

ВЛИЯНИЕ ДОБАВКИ ТВИН-80 НА РАСТВОРИМОСТЬ ЗАМЕЩЕННЫХ БЕНЗОКСАЗИН-2-ОНОВ И 2-ХИНОКСАЛОНА И ОЦЕНКА ИХ ПРОТИВОМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ

А. Н. Трефилова¹, Э. Р. Ахмарова¹, Э. Н. Позюмко², Ю. А. Павлова²,
А. Ю. Максимов², О. П. Красных¹

¹ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»

²ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН

Поступила в редакцию 20.10.2016 г.

Аннотация. Низкая растворимость веществ - один из главных факторов, определяющих появление ложноотрицательных результатов на этапе скрининга биологической активности веществ *in vitro*. Была исследована противомикробная активность труднорастворимых соединений, содержащих 1,4-бензоксазин- и хиноксалин-2-оновые фрагменты. Для решения проблемы низкой растворимости исследуемых веществ, в питательную среду был добавлен Твин-80.

Ключевые слова: Твин-80, 1,4-бензоксазин-2-оны, 1,4-хиноксолин-2-он, растворимость, противомикробное действие

Abstract. Poor solubility of substances is one of the major factors that play a significant role in the occurrence of false negative results at the stage of *in vitro* screening for biological activity. Compounds containing 1,4-benzoxazin- and quinoxalin-2-one moieties has been tested for antimicrobial activity. In order to solve the problem of their poor solubility, Tween-80 was added into the culture medium.

Keywords: Tween-80, 1,4-benzoxazine-2-ones, quinoxoline-2-one, poor solubility, antimicrobial activity

На самом раннем этапе поиска биологически активных молекул – на этапе высокопроизводительного скрининга *in vitro*, где, главным образом, оценивается связывание молекул с биологической мишенью - существенной проблемой является появление ложноотрицательных и ложноположительных результатов. Соответственно, часть огромного количества молекул из библиотек соединений, подвергаемых скринингу, отсеивается, в том числе ввиду неудовлетворительных физико-химических свойств, а часть, наоборот, дает слишком обнадеживающие результаты.

Если на ранних стадиях разработки лекарств делается акцент исключительно на активности, то это приводит к тому, что выбранные молекулы («хиты» и «лидеры») будут эффективными лигандами биологических мишеней, однако их неудовлетворительные физико-химические свойства в

дальнейшем делают проблемной разработку на их основе лекарственных препаратов по причинам, связанным с неприемлемыми фармакокинетическими параметрами. Для того, чтобы избежать такой ситуации и для получения наиболее точных результатов на стадии скрининга, к структурам предъявляется ряд требований, представленных в виде «правила пяти» Липински, правила Вебера и др., согласно которым регламентируется количество доноров и акцепторов водородных связей в молекуле, липофильность, молекулярный вес, а также молекулярная гибкость, обусловленная количеством вращающихся связей, полярная площадь поверхности молекулы и другие параметры [1, 2].

С другой стороны, излишняя зарегламентированность подобных структурных характеристик также не приветствуется, так как приводит к обеднению структурного разнообразия в скрининговых программах, что, в свою очередь, неблагоприятно сказывается на поиске новых фармакофоров

и на создании инновационных лекарств, поскольку выявленные новые фармакофорные фрагменты могут быть использованы для синтеза аналогов, обладающих улучшенными физико-химическими свойствами, и, таким образом, послужить основой для разработки инновационных препаратов [3].

Для того, чтобы достичь сайта действия на биологической мишени, молекулы должны быть способны взаимодействовать с двумя разными средами: мембраной клеток, в основе которой бислой липидов (липофильная среда), и цитоплазмой, представляющей собой раствор солей в воде (гидрофильная среда). Именно поэтому для того, чтобы быть успешной с точки зрения биологического действия, молекула должна обладать оптимальным соотношением параметров липофильности и гидрофильности [4]. Липофильность обеспечивает взаимодействие и прохождение молекул через мембраны, а растворимость в водной фазе играет роль в обеспечении необходимой концентрации во вне- и внутриклеточном пространстве.

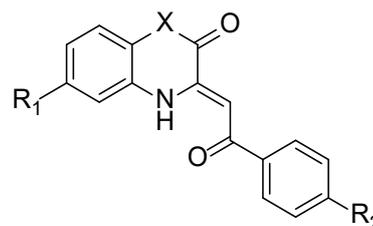
Соединения, содержащие 1,4-бензоксазин- и хиноксалин-2-оновый фрагменты – представители двух классов труднорастворимых веществ. Низкая растворимость и высокая липофильность таких соединений представляют серьезную проблему для оценки их биологической активности.

Существуют разные пути решения проблемы низкой растворимости подобных веществ, как на стадии первичного скрининга, так и при углубленном изучении. К основным стратегиям относятся модификация структуры при сохранении фармакофорного фрагмента (введение ионогенных, полярных групп, доноров и акцепторов водородных связей, снижение молекулярной массы молекулы и другое) или соответствующая оптимизация тестовых систем с использованием соразстворителей и сурфактантов, использование специальных носителей - липосом или наночастиц и т.п. [4,5].

Целью данной работы являлась оптимизация условий проведения эксперимента по оценке противомикробной активности труднорастворимых соединений, содержащих 1,4-бензоксазин- и хиноксалин-2-оновые фрагменты, в отношении ряда штаммов бактерий.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись синтезированные по известной методике [6,7] соединения 1-5 общей формулы



где (1): X = O; R₁ = H; R₂ = F; (2): X = NH; R₁ = H; R₂ = F; (3): X = O; R₁ = H; R₂ = CH₃; (4): X = O; R₁ = Cl; R₂ = CH₃; (5): X = O; R₁ = H; R₂ = H

Спектральные характеристики синтезированных соединений соответствуют данным, описанным в литературе. Значения clogP рассчитаны с использованием ChemBioDraw Ultra 11.0.1 (CambridgeSoft) и попадают в интервал clogP 3.2 – 5.5. Стоковые растворы исследуемых веществ были приготовлены в ДМСО в концентрации 1mM.

В качестве модельных биологических объектов исследования использовались лабораторные штаммы актинобактерий *Rhodococcus ruber* Б5ор, С3кр, *Gordona* sp. X19, *Rhodococcus erythropolis* Н2акн. Культуры выращивали в условиях периодического культивирования в колбах Эрленмейера на шейкере (120 об/мин), при температуре 30°C в течение 7 суток [8]. Для оценки ингибирующего действия исследуемых веществ в отношении бактерий использовали культуры, выращенные в колбах на жидкой питательной среде Luria-Bertani (LB) [9].

В каждую лунку 96-луночного планшета вносили по 180 мкл клеточной суспензии (с солюбилизатором или без него) одного из исследуемых штаммов (*Rhodococcus ruber* Б5ор, С3кр, *Gordona* sp. X19, *Rhodococcus erythropolis* Н2акн), стандартизованной до рабочей концентрации 105 клеток/мл [10]. В рядах планшета последовательно готовили серийные двукратные разведения тестируемых веществ в диапазоне концентраций от 3,125 μM до 100 μM (по 20 мкл в каждую лунку). В отдельных лунках готовили контроли роста и стерильности среды.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) оценивали по разнице двух параметров: оптическая плотность спустя 10 минут после засева и через 7 суток инкубирования относительно контрольных образцов с естественным приростом микробиологической культуры на планшетном спектрофотометре Tecan Infinite M200 (Tecan, Швейцария).

Для решения проблемы низкой растворимости исследуемых веществ использовали солюбилизатор на стадии проведения эксперимента

по ингибированию роста бактерий. Выбор солюбилизатора сделан на основании результатов экспериментов по растворению замещенного 1,4-бензоксазин-2-она (**1**) в буферном растворе в присутствии одной из следующих добавок: глицерина в концентрациях 2 и 8% от общего объема, Твина-80 в концентрации 0,05% и Твина-85 в концентрации 0,05%. Были приготовлены пробы соединения **1** с тремя разными концентрациями: 10 мМ, 50 мМ и 100 мМ. В пробирку с буферным раствором и солюбилизатором добавляли стоковый раствор исследуемого вещества, затем взбалтывали на шейкере. Полученный раствор центрифугировали, жидкую фазу переносили в чистую пробирку, в первую добавляли 1 мл ацетона. Для контроля растворения использовали в качестве индикатора ярко-желтую окраску исследуемого вещества: по окрашиванию ацетонового раствора в желтый цвет делали вывод о том, что часть вещества не растворилась.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Добавление стоковых растворов труднорастворимых веществ в лунки с буферным раствором или в пробирку сопровождается выпадением соединений из раствора в виде мелкокристаллического осадка или образованием пленки на стенках сосуда. Использование в качестве солюбилизатора неионогенных поверхностно-активных веществ Твина-80 или Твина-85 помогает растворению исследуемых веществ.

Исходя из полученных результатов, Твин-80 выбран в качестве добавки в питательную среду в количестве 0,05% от общего объема для того, чтобы избежать возможного выпадения в осадок исследуемых веществ на этапе добавления их стоковых растворов в лунки с бактериальной культурой. Глицерин также повышает растворимость 1,4-бензоксазин-2-она в сравнении с экспериментом без добавки, однако добавление глицерина не помогло достичь равномерного распределения вещества в среде.

Следует отметить, что Твин-80, по литературным данным, способен потенцировать противомикробное действие некоторых антибиотиков в отношении различных штаммов *Helicobacter pylori* за счет изменения структуры бактериальной стенки [11], однако сам по себе Твин-80 в используемой концентрации не оказывает существенного влияния на рост микроорганизмов [11,12]. В литературе имеются данные об использовании Твин-

80 и глицерина как субстратов для микробного синтеза: в качестве источника углерода глицерин добавляют в питательную среду в концентрации 1,0 % (по объему), Твин 80 - 1 мл/л [9,13]. Исходя из этого, предполагается, что глицерин и Твин-80 не оказывают ингибирующего действия на рост микроорганизмов.

В эксперименте с использованием питательной среды без добавления солюбилизатора по истечении 7 суток подавления роста микроорганизмов под влиянием исследуемых соединений не наблюдалось. Ввиду низкой растворимости исследуемых веществ, было сделано предположение о том, что они удаляются из раствора вследствие выпадения в осадок на этапе добавления стоковых растворов в лунки со средой, что было подтверждено в модельном эксперименте.

В эксперименте с добавлением Твин-80 в питательную среду LB была определена минимальная ингибирующая концентрация (МИК) равная 100 мМ для 1,4-бензоксазин-2-онов **1**, **3**, **4** и **5**, в отношении *Rhodococcus erythropolis* H2акн, соединений **1** и **4** в отношении *Gordona* sp. X19, и хиноксалин-2-она **2** в отношении *Rhodococcus ruber* Б5ор, равная также 100 мМ.

ВЫВОДЫ

Сравнение результатов двух экспериментов - с использованием питательной среды стандартного состава и среды с добавлением поверхностно-активного вещества Твин-80 - показывает, что присутствие солюбилизатора позволяет выявить антибактериальное действие исследуемых веществ, предположительно, за счёт повышения их растворимости в питательной среде, а также за счет увеличения биодоступности, связанным с изменением структуры клеточной стенки микроорганизмов под влиянием Твина-80. Сам Твин-80 в эксперименте не ингибировал рост бактерий используемых штаммов, что было подтверждено в контрольном опыте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. / Lipinski C.A. [et al.] // Adv. Drug. Delivery Rev. — 1997. — Vol. 23. — P. 4-25.
2. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. / D.F. Veber [et al.] // J. Med. Chem. — 2002. — Vol. 45. — P. 2615—2623.

3. Oral Druggable Space beyond the Rule of 5: Insights from Drugs and Clinical Candidates. / B.C. Doak [et al.] // Chemistry and biology. — 2014. — Vol.21, Issue 9. — P. 1115–1142.
4. Kerns E., Di L. Drug-like properties: concepts, structure design, and methods: from ADME to toxicity optimization / E. Kerns, L. Di. // 1st ed. Academic Press, Elsevier Inc., Burlington, MA, 2008.
5. Avdeef A. Absorption and Drug Development. Solubility, Permeability, and Charge State. / A. Avdeef // Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2003.
6. Андрейчиков Ю.С., Воронова Л.А., Козлов А.П. Химия оксалильных производных метилкетонов. XX. Кинетика взаимодействия бензоилпировиноградных кислот с *o*-аминофенолом // Журнал органической химии. — 1979. — Т. 15. — № 3. — С. 520-526.
7. Andreichikov Yu. S. [et al.]// 3-Phenacyl-2-quinoxalines and 3-phenacylidene-3,4-dihydro-2-quinoxalones // Chemistry of Heterocyclic Compounds — 1978. — Vol.14 — P. 336-339
8. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева // М.: Дрофа. — 2004. — 256 с.
9. Microplate Alamar Blue assay versus ВАСТЕС 460 system for high-throughput screening of compounds against Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium / L.S. Collins, S.G. Franzblau // Antimicrob Agents Chemother. — 1997. — Vol.41 — P. 1004–1009.
10. Ремезовская Н.Б. Микрометод определения бактериостатического действия антибиотиков // Тез.докл. Всесоюз. конф. «Актуальные вопросы медицинской биотехнологии» Томск. — 1991. — Ч.1. С. 46.
11. Figura N., Marcolongo R., Cavallo G., Santucci A., Collodel G., Spreafico A., Moretti E. Polysorbate 80 and Helicobacter pylori: a microbiological and ultrastructural study/ Figura et al. // BMC Microbiology — 2012. — 12:217
12. Brown M.R.W., Winsley B.E. Effect of Polysorbate 80 on Cell Leakage and Viability of Pseudomonas aeruginosa Exposed to Rapid Changes of pH, Temperature and Tonicity// J. gen. Microbiol. — 1969 — 56 — P.99-107
13. Пирог Т.П. Синтез поверхностно-активных веществ Acinetobacter calcoaceticus ИМВВ-7241 и Rhodococcus erythropolis ИМВ Ас-5017 в среде с глицерином / Т.П. Пирог [и др.] // Микробиол. журн. — 2012. — Т. 74, № 1 — С. 20–27.

Пермский национальный исследовательский политехнический университет

Трефилова А. Н., аспирант Научно-образовательный центр прикладных химических и биологических исследований

Тел.: +7 (342) 219-82-74

E-mail: al.trefilova@rambler.ru

Ахмарова Э. Р., студентка кафедры химии и биотехнологии

Тел.: +7 (342) 219-82-74

E-mail: evelina.01@list.ru

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

Поюзумко Э. Н., аспирант

Тел.: +7 922 303-96-90

E-mail: 112191991@mail.ru

Павлова Ю. А., кандидат биологических наук, младший научный сотрудник

Тел.: +7-919-700-57-77

E-mail: pavlova_ua@mail.ru

*Perm National Research Polytechnic University
Trefilova A. N., postgraduate student, Scientific and Educational Center For Applied Chemical and Biological Research*

Ph.: +7 (342) 219-82-74

E-mail: al.trefilova@rambler.ru

Akhmarova E. R., student, Department of chemistry and biotechnology

Ph.: +7 (342) 219-82-74

E-mail: evelina.01@list.ru

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

Pozyumko E. N., graduate student

Ph.: +7 922 303-96-90

E-mail: 112191991@mail.ru

Pavlova Y. A., PhD, junior researcher

Ph.: +7 919 700-57-77

E-mail: pavlova_ua@mail.ru

Трефилова А. Н., Ахмарова Э. Р., Позюмко Э. Н., Павлова Ю. А., Максимов А. Ю., Красных О. П.

*Максимов А. Ю., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Тел. +7 922 300-09-78
E-mail: almaks1@mail.ru*

*Maksimov A. Yu., PhD, Senior researcher
Ph.: +7-922-300-09-78
E-mail: almaks1@mail.ru*

Пермский национальный исследовательский политехнический университет

Красных О. П., кандидат химических наук, директор Научно-образовательного центра прикладных химических и биологических исследований

*Тел.: +7 (342) 219-82-74
E-mail: ol.krasnykh@pstu.ru*

*Perm National Research Polytechnic University
Krasnykh O. P., PhD, Scientific and Educational Center For Applied Chemical and Biological Research*

*Ph.: +7-(342)-2198274
E-mail: ol.krasnykh@pstu.ru*