

SYNERGISTYCZNE DZIAŁANIE FLUKONAZOLU I LAKTONÓW FTALIDOWYCH JAKO CZYNNIK OGRANICZAJĄCY STOSOWANIE LEKÓW AZOLOWYCH W LECZENIU KANDIDOZ

SYNERGISTIC EFFECT OF FLUCONAZOLE AND PHTALIDE LACTONES AS A FACTOR LIMITING THE USE OF AZOLE DRUGS AGAINST CANDIDIASIS

Teresa Olejniczak

*Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
ul. C. K. Norwida 25,
50-375 Wrocław
e-mail: teresa.olejniczak@upwr.edu.pl*

Abstract

1. Wprowadzenie

- 1.1. *Candida albicans* jako czynnik potencjalnie zakaźny
- 1.2. Farmakologiczne zastosowanie flukonazolu i związane z nim ryzyko
- 1.3. Laktony ftalidowe, izolowane z roślin z rodziny *Apiaceae* Lindl
- 1.4. Mechanizm działania 3-n-butyloftalidu na komórki *Candida albicans*
2. Synergistyczne działanie flukonazolu i laktonów ftalidowych wobec *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. guilliermondii* KKP 3390
3. Studia *in silico* w analizie wpływu struktury chemicznej na aktywność biologiczną

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Prof. dr hab. Teresa Olejniczak ukończyła studia chemiczne na Uniwersytecie Wrocławskim. Od 1991 roku jest zatrudniona na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Pracę doktorską pt. „Chemiczna i mikrobiologiczna synteza laktonów” obroniła 1998 przed Radą Wydziału Uniwersytetu Wrocławskiego, uzyskując stopień doktora nauk chemicznych w zakresie chemii organicznej. Promotorem pracy był profesor dr hab. Czesław Wawrzeńczyk. Odbyła roczny staż na Uniwersytecie w Gandawie (Belgia) w zespole prof. J. Van Beeumena, zapoznając się z wieloma technikami biologii molekularnej. W 2011 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego, a w 2019 roku nadano jej tytuł profesora nauk biologicznych. Jej badania naukowe mają charakter interdyscyplinarny i obejmują syntezę chemiczną, enzymatyczne i mikrobiologiczne transformacje związków chemicznych oraz ocenę ich aktywności biologicznej.



<https://orcid.org/0000-0001-6156-5820>

ABSTRACT

The resistance of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts to azole antifungal drugs has increased rapidly in recent years and is a significant problem in clinical therapy. The current state of pharmacological knowledge precludes the withdrawal of azole drugs, as no other active substances have yet been developed that could effectively replace them. Therefore, one of the anti-yeast strategies may be therapies that can rely on the synergistic action of natural compounds and azoles, limiting the use of azole drugs against candidiasis. Synergy assays performed *in vitro* were used to assess drug interactions Fractional Inhibitory Concentration Index. The synergistic effect of fluconazole (1) and three synthetic lactones identical to those naturally occurring in celery plants—3-n-butylphthalide (2), 3-n-butylidene-phthalide (3), 3-n-butyl-4,5,6,7-tetrahydrophthalide (4)—against *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, and *C. guilliermondii* KKP 3390 was compared with the performance of the individual compounds separately. MIC₉₀ (the amount of fungistatic substance (in µg/mL) inhibiting yeast growth by 90%) was determined as 5.96–6.25 µg/mL for fluconazole (1) and 92–150 µg/mL for lactones 2–4. With the simultaneous administration of fluconazole (1) and one of the lactones 2–4, it was found that they act synergistically, and to achieve the same effect it is sufficient to use 0.58–6.73 µg/mL fluconazole (1) and 1.26–20.18 µg/mL of lactones 2–4. Based on biological research, the influence of the structure on the fungistatic activity and the synergistic effect were determined.

Keywords: synergistic effect, *Candida albicans*, phthalide lactones, fluconazole

Słowa kluczowe: efekt synergistyczny, *Candida albicans*; laktony ftalidowe; flukonazol

1. WPROWADZENIE

1.1. *Candida albicans* jako czynnik potencjalnie zakaźny

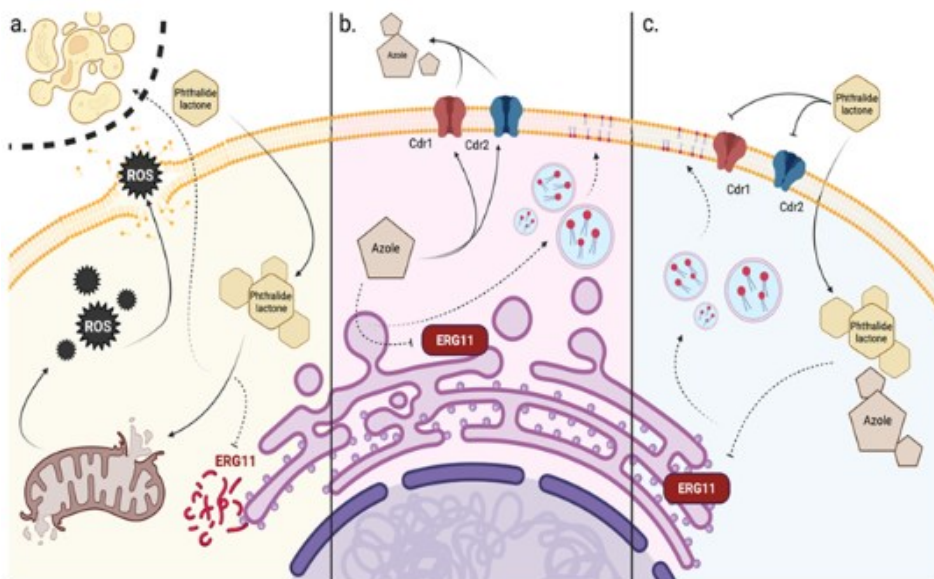
Kandydoza jest infekcją wywołaną zarówno przez *Candida albicans*, jak i gatunki *Candida non-albicans* (NAC). Infekcje te są najczęściej endogennie, ponieważ głównym źródłem zakażenia jest przewód pokarmowy [1, 2]. Inwazyjne procedury medyczne stwarzają możliwość przenoszenia zakażenia z człowieka na człowieka w środowisku szpitalnym. *C. albicans* i *C. glabrata* są obecnie najczęstszymi patogenami grzybiczymi u ludzi. W Stanach Zjednoczonych w latach 2013-2017 [3] drożdżaki *Candida* były odpowiedzialne za jedną czwartą zgonów spowodowanych przypadkami fungemi w szpitalach. Drożdże z rodzaju *Candida* odpowiadają za kandydozę rozsianą, kandydozę wewnątrznaczyniową, a nawet infekcje ośrodkowego układu nerwowego. W krajach wysoko rozwiniętych, takich jak USA, Norwegia czy Wielka Brytania, coraz częściej obserwuje się wzrost śmiertelności z powodu ogólnego zakażenia oportunistycznymi szczepami *Candida* [4, 5]. Przewiduje się, że 75% kobiet na całym świecie zachoruje na kandydozę przynajmniej raz w życiu. Problem ten z roku na rok staje się coraz poważniejszy i stanowi niepokojące zagrożenie dla zdrowia publicznego, dlatego tak ważne jest podjęcie działań w kierunku jego ograniczenia [6].

1.2. Farmakologiczne zastosowanie flukonazolu i związane z nim ryzyko

Wiadomo, że flukonazol jest jednym z najczęściej stosowanych leków w terapii kandydozy [7]. Jest związkiem należącym do grupy azoli. Lek ten hamuje wzrost większości drożdżaków *Candida*, *Cryptococcus* i innych dermatofitów odpowiedzialnych za ogólnoustrojowe i powierzchniowe zakażenia grzybicze u ludzi. W farmakologii jest stosowany jako lek pierwszego wyboru od 1990 roku.

Flukonazol, ze względu na obecność w swojej strukturze dwóch triazoli oraz pierścienia difluorofenyloвого, zaburza syntezę steroli [8]. Przy dłuższej terapii stosowanie flukonazolu może prowadzić do hepatotoksyczności, co stanowi istotny problem dla osób z obniżoną odpornością i immunosupresją. Najbardziej narażone grupy stanowią pacjenci z AIDS, w trakcie chemioterapii oraz osoby z chorobami układu oddechowego, w tym z ostrym COVID-19 [9-11]

1.3. Mechanizm działania flukonazolu na komórki drożdżaków z rodzaju *Candida*
Mechanizm działania flukonazolu opiera się na hamowaniu aktywności produktu genu *ERG11*, zaangażowanego w biosyntezę ergosterolu. Enzym 14 α -lanosterolu odpowiada za konwersję lanosterolu do 4,4-dimetylocholesta-8(9), 14,14-trien-3 β -olu, ważnego etapu biosyntezy steroli. Hamowanie syntezy ergosterolu zwiększa przepuszczalność błony komórkowej, ponieważ jest on kluczowym jej składnikiem. Zaburzenie biosyntezy ergosterolu powoduje także gromadzenie się toksycznych 14-metylosteroli w komórkach grzybów. W związku z tym zaburzona jest również synteza wybranych komponentów ściany komórkowej oraz adhezja komórek. Działanie to ma charakter grzybostatyczny [12–16] (Rys. 1b).



Phthalide lactone -lakton ftalidowy; azole- związki azolowe, ROS- reaktywne formy tlenu (RFT)

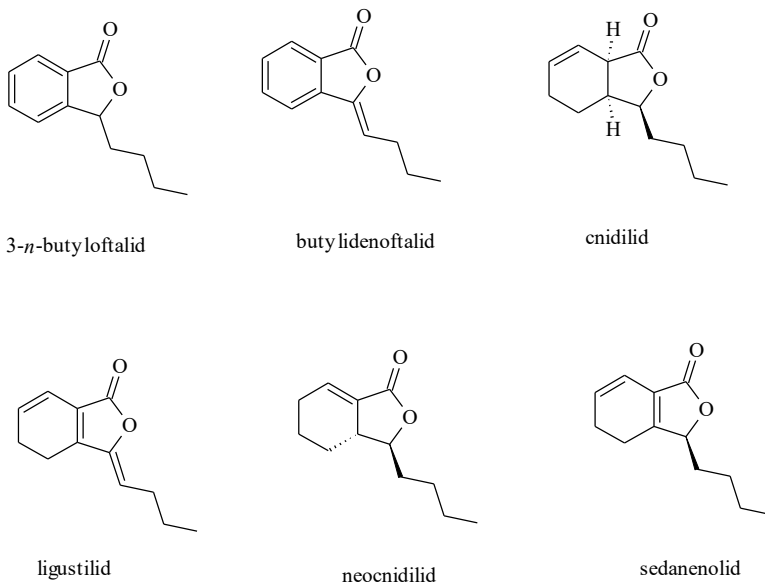
Rysunek 1. (a) Mechanizm działania 3-butyloftalidu na metabolizm komórek drożdży (b) Mechanizm działania związków azolowych na komórki drożdży (c). Mechanizm synergistycznego działania związków azolowych i laktonów ftalidowych. (utworzony w BioRender).

Figure 1. (a) Mechanism of action of 3-butylphthalide on yeast cell metabolism (b) Mechanism of effect of azole compounds on yeast cell (c). Mechanism of synergistic action of azole compounds and phthalide lactones. (created in BioRender).

Fenotypy oporności u szczepów z rodzaju *Candida* najczęściej generują związki azolowe stosowane w medycynie i ochronie roślin [17]. Istnieje kilka mechanizmów oporności szczepów *Candida* na leki azolowe. Pierwszy z nich jest związany z nadekspresją genów kodujących białka z rodziny ABC transporterów w komórce grzyba, dzięki którym lek może zostać usunięty z komórki i jego działanie jest ograniczone. Wpływ na ekspresję genów *CDR1/CDR2* i *MDR1* niewątpliwie mają mutacje punktowe w genach, pod których kontrolą znajdują się te transportery [18, 19] (Rys. 1b). Innym mechanizmem prowadzącym do lekooporności są mutacje w genie *ERG11*, którego produkt jest celem działania leków azolowych. Mutacje zmieniają miejsce wiązania azolu i obniżają skuteczność leku [20]. Badania *in vitro* wykazały, że w szczepach *C. albicans* oprócz zwiększonego poziomu ekspresji genu występują mutacje punktowe w genie *ERG11*. Są to mutacje typu substytucji w pozycjach 143 (zamiana lizyny na argininę), 266 (zamiana kwasu glutaminowego na kwas asparaginowy), 404 (zamiana waliny na leucynę) oraz 488 (zamiana waliny na izoleucynę). W izolowanych szczepach *C. albicans*, odkryto zmianę konformacyjną 14 α -demetylasy lanosterolu, która zmniejsza skuteczne wiązanie cząsteczek flukonazolu, osłabiając jego działanie [20]. Komórki grzybów mogą również być zdolne do rozwijania alternatywnych szlaków syntezy ergosterolu, na które nie wpływają leki azolowe. W związku z tym skuteczność leku jest obniżona, a grzyby zachowują funkcjonalność błon komórkowych. Ze względu na coraz częstsze nabywanie lekooporności przez szczepy grzybów, w wielu ośrodkach naukowych prowadzi się badania nad nowymi lekami azolowymi, o zmienionej strukturze chemicznej i właściwościach fizykochemicznych, na które grzyby nie są odporne [3, 21, 22].

1.3. Laktony ftalidowe, izolowane z roślin z rodziny Apiaceae Lindl

Laktony ftalidowe, uważa się za główne składniki odpowiedzialne za bioaktywność roślin z rodziny Apiaceae. Obecnie, opisano około 180 naturalnie występujących ftalidów wyizolowanych z około 137 roślin [23-26]. Popularnie stosowane w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej rośliny z tej rodziny zawierają ich mieszaniny w różnych ilościach. *Angelica sinensis* zawierająca 27 ftalidów, stosowana jest głównie w zaburzeniach ginekologicznych takich jak nieregularne czy bolesne miesiączki, a także w przypadku ich braku. Ekstrakty z *Ligusticum chuanxiong* zawierające 36 różnych ftalidów są natomiast stosowane podczas migren oraz bólów głowy. Obie te rośliny stosuje się również w przypadku astmy [27-28]. Zarówno wyizolowane i oczyszczone ftalidy, jak i ekstrakty z roślin z rodziny Apiaceae wykazują szeroką aktywność biologiczną, w tym również silne działanie grzybobójcze [29]. Na Rysunku 2 przedstawiono przykładowe struktury laktonów występujących w roślinach z rodziny Apiaceae.



Rysunek 2. Struktury laktonów występujących w roślinach z rodziny Apiaceae
Figure 2. Structures of lactones found in plants of the Apiaceae family

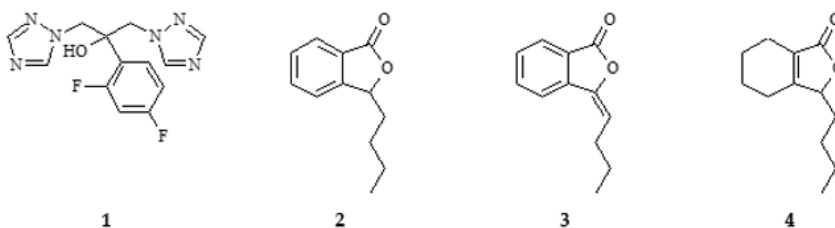
Najbardziej znanym i najczęściej opisywanym ftalidem jest 3-n-butyloftalid, naturalny związek zatwierdzony przez Chińską Narodową Administrację Produktów Medycznych, wykorzystywany do leczenia udaru niedokrwiennego mózgu [30–34]. Wieloletnie badania wykazały, że 3-butyloftalid działa neuroprotekcynie w stanach niedokrwiennych i zmniejsza obrzęk mózgu, poprawiając mikrokrążenie w obszarze niedokrwienia. Wykazano również, że hamuje on stres oksydacyjny i apoptozę komórek nerwowych [35–38].

1.4. Mechanizm działania 3-n-butyloftalidu na komórki *Candida albicans*

Obecność 3-n-butyloftalidu w cytozolu (Ryc. 1a) generuje w komórce większą ilość reaktywnych form tlenu (RFT) tworzonych w mitochondrium. Ilość RFT wyznacza się poprzez pomiar potencjału błony mitochondrialnej ($\Delta\psi_m$). Nagromadzenie RFT przyczynia się do zniszczenia błony mitochondrium i uwolnienia dużych ilości reaktywnych form tlenu do cytozolu. RFT zaburza homeostazę komórkową, oddziałuje negatywnie na kwasy nukleinowe, hamują aktywność enzymów oraz powoduje peroksydację lipidów. Wszystkie te procesy prowadzą do zniszczenia błony komórkowej i inicjują proces apoptozy. Ponadto, 3-n-butyloftalid wpływa na ograniczenie ekspresji genów *CDR1* i *CDR2*, powstaje mniej pomp transportujących, co przyczynia się do kumulacji 3-n-butyloftalidu wewnątrz komórki ($\log P = 2,8$) [33, 39, 40].

2. SYNERGISTYCZNE DZIAŁANIE FLUKONAZOLU I LAKTONÓW FTALIDOWYCH WOBEC *CANDIDA ALBICANS* ATCC 10231, *C. ALBICANS* ATCC 2091, *C. GUILLERMONDII* KKP 3390

Do testów użyto flukonazolu (1) i trzech syntetycznych racemicznych laktonów o strukturach identycznych z naturalnie występującymi w roślinach selerowatych:– 3-n-butyloftalidu (2), 3-n-butyldenofthalidu (3), 3-n-butylo-4,5,6,7-tetrahydroftalidu (4) (Rys. 3). Laktony 2-4 syntezowano według metody opisanej przez A. Leon i inni [22].



Rysunek 3. Struktury chemiczne: flukonazol (1), 3-n-butyloftalid (2), 3-n-butyldenofthalid (3), 3-n-butylo-4,5,6,7-tetrahydroftalid (4)

Figure 3. Chemical structures of: fluconazole (1), 3-n-butylphthalide (2), 3-n-butylidenephthalide (3), 3-n-butyl-4,5,6,7-tetrahydrophthalide (4)

Istnieją trzy rodzaje interakcji między związkami biologicznie czynnymi: synergia, działanie neutralne i antagonizm. Można określić je wyznaczając frakcjonalne stężenie hamujące (FIC). Współczynnik ten pozwala określić charakter interakcję między związkami obecnymi w mieszaninie.

$$FIC = \frac{MIC_A \text{ w mieszaninie}_{AB}}{MIC_A} + \frac{MIC_B \text{ w mieszaninie}_{AB}}{MIC_B}$$

Obliczany jest on w oparciu o minimalne stężenia hamujące MIC wyznaczone dla składników oddzielnie i w mieszaninach. W oparciu o stopień zahamowania można dla każdego związku wyznaczyć MIC_{50} (MIC_{90}) czyli stężenie związku hamujące wzrost i proliferację komórek mikroorganizmu w 50% (90%).

$$\text{Stopień zahamowania wzrostu (\%)} = \frac{OD_{\text{kontroli}} - OD_{\text{badanego związku}}}{OD_{\text{kontroli}}} \times 100\%$$

OD_{kontroli} – gęstość optyczna wyznaczona dla hodowli mikroorganizmu bez dodatku związku

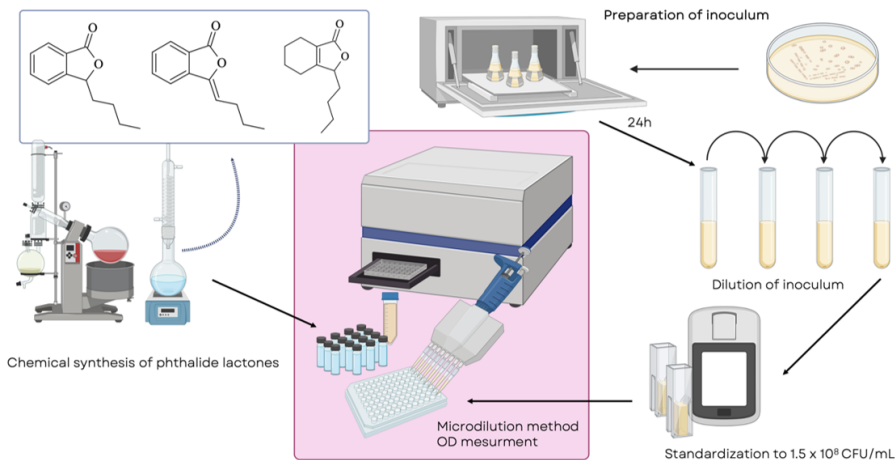
$OD_{\text{badanego związku}}$ – gęstość optyczna wyznaczona dla hodowli z dodatkiem badanego związku

Synergizm ($\Sigma FIC \leq 0,5$) to stan, w którym dwa istniejące związki poprzez wspólne występowanie w mieszaninie wzajemnie wzmacniają swoje działanie, a tym samym ich łączny efekt jest większy niż suma efektów ich osobnego działania.

Najczęściej obserwuje się jednak działanie neutralne, czyli takie, w którym obecność obu związków nie wpływa na komórki w układzie ($0,5 < \Sigma FIC \leq 4,0$). Z kolei, gdy $\Sigma FIC > 4,0$, występuje antagonizm, czyli stan, w którym dwa istniejące związki przez wspólne występowanie w mieszaninie wzajemnie osłabiają swoje działanie. Ich łączny efekt jest zatem mniejszy niż suma efektów ich oddzielnych działań [41].

Aby określić interakcje między flukonazolem a laktonami **2-4**, przeprowadzono testy na dwóch szczepach referencyjnych *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091 oraz szczepie *C. guilliermondii* KKP 3390. Równocześnie wyznaczano wartości MIC₅₀, MIC₉₀ (minimalne stężenia hamujące wzrost i proliferację komórek w 50% i 90%) dla związków **1-4** oddzielnie (Tabela 1) i mieszaninach flukonazolu z poszczególnymi laktonami **2-4** (Tabela 2).

W tym celu wykorzystano opisany wcześniej w literaturze protokół szachownicy [42].



Rysunek 4. Ilustracja eksperymentu oznaczania aktywności biologicznej laktonów ftalidowych. (utworzony w BioRender)

Figure 4. Illustration of an experiment to determine the biological activity of phthalide lactones (created in BioRender)

Przed przeprowadzeniem testów flukonazol (**1**) i laktony **2-4** rozpuszczono w DMSO w stężeniu 10 mg/mL dodano do 96-dółkowej płytki titracyjnej i rozcieńczono metodą podwójnych rozcieńczeń w celu uzyskania kombinacji obu związków w różnych stężeniach. Następnie dodano standaryzowane inokulum jednego z trzech testowanych mikroorganizmów: *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. guilliermondii* KKP 3390. Przygotowane w ten sposób płytki umieszczono w inkuba-

torze do osiągnięcia gęstości optycznej ($OD = 1$). Uzyskane wartości OD pozwoliły na wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego poszczególnych kombinacji flukonazolu i laktonu oraz frakcjonalnego stężenia hamującego (FIC) określającego ilościowo interakcję między związkami obecnymi w mieszaninie) (Rys. 4, Tabela 1, 2).

Tabela 1. Eksperymentalne określenie działanie fungistatycznego flukonazolu (1) i laktonów 2-4 wobec *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. guilliermondii* KKP 3390. Wartości MIC podano w $\mu\text{g/mL}$

Table 1. Experimentally determined fungistatic activity of fluconazole (1) and 2-4 lactones against *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. guilliermondii* KKP 3390. MIC values are in $\mu\text{g/mL}$

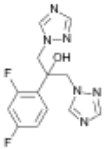
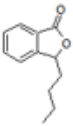
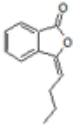
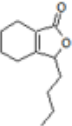
		Związki			
					
		1	2	3	4
Testowane szczepy					
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	MIC ₅₀	1,56	45,55	48,90	62,72
	MIC ₉₀	6,25	137,72	150,12	150,0
<i>C. albicans</i> ATCC 2091	MIC ₅₀	2,19	30,79	17,61	20,10
	MIC ₉₀	5,57	92,34	110,0	120,10
<i>C. guilliermondii</i> KKP 3390	MIC ₅₀	-	55,0	36,96	46,15
	MIC ₉₀	$\geq 18,00$	80,0	58,95	80,34

Tabela 2. Wyznaczenie MIC w kombinacji i wartości FIC dla laktonów 2,3,4 i flukonazolu w systemie hodowlanym *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. guilliermondii* KKP 3390. Wartości MIC podano w $\mu\text{g/mL}$

Table 2. Determination of the MIC in the combination and the FIC values for the lactones 2,3,4 and fluconazole in *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. guilliermondii* KKP 3390 culture system. MIC values are in $\mu\text{g/mL}$

Związek	ATCC 10231				ATCC 2091				KKP 3390			
	MIC _{mieszaniwy}		FIC		MIC _{mieszaniwy}		FIC		MIC _{mieszaniwy}		FIC	
	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%
1	0,78	1,56			0,78	1,56			1,56	0,78		
2	0,78	3,13	1,41	0,27	25	25	1,17	0,50	3,13	1,26	0,31	0,28
1	0,62	1,59			0,55	1,41			1,27	0,58		
3	1,20	4,47	0,42	0,28	3,72	22,25	0,42	0,47	4,32	20,18	0,32	0,35
1	0,42	1,43			0,70	1,48			1,22	6,73		
4	1,32	15,27	0,41	0,34	4,45	20,27	0,55	0,49	11,58	24,86	0,43	0,65

Ocena działania przeciwwgrzybiczego *in vitro* wykazała, że laktony ftalidowe mają niższą aktywność grzybobójczą niż flukonazol (Tabela 1), a badane szczepy nie wykształciły mechanizmów oporności na azole. W przypadku laktonów ftalidowych zaobserwowano 50% zahamowanie wzrostu mikroorganizmów przy stężeniach w zakresie 30,79–62,72 µg/mL. Jednak 3-n-butyliidenoftalid (3), posiadający podwójne wiązanie przy C-3, wykazuje wysoką aktywność wobec szczepu *C. albicans* ATCC 2091; zahamowanie wzrostu tego organizmu w 50% uzyskano przy stężeniu 17,61 µg/ml. Stężenie potrzebne do uzyskania 50% redukcji wzrostu szczepu *C. guilliermondii* KKP 3390 wynosiło z kolei około 37 µg/ml. Zahamowanie wzrostu grzybni o 90% wymagało 3-4-krotnego wzrostu stężenia flukonazolu i laktonów 2-4 w testach wobec *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091 i mniej niż dwukrotności dawki związków 1-5, potrzebnej do redukcji wzrostu grzybni o 50%, w przypadku *C. guilliermondii* KKP 3390. We wszystkich testach zaobserwowano również wysoką swoistość poszczególnych laktonów wobec szczepów *Candida*.

Wyniki przedstawione w Tabeli 2 obrazują MIC₅₀, MIC₉₀ flukonazolu (1) i laktonów 2-4 w mieszaninach. Na podstawie danych z tabeli 1 i tabeli 2 wyznaczono frakcjonalne stężenia hamujące FIC₅₀, FIC₉₀. Mieszaniny, w których wartości FIC są równe 0,5 lub mniejsza, oznaczają, że flukonazol i lakton dodane razem działają silniej niż dodawane oddzielnie, a sumaryczna ilość związków potrzebna na osiągnięcie tego samego efektu jest wielokrotnie mniejsza.

Pośród 18 wartości ułamkowych stężeń hamujących FIC, 13 ma wartości poniżej 0,5, a tylko dwukrotnie wyznaczono wartości FIC powyżej 1 (Tabela 2).

W przypadku 3-butyloftalidu (2) stężenie potrzebne do osiągnięcia 90% redukcji wzrostu *C. albicans* ATCC 109231 było około 45-krotnie mniejsze, a w przypadku flukonazolu około 2-krotnie mniejsze niż stężenie tych związków działające oddzielnie, a nie w mieszaninie. Podobne zjawisko można zaobserwować w przypadku 3-n-butyliidenoftalidu (3) w mieszaninie z flukonazolem, którego stężenie potrzebne do zahamowania wzrostu grzybni o 90% zmalało z 150 µg/mL do 4,47 µg/mL. Także stężenie niearomatycznego laktonu 4 w mieszaninie z flukonazolem potrzebne do znacznego zahamowania wzrostu szczepów *Candida* była kilkadziesiąt razy mniejsza niż w przypadku zastosowania laktonów bez dodatku flukonazolu. Należy również zaznaczyć, że aktywność flukonazolu we wszystkich przypadkach wzrastała wraz z obecnością laktonów ftalidowych, zatem do uzyskania pożądanego efektu potrzebne było stężenie kilkakrotnie niższe niż przy stosowaniu samego flukonazolu.

Mechanizm synergistyczny między laktonami 2-4 i flukonazolem (1) opiera się na promowaniu wchłaniania leków i hamowaniu ich wpływu poprzez obniżenie transkrypcji transporterów leków CDR1 i CDR2 [39, 40]. Dzięki takiemu działaniu przy mniejszych stężeniach flukonazolu jak i laktonów ftalidowych obserwujemy działanie fungistatyczne (Rys. 1c).

3. STUDIA *IN SILICO* W ANALIZIE WPLYWU STRUKTURY CHEMICZNEJ NA AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNĄ

Badając aktywność biologiczną staramy się przeanalizować wpływ na nią ma struktura chemiczna testowanych związków. Wielokrotnie taka strategia nie pozwala na jednoznaczne wnioski.

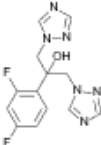
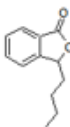
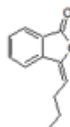
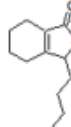
Dlatego w rozważaniach uwzględniono dane z analiz *in silico* wykonanych przy wykorzystaniu oprogramowania ADME. Lipofilowość, toksyczność dla komórek szczer-

ra, oraz hamowanie enzymów odpowiedzialnych za biotransformację i detoksykację leków są niezwykle ważne (Tabela 3) [43, 44, 45–48].

Przewidywanie toksyczności oparto na obliczeniach z algorytmu opracowanego przez Szwajcarski Instytut Bioinformatyki na Uniwersytecie w Lozannie. Algorytm wspomaganego komputerowo projektowania leków (CADD) oparty na uczeniu maszynowym może z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć właściwości biologiczne badanej substancji chemicznej [43]. Szczegółową metodologię programu opisują autorzy szwajcarskiego ADME. Toksyczność doustna u szczurów została opracowana przy użyciu modelu way2drug stworzonego przez Zakład Bioinformatyki Laboratorium Projektowania Leków w oparciu o strukturę i funkcję Instytutu Chemii Biomedycznej (IBMC) w Moskwie [44].

Tabela 3. Określenie *in silico* lipofilowości (Log P), toksyczności doustnej u szczurów (LD₅₀) i przewidywanie hamowania CYP dla flukonazolu i laktonów 2-4 na podstawie algorytmów Swiss ADME i way2drug algorytmy

Table 3. In silico determination of lipophilicity (Log P), rat oral toxicity (LD₅₀), and CYP inhibition prediction of fluconazole and 2-4 lactones from Swiss ADME and way2drug algorithms

	Związki			
				
	1	2	3	4
Log P	0,88	2,81	2,93	2,93
Toksyczność pokarmowa wobec szczura (mg/kg)	584,4	4872	1865	5184
CYP inhibitor	CYP2C19	CYP1A2	CYP1A2 CYP2C9	-

Do powyższych programów wprowadzono struktury wszystkich użytych w pracy związków chemicznych, w tym flukonazolu i laktonów ftalidowych, co pozwoliło uzyskać informacje dotyczące lipofilowości powyższych związków oraz prawdopodobnego hamowania kluczowych enzymów cytochromu P450 odpowiedzialnych za metabolizm w organizmie człowieka oraz toksyczności pokarmowej wobec szczura (Tabela 3)

Otrzymane laktony ftalidowe 2–4 (Rys. 3), czyli estry wewnętrzne, mają podobną budowę i różnią się liczbą oraz położeniem wiązań podwójnych. 3-n-Butyloftalid (2) i 3-n-butylidenoftalid (3) są związkami aromatycznymi i dlatego mają płaską strukturę. 3-n-Butylo-4,5,6,7-tetrahydroftalid (4) ma tylko jedno wiązanie podwójne między w bicyklicznym układzie pierścieni, który nie jest płaski; jego konformacja może się zmieniać w zależności od środowiska. Laktony 2–4 mają masę cząsteczkową 188-194 g/mol. Flukonazol ma odmienną budowę chemiczną, jest to trzeciorzędowy alkohol, z dwoma azolowymi pierścieniami i difluorofenolem, czego konsekwencją stanowi odmienna lipofilowość (Tabela 3). Flukonazol (1) lepiej rozpuszcza się w wodzie a laktony 2–4 i w tłuszczach. Związki te różnią się toksycznością (Tabela 3). Flukonazol jest od 3 do 10 razy bardziej toksyczny niż przedstawione laktony. Zaobserwowano

zaskakującą różnicę w toksyczności poszczególnych laktonów – obecność wiązania podwójnego przy trzecim atomie węgla drastycznie zmniejsza dawkę śmiertelną.

Kolejne analizowane dane dotyczą enzymów należących do kompleksu cytochromu P450, które w swojej budowie mają wspólną cząsteczkę hemu. Odgrywają one kluczową rolę w metabolizmie ksenobiotyków u wszystkich przedstawicieli eukariontów [49]. Jednym z ich podstawowych zadań jest detoksykacja organizmu. Trzy rodziny enzymów cytochromu P450 (CYP1, CYP2 i CYP3), które są odpowiedzialne za biotransformację dużej części leków powszechnie stosowanych w farmakologii, mają największe znaczenie w określaniu farmakokinetyki i wpływu chemikaliów na ssaki i organizmy ssaków. Flukonazol jest silnym inhibitorem enzymu CYP2C19, odpowiedzialnego w wątrobie ssaków za detoksykację nawet 20% leków. 3-n-Butyloftalid hamuje enzymy CYP1A2 i CYP2C9, a trzykrotnie bardziej toksyczny 3-butylienoftalid tylko CYP1A2. Najmniej toksyczny 3-n-butylo-4,5,6,7-tetrahydroftalid (4) – nie jest silnym inhibitorem enzymów CYP.

UWAGI KOŃCOWE

Istnieje pilna potrzeba ograniczenia ilości antybiotyków, szczególnie tych z układami azolowymi. Mechanizm synergistyczny między laktonami 2–4 i azolami opiera się na promowaniu wchłaniania leków i hamowaniu ich wpływu poprzez obniżenie poziomu transkrypcji białek z rodziny transporterów ABC, w szczególności Cdr1 i Cdr2 w komórkach drożdży z rodzaju *Candida*. We wszystkich analizowanych przypadkach zastosowanie flukonazolu i niewielkich ilości laktonów występujących w roślinach selerowatych pozwala na ograniczenie ilości flukonazolu.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B. Mishra, A.K. Mishra, S. Kumar, S.K. Mandal, Kumar, K.-H. Baek, Y.K. Mohanta, *Metabolites* 2021, **12**, 12.
- [2] D.K. Singh, R. Tóth, A. Gácsér, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020, **10**, 94.
- [3] M. Staniszewska, Ł. Kuryk, A. Gryciuk, J. Kawalec, M. Rogalska, J. Baran, E.Łukowska-Chojnacka, Kowalkowska, A. *Molecules* 2021, **26**, 5008.
- [4] R.A. Smego, H. Ahmad, *Medicine* 2011, **90**, 237.
- [5] M.E. Akler, H.Vellend, D.M. McNeely, S.L. Walmsley, W.L. Gold, *Clin. Infect. Dis.* 1995, **20**, 657.
- [6] D.F. Bavaro, F. Balena, L. Ronga, F. Signorile, F. Romanelli, S. Stolfa, E. Sparapano, C. de Carlo, A. Mosca, L. Monno, i inni. *J. Med. Mycol.* 2022, **32**, 101206.
- [7] J.C.R. Corrêa, H.R.N. Salgado, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2011, **41**, 124.
- [8] N. Fattouh, D. Hdayed, G. Geukgeuzian, S. Tokajian, R.A. Khalaf, *Fungal Genet. Biol.* 2021, **153**, 103575.
- [9] M.A. Jacobson, D.K. Hanks, L.D. Ferrell, *Am. J. Med.* 1994, **96**, 188.
- [10] T. Bühler, M. Medinger, J. Bouitbir, S. Krähenbühl, A. Leuppi-Taegtmeier, *Front. Pharmacol.* 2019, **10**, 645.
- [11] K.R. Beck, A. Odermatt, *Mol. Cell. Endocrinol.* 2021, **524**, 111168.
- [12] S. Bhattacharya, S. Sae-Tia, B.C. Fries, *Antibiotics* 2020, **9**, 312.
- [13] A. Agrawal, A. Singh, R. Verma, A. Murari, *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2014, **18**, 81.
- [14] K. Spettel, W. Barusch, A. Makrithathis, I. Zeller, M. Nehr, B. Selitsch, M. Lackner, P.-M. Rath, J. Steinmann, B. Willinger, *PLOS ONE* 2019, **14**, e0210397.
- [15] M.T. Yassin, A.A. Mostafa, A.A. Al-Askar, R. Bdeer, *Eur. J. Med. Res.* 2020, **25**, 1.
- [16] Becher, R.; Wirsal, S.G.R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, **95**, 825.
- [17] P.-Y. Chen, Y.-C. Chuang, U.-I. Wu, H.-Y. Sun, J.-T. Wang, W.-H. Sheng, Y.-C. Chen, S.-C. Chang, S.-C. J. *Fungi* 2021, **7**, 612.
- [18] A. Arastehfar, F. Daneshnia, A. Hafez, S. Khodavaisy, M.J. Najafzadeh, A. Charsizadeh, H. Zarrinfar, [23] *Med. Mycol.* 2020, **58**, 766.

- [19] X. Fan, M.Xiao, D. Zhang, J.J. Huang, H. Wang, X. Hou, L. Zhang, F. Kong, S.C Chen, Z.H. Tong, *i inni Clin. Microbiol. Infect.* 2019, **25**, 885.
- [20] S.A. Flowers, B Colón, S.G. Whaley, M.A. Schuler, P.D. Rogers, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, **59**, 450.
- [21] K.E. Pristov, M.A. Ghannoum, *Clin. Microbiol. Infect.* 2019, **25**, 792.
- [22] A. León, M. Del-Ángel, J.L. Ávila, G. Delgado, *Prog Chem. Org. Nat. Prod.* 2017, **104**, 127.
- [23] C. Ding, Y. Sheng, Y. Zhang, J. Zhang, G. Du, *Planta Med.* 2008, **74**, 1684.
- [24] R.M. Spréa,; Â. Fernandes,; T.C. Finimundy,; C. Pereira,; M.J. Alves,; R.C. Calhella,; C. Canan,; L. Barros, J.S. Amaral, I.C.F.R. Ferreira, *Resources* 2020, **9**, 81.
- [25] A. León, R.A. Toscano, J. Tortoriello, G. Delgado, *Nat. Prod. Res.* 2011, **25**, 1234.
- [26] J.J. Beck, S.-C Chou, *J. Nat. Prod.* 2007, **70**, 891.
- [27] R.A. Momin, M.G. Nair, *J. Agric. Food Chem.* 2001, **49**, 142.
- [28] J. Pannek, J. Gach, F. Boratyński, T.Olejniczak, *Phytother. Res.* 2018, **32**, 1459.
- [29] L. Fan,; B. Luo,; Z. Luo,; L. Zhang,; J. Fan,; W. Xue,; L.Tang,; Y. Li, *Für Nat. B* 2019, **74**, 811.
- [30] B. Xiao,; J. Yin,; M. Park,; J. Liu,; J.L. Li,; E. Kim,; J. Hong,; H.Y. Chung,; J.H. Jung, *Bioorg. Med. Chem.* 2012, **20**, 4954
- [31] J. Jia, C. Wei, J. Liang, A. Zhou, X. Zuo, H. Song, L. Wu, X. Chen, S. Chen, J. Zhang, *i inni Alzheimer's Dement.* 2016, **12**, 89.
- [32] X. Wang, L. Wang, X. Sheng, Z. Huang, T. Li, M. Zhang, J. Xu, H. Ji, J. Yin, Y. Zhang, *Org. Biomol. Chem.* 2014, **12**, 5995.
- [33] X. Diao, P. Deng, C. Xie, X. Li, D. Zhong, Y. Zhang, X. Chen, *Drug Metab. Dispos.* 2013, **41**, 430.
- [34] J. Gach, T. Olejniczak, P. Krężel, F. Boratyński, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, **22**, 7600.
- [35] X. Chen, S. Deng, Q. Lei, Q. He, Y. Ren,; Y. Zhang, J. Nie,; W. Lu, *Front. Cell Dev. Biol.* 2020, **8**, 598020
- [36] X. Li, X. Wang, L. Miao, Y. Guo, R. Yuan, H. Tian, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021, **556**, 99.
- [37] Liu, X.; Liu, R.; Fu, D.; Wu, H.; Zhao, X.; Sun, Y.; Wang, M.; Pu, X. *Aging* 2021, **13**, 3763.
- [38] B. Wang, C. Wu, Z. Chen, P. Zheng, Y. Liu, J. Xiong, J. Xu, P. Li, A.A. Mamun, L. Ye, *i inni Acta Pharmacol. Sin.* 2021, **42**, 347
- [39] Y. Gong, W Liu, X. Huang, L. Hao, Y. Li, S. Sun, *Front. Microbiol.* 2019, **10**, 1461.
- [40] Z. Yan, H. Hua, Y. Xu,; L.P. Samaranayake, *Altern. Med.* 2012, **12**, 1.
- [41] J. Meletiadis, S. Pournaras, E. Roilides, T.J. Walsh, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, **54**, 602.
- [42] V. Lorian, *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 200545
- [43] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, *SwissADME: Sci. Rep.* 2017, **7**, 42717.
- [44] D.S. Druzhilovskiy, A.V. Rudik, D.A. Filimonov, T.A. Glorizova, A.A. Lagunin, A.V. Dmitriev, P.V. Pogodin, V.I. Dubovskaya, S.M. Ivanov, O.A. Tarasova, *i inni. Computational platform Way2Drug: Russ. Chem. Bull.* 2017, **66**, 1832.
- [45] R. Tamaian, A. Moț, R. Silaghi-Dumitrescu, I. Ionuț, A. Stana, O. Oniga, C. Nastasă, DBenedec, B. Tiperciuc, *Molecules* 2015, **20**, 22188.
- [46] Lipinski, C.A. *Drug Discov. Today Technol* 2004, **1**, 337.
- [47] T. Chmiel, A. Mieszkowska, D. Kempnińska-Kupczyk, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Z. Mazerska, *Microchem. J.* 2019, **146**, 393.
- [48] G.A. Norman, *JACC Basic Transl. Sci.* 2020, **5**, 387.
- [49] S. Kumar, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2010, **6**, 11.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 marca 2023 r.

