобного гриба *C.albicans*. Эти нарушения регистрируются с 1ч инкубации с веществом АМ-166. Таким образом, проведенные эксперименты показали, что ингибирующее действие адамантан-содержащего вещества обусловлено, прежде всего, влиянием на клеточную мембрану гриба.

Ключевые слова: производные адамантана, микроорганизмы, *Candida albicans*, клеточная оболочка.