

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ АНТИБИОТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

С. Л. Сафронюк, Ю. Ю. Гавриченко, А. М. Кацев

Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»

Поступила в редакцию 29.01.2018 г.

Аннотация. В работе изучена биологическая активность двадцати двух лекарственных препаратов, различных фармакологических групп, с использованием природных светящихся бактерий штамма *Photobacterium leiognathi* Sh1. По результатам проведенных исследований для ЛПП определены значение $ЭК_{50}$, а также установлено, что $ЭК_{50}$ в остром варианте оценки биоактивности больше чем $ЭК_{50}$ в хроническом варианте от 1.2 до 15 раз. Выявлено, что некоторые ЛПП, не антибиотики, ингибируют люминесценцию в диапазоне концентраций, характерных для веществ с антибактериальным механизмом действия.

Для полученных результатов биологических эффектов ЛПП, в отношении тест-штамма, проведено их сравнение со значениями физико-химических параметров исследуемых веществ. По результатам сопоставления всей совокупности данных не удалось установить однозначной зависимости. Однако определено, что для антибактериальных препаратов, H1-антигистаминных средств и местных анестетиков зависит от значений Log P, CLog P и tPSA. Для группы ЛПП содержащих алкалоиды выстроены корреляционные зависимости между CLog P, Log P, MV и tPSA с $ЭК_{50}$. Взаимосвязь $ЭК_{50}^x$ и MW находится на уровне $-91.05 \pm 0.1\%$, а $ЭК_{50}^x$ и tPSA в пределах $-80.46 \pm 0.1\%$. Такие значения говорят о том, что при уменьшении значений MW и tPSA будет приводить к увеличению $ЭК_{50}$ и сопровождаться усилением действия субстанции, в отношении люминесцентных бактерий.

Проведен поиск взаимосвязи между строением исследуемых ЛПП и их проявлениями в отношении бактериальных люминесцентных клеток. В ходе анализа определены фармакофорные группы такие, как фенотиазин, диметиламин и его гомологи, орто-диметоксифенол, бензилизохинолин, метокси и этокси группы, ацетамидный участок, сульфо группа, хлорфенил, фторфенил, холин, бицикло[2.2.1]гептан и 1-метилпиперидин, которые предположительно ответственны за ингибирование люминесценции. Произведена оценка влияние их расположения в структуре вещества на значения $ЭК_{50}$. Определено, что если фенотиазин, дифенилметан, диметиламин и холин являются основой структуры вещества, то $ЭК_{50}$ для данных веществ будет менее 100 мкг/мл.

Ключевые слова: Лекарственные препараты, биолюминесценция, *Photobacterium leiognathi* Sh1, неспецифическая антибактериальная активность.

Разработка новых противомикробных препаратов является одной из актуальных задач многих направлений медицинской науки, поскольку, на данный момент, нет уверенности в будущей эффективности имеющихся антибиотиков, из-за неуклонно развивающейся сопротивляемости бактерий известным антимикробным агентам. По некоторым данным, за последние десятилетия не было изобретено антибактериальных средств, обладающих новой структурой, мишенью или механизмом действия [1, 2].

Основные методы разработки новых лекарственных препаратов приходятся на доклиническую фазу, ключевой стадией которой является скрининг биологической активности соединений, определение специфических и неспецифических видов активности, а также нахождение взаимосвязи «структура – биологическая активность». Определение перспективных соединений, которые, после тестирования и модификаций, могут стать кандидатами для дальнейших испытаний на животных и людях, является первоочередной задачей на этом этапе.

Скрининг биологической активности соединений – трудоёмкий процесс, требующий значительных временных и финансовых затрат на тестирование сотен или тысяч проб с целью поиска необходимого вещества. Поэтому для этих целей применяются современные методы анализа, которые должны соответствовать ряду требований. Ключевые из них: высокая чувствительность, экспрессность и экономическая эффективность.

Физические, химические методы и их комбинации позволяют точно определять природу и количества изучаемых веществ. Совместно с ними, используются статистические скрининговые подходы, способные предсказать биологическую активность путём анализа частоты встречаемости функциональных групп, либо по наличию зависимости между набором определенных физико-химических дескрипторов и биологических эффектов, наблюдаемых при этом [3]. Однако биоактивность лекарственных соединений и их влияние на клеточные компоненты могут оцениваться только при помощи биологических подходов.

В данном исследовании, для оценки биологической активности действующих веществ лекарственных препаратов, относящихся к различным фармакологическим группам, было использовано биOLUMИНЕСЦЕНТНОЕ тестирование, на основе природных светящихся бактерий [4, 5].

Бактериальная люминесценция обладает высокой чувствительностью к действию различных биологически активных соединений, что проявляется в ее угнетении или усилении. Путем измерения уровня свечения бактерий в зависимости от концентрации вносимого агента можно установить острое и хроническое действие веществ. Благодаря таким свойствам, как чувствительность, скорость проведения анализа, простота в использовании, а также возможности оценивать биологическую активность субстанций и их смесей независимо от механизма действия соединений-кандидатов, бактериальные люминесцентные биосенсоры могут представлять реальную альтернативу уже имеющимся методам анализа на стадии скрининга [6].

Цель исследования: оценка возможности использования люминесцентных бактерий для выявления антибиотической активности лекарственных веществ в зависимости от их физико-химических свойств и химической структуры.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали двадцать два готовых лекарственных препарата (ЛП) различных фарма-

кологических групп. Антибиотики: тетрациклина гидрохлорид (ЗАТ НВЦ "Борщаговский химико-фармацевтический завод", Украина), гентамицина сульфат (ООО "Фармацевтическая компания "Здоровье", Украина), клиндамицин (далацин, Pfizer Manufacturing, Бельгия) являлись антибиотиками. H₁-антигистаминные средства: димедрол (Дальхимфарм, Россия), дипразин (Ферейн, Россия), пипольфен (EGIS Pharmaceuticals PLC, Венгрия). Местные анестетики: лидокаин (Мосхимфармпрепараты им. Н.А.Семашко, Россия), прометазин (новокаин, ООО "Фармацевтическая компания "Здоровье", Украина), ультракаин (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Германия). М-холинолитики: атропин (ЗАО "Дарница", Украина), скополамина гидробромид (Roche Holding AG, швейцария). Нейролептики: аминазин (Новосибхимфарм, Россия), галоперидол (Мосхимфармпрепараты им. Н.А.Семашко, Россия). Спазмолитики: но-шпа (Chinoin Pharmaceutical and Chemical Works Co., Венгрия), папаверина гидрохлорид (ЗАО "Дарница", Украина). Стимуляторы дыхания: лобелина гидрохлорид (ЗАО "Дарница", Украина), комбинация прокаина и сульфокамфорной кислоты (сульфокамфокаин, Фармстандарт-УфаВИТА, Россия). А также эфедрина гидрохлорид (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) – гипертензивное вещество, унитиол (Мосхимфармпрепараты им. Н.А.Семашко, Россия) – детоксирующие средство, пираретам (Озон ООО, Россия) – ноотроп, анальгин (ЗАО "Дарница", Украина) – нестероидное противовоспалительное средство.

Физико-химические свойства лекарственных веществ, входящих в ЛП, такие как десятичный логарифм распределения вещества в системе октанол-вода (Log P), липофильность (CLogP), молекулярный вес действующего вещества ЛП (MW) и топологическая площадь полярной поверхности (tPSA), оценивали расчётным путем с использованием программы ChEMBL (EMBL-EBI, Cambridgeshire, UK) и литературных данных о химической структуре действующих веществ [3].

Изучение антибиотической активности исследуемых лекарств проводили с использованием светящегося штамма *Photobacterium leiognathi* Sh1 из коллекции Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» [7]. Предварительные исследования показали, что данные люминесцентные бактерии обладают высокой чувствительностью к действию биологически-активных веществ различной природы, независимо от их механизма действия [8, 9, 10, 11].

Методика анализа антибиотической активности заключалась в том, что в кюветы люминометра вносили по 850-950 мкл раствора, содержащего разбавленную 1 к 40 жидкую питательную среду для культивирования микроорганизмов (Nutrient broth M002, Himedia, Индия) с конечной концентрацией натрия хлорида в пробе раной 3% и 0-100 мкл раствора, исследуемого ЛП. Полученную систему выдерживали при 25°C в течение 15 минут при постоянном перемешивании 100 об/мин на вибрационной мешалке (СВ-1, Россия) для равномерного распределения вещества в пробе. Затем добавляли по 50 мкл бактериальной суспензии, содержащей $5 \cdot 10^6$ кл/мл. Полученные системы термостатировали при 25°C в термостате (ТСО -1/80 СПУ, Россия) на протяжении всего периода анализа. Измерение свечения систем проводили через 15 и 30 минут (острое действие) и 24 часа (хроническое действие) от момента внесения клеток в пробу [9]. Регистрацию люминесценции проводили с помощью биолюминометра (БХЛ-06, Россия).

Антибиотическую активность ЛП в отношении люминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1 оценивали по следующим параметрам: средняя концентрация препарата, снижающая свечения микроорганизмов на 50% в остром ($ЭК_{50}^o$) и хроническом варианте ($ЭК_{50}^x$).

Все измерения проводили в трех повторах. Для статистической обработки результатов использовали программу Microsoft Excel.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сопоставлении биологических ответов люминесцентных клеток штамма *P. leiognathi* Sh1 при 15 и 30 минутной инкубации с растворами ЛП выявили сходные результаты, что позволило использовать в качестве значений $ЭК_{50}^o$ данные, полученные при оценке 15 минутного тестирования.

Эффекты изучаемых веществ характеризовались четырьмя типами действия по отношению к свечению тест-штамма [11]. Первая группа – сильные ингибиторы, ЛП, снижающие биолюминесценцию на 50% и более в концентрациях, свойственных антибактериальным препаратам. Вторая группа – ингибиторы люминесценции, вещества, снижающие свечение бактерий на 50% и более при концентрациях характерных для веществ, обладающих высоким уровнем токсичности (тяжелые металлы и их соли, кислоты, щелочи и др.) Третья группа – умеренные ингибиторы, соединения, при наличии которых в системе проис-

ходит снижение люминесценции на 50% и более при количествах характерных для большинства веществ, обладающих токсичностью. Четвертая группа – нейтральные вещества, которые не оказывают снижения или повышения свечения люминесцентных бактерий более чем на 20% от контрольных значений.

В первую группу вошли лекарственные препараты: тетрациклина гидрохлорид, атропин, гентамицина сульфат, папаверина гидрохлорид, но-шпа и скополамина гидробромид, для которых $ЭК_{50}^o$ составляла до 10 мкг/мл, см. рисунок 1А. Вторую группу составили димедрол, далацин, аминазин, дипразин, пипольфен и галоперидол, приводящие к ингибированию биолюминесценции более чем на 50% при концентрациях от 10 до 100 мкг/мл, см. рисунок 1В. Третья группа содержала ЛП: лидокаин, ультракаин, унитиол, новокаин, сульфокамфокаин и анальгин. $ЭК_{50}^o$ для них находилась в диапазоне концентраций от 100 до 500 мкг/мл, см. рисунок 1С. В четвертую группу вошли препараты лобелина гидрохлорид, строфантин, эфедрина гидрохлорид и пирацетам, для которых, при концентрациях до 1000 мкг/мл, не регистрировали снижения люминесценции более чем на 40 % от контрольных значений, см. рисунок 1D.

При изучении хронического действия исследуемых ЛП, в группу снижающих люминесценцию более чем на 50% при концентрации до 10 мкг/мл вошли препараты скополамина гидробромид, тетрациклина гидрохлорид, атропин, гентамицина сульфат, далацин, но-шпа, лобелина гидрохлорид и папаверина гидрохлорид (рисунок 2А). Во вторую группу ЛП с $ЭК_{50}^x$ при концентрации до 100 мкг/мл вошли димедрол, лидокаин, ультракаин, унитиол, галоперидол, аминазин, дипразин, пипольфен и эфедрина гидрохлорид (рисунок 2В.) Препараты новокаин, строфантин, сульфокамфокаин и анальгин составил третью группу ЛП с $ЭК_{50}^x$ до 500 мкг/мл (рисунок 2С). Только пирацетам не оказывал влияние на биолюминесценцию бактерий и не снижал ее более чем на 10% при хроническом действии (рисунок 2D).

Сравнительный анализ острого и хронического действия ЛП на светящиеся бактерии показал некоторые отличия. Биологические проявления исследуемых препаратов, кроме анальгина, новокаина, сульфокамфокаина и пирацетама, усиливались при увеличении времени их воздействия на тест-штамм. Препараты лидокаин, ультракаин и унитиол, из группы три, при хроническом, действии оказывали эффекты, характерные для груп-

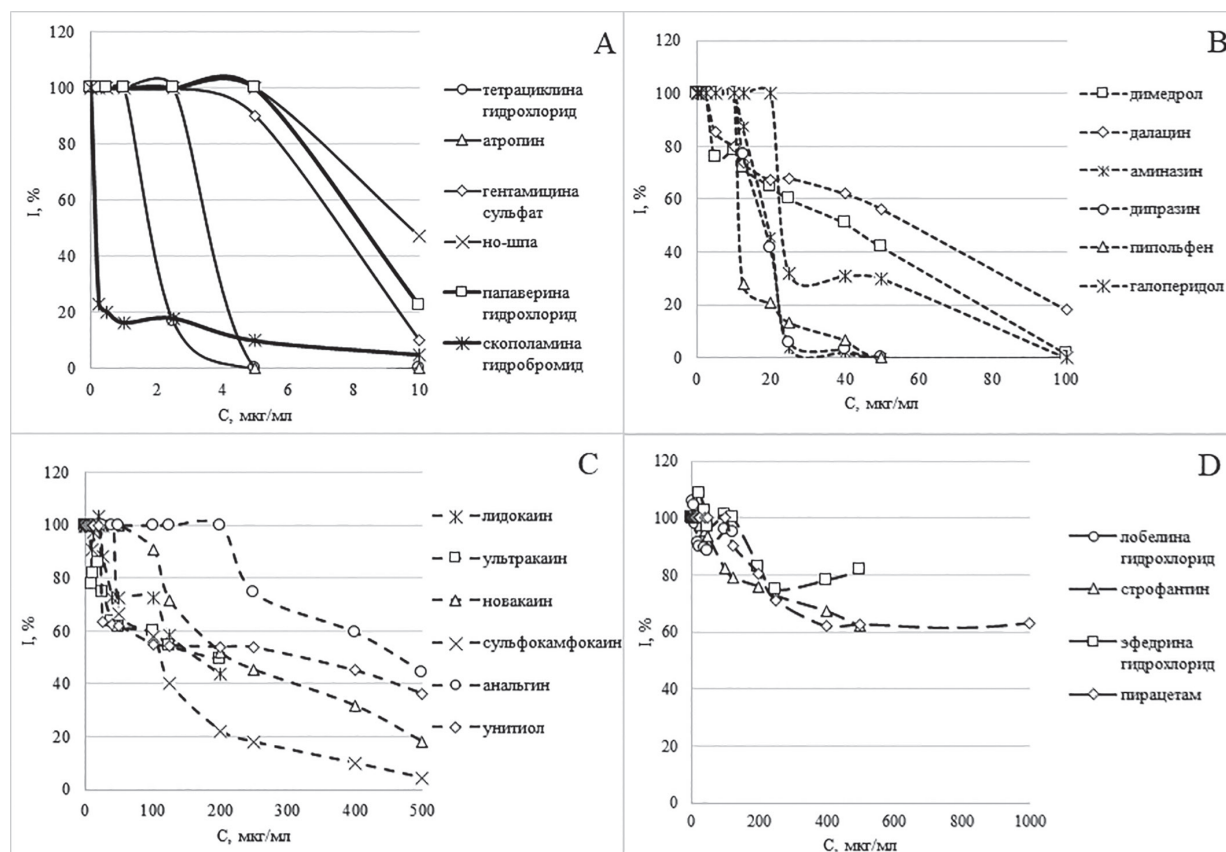


Рис. 1. Острое действие (15 минут) ЛП на биолюминесцентные бактерии штамма *P. leiognathi* Sh1. А – действие ЛП в концентрациях до 10 мкг/мл; В - действие ЛП в концентрациях до 100 мкг/мл; С - действие ЛП в концентрациях до 500 мкг/мл; D - действие ЛП в концентрациях до 1000 мкг/мл.

пы два. Лобелина гидрохлорид, эфедрина гидрохлорид и строфантин, не оказывавших влияние на свечение бактерий в остром тесте, перешли в группу один, два и три, соответственно, при оценке хронического действия.

Таким образом, все препараты антибиотиков, Н₁-антигистаминных средств, М-холинолитиков, нейролептиков, спазмолитиков и представители разных фармакологических групп, содержащих алкалоиды, а также местных анестетиков, кроме новокаина, при хроническом действии оказались в первых двух группах.

Наиболее выраженные различия между острым и хроническим значениями ЭК₅₀, которые представлены в таблице 1, наблюдались у лидокаина, лобелина гидрохлорида и эфедрина гидрохлорида. Их ЭК₅₀ в остром варианте составлял 162.0 мкг/мл и более 1000 мкг/мл, для ЛП содержащих алкалоиды, тогда как значение хронического ЭК₅₀ составлял 25.60 мкг/мл, 10.00 мкг/мл и 65.30 мкг/мл соответственно. Умеренные различия, от 2 до 4 раз, между острым и хроническим ЭК₅₀ были характерны для препаратов: анальгин, димедрол, скополамина гидробромид, ультракаин и уни-

тиол. Незначительная разница между острым и хроническим ЭК₅₀ наблюдали для аминазина, дипразина и строфантана, в диапазоне от 1.2 (для аминазина) до 1.63 раз (для дипрозина). В целом, значения ЭК₅₀ в хроническом тесте меньше величин, острой оценки биологических эффектов, что указывает на более выраженное действие препаратов на бактерии в течении 16-18 часов.

Поскольку среди ингибиторов люминесценции были не только антибактериальные препараты, но и Н₁-антигистаминные средства, местные анестетики, М-холинолитики, нейролептики, спазмолитики, стимулятор дыхания, гипертензивное вещество и детоксицирующее средство, предприняли попытку изучить взаимосвязь между ингибированием люминесценции и рассчитанными, для их действующих веществ, значениями Log P, MW, tPSA и CLog P, представленными в таблице 1.

По результатам сравнения всей совокупности ЭК₅₀ и Log P, MW, tPSA и Clog P, не определили однозначных зависимостей. Такие результаты анализа говорят о том, что для прогнозирования антимикробной активности по рассчитанным или

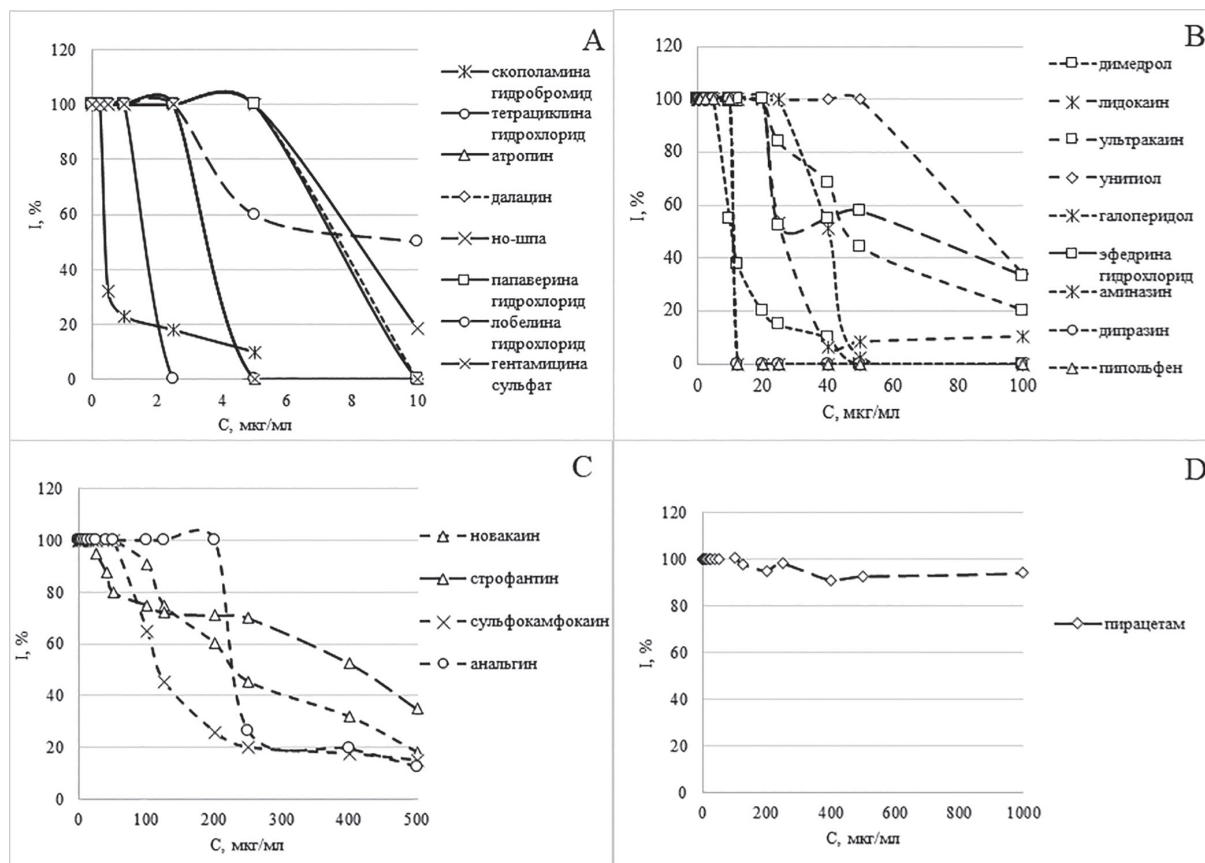


Рис. 2. Хроническое действие (24 часа) ЛП на биолуминесцентные бактерии штамма *P. leiognathi* Sh1. А – действие ЛП в концентрациях до 10 мкг/мл; В - действие ЛП в концентрациях до 100 мкг/мл; С - действие ЛП в концентрациях до 500 мкг/мл; D - действие ЛП в концентрациях до 1000 мкг/мл.

прогнозируемым физико-химическим параметрам является недостаточным и не может быть использовано в качестве единственного дескриптора [12]. Однако, установили некоторые взаимосвязи между $ЭК_{50}$ ЛП и их физико-химическими параметрами, для представителей одной фармакологической группы.

Для антибактериальных препаратов наблюдали повышение значений $ЭК_{50}$ при увеличении значений $\log P$, $C\log P$ и снижении значений $tPSA$. Представители H_1 -антигистаминных средств, которые ингибировали люминесценцию как в остром, так и в хроническом варианте, что подтверждают данные Moustafa A. El-Nakeeb, 2011, также характеризовались взаимосвязью $ЭК_{50}$ с физико-химическими параметрами. При уменьшении значений $\log P$, MV , $C\log P$, в отличие от антибиотиков, наблюдали повышение значений $ЭК_{50}^o$ и $ЭК_{50}^x$. А увеличение $tPSA$ приводило к росту $ЭК_{50}$, как при остром, так и при хроническом действии.

Препараты из группы местных анестетиков так же снижали люминесценцию бактерий в обо-

их вариантах тестирования. Ингибирующее действие этой группы препаратов подтверждают данные Svena M., 2008 и Kose A., 2010.

При сопоставлении физико-химических параметров и биоактивности ЛП наблюдали, что при повышении значений $ЭК_{50}$, происходило увеличение $C\log P$ и снижение $\log P$. В то же время, не определили влияние MV , $tPSA$ на $ЭК_{50}$ для данной группы препаратов.

Поскольку наибольшей группой препаратов, снижающих люминесценцию и не являющихся антибактериальными средствами выступали алкалоиды, для них выстроили корреляционные зависимости между $C\log P$, $\log P$, MV и $tPSA$ с $ЭК_{50}$, а также провели анализ полученных результатов. По данным биологического тестирования ЛП содержащих алкалоиды, при остром действии, определили, что три из них (атропин, папаверина гидрохлорид и скополамина гидробромид) оказывают сильное ингибирующее действие в концентрациях собственных антибиотикам (рисунок 1А), а остальные (лобелина гидрохлорид и эфедрина гидрохлорид) не оказывали значительного

Таблица 1.

Физико-химические дескрипторы и ЭК₅₀ исследуемых ЛП

№ П/П	Название препарата	ЭК ₅₀ ^о , мкг/мл	ЭК ₅₀ ^х , мкг/мл	Log P	MW	tPSA	CLog P
1	аминазин	19.3	16.05	5.23	318.86	6.48	5.299
2	анальгин	445.0	227.50	0.06	311.36	81.16	-1.661
3	атропин	3.5	3.52	1.67	289.37	49.77	0.229
4	галоперидол	22.8	40.10	4.53	375.90	48.95	5.230
5	гентамицина сульфат	7.6	3.53	-2.40	477.60	173.26	-1.698
6	димедрол	58.0	7.46	3.53	255.36	12.47	3.452
7	дипразин	41.0	10.50	3.90	284.42	6.48	4.399
8	далацин	18.2	11.12	0.76	424.98	102.26	2.559
9	лидокаин	162.0	25.60	2.41	234.34	32.34	1.954
10	лобелина гидрохлорид	>1000	10.00	3.45	337.46	40.54	4.255
11	новокаин	211.0	226.50	1.32	236.31	55.56	2.538
12	но-шпа	9.6	8.00	4.53	397.51	48.95	5.230
13	папаверина гидрохлорид	8.2	7.50	3.57	339.39	49.28	3.782
14	пиполфен	11.4	11.12	3.90	284.42	6.48	4.399
15	пирацетам	>1000	>1000	-1.73	142.16	63.40	-1.182
16	скополамина гидробромид	0.4	0.14	0.53	303.35	62.30	0.290
17	строфантин	>1000	469.00	2.22	584.65	131.75	0.594
18	сульфокамфорная кислота	110.0	115.30	1.32	232.30	71.44	-0.288
19	тетрациклина гидрохлорид	1.5	1.62	-1.14	444.44	161.39	-0.035
20	ультракаин	177.0	46.00	1.99	284.37	67.43	1.979
21	унитиол	310.0	86.20	-0.22	188.30	54.37	-1.422
22	эфедрина гидрохлорид	>1000	65.30	0.93	165.24	32.26	0.888

влияния при оценке острого действия (рисунок 1D). В то же время, при хроническом действии все алкалоиды характеризовались ЭК₅₀ менее 100 мкг/мл, см рисунок 2А и 2В. При сопоставлении ЭК₅₀ и физико-химических параметров действующих веществ ЛП выявили достоверные корреляции ЭК₅₀^о и tPSA равной -85.07±0.1%, ЭК₅₀^х и MW на уровне -91.05±0.1% и ЭК₅₀^х и tPSA -80.46±0.1%. Такие значения говорят о том, что при уменьшении значения MW и tPSA для веществ из группы алкалоида, будет приводить к увеличению минимальной эффективной концентрации, снижающей биолюминесценцию.

Кроме того, различие между острым и хроническим значением ЭК₅₀ варьировалось в зависимости от химического строения действующего компонента ЛП. Поэтому, на следующем этапе работы провели поиск фармакофорных участков в структуре действующих веществ ЛП, которые характеризовали бы неспецифические биологические эффекты ЛП.

При анализе строения изучаемых лекарственных препаратов были выявлены некоторые структурные компоненты, обладающие анти-

биотической активностью. Фенотиазин – основа для синтеза инсектицидов, содержали аминазин, дипразин и пипольфен. Дифенилметан, производные которого служат пестицидами, фунгицидами и бактерицидами является основой димедрола. Диметиламин и его гомологи, используемые в производстве гербицидов, содержался в димедрол, тетрациклин, лидокаин и новокаин. Анализ структуры спазмолитиков показал, что препараты но-шпа и папаверина гидрохлорид содержат орто-диметоксифенол, предшественником которого является гваякол, обладающий антисептическими свойствами. А также в структуры входит 1-бензилизохинолин обладающий антибактериальной активностью [13]. Метокси и/или этокси группа входила в строение папаверина, ультракаина, строфантина и но-шпы. Ацетамидный участок который прикрепляется к ферментам и изменяет их активность содержался в тетрациклин, далацин и ультракаин и пирацетаме [14]. Сульфо группа присутствовала в анальгине и унитиоле. Производное 2-тиофенкарбоновой кислоты, используемой в качестве отбеливателя с 3-пропиламинбутаноновый радикалом, обладающим свойствами

гербицида, составляли структуру ультракаина. Галоперидол в своей структуре имеет радикалы: хлорфенил, содержится в структуре пестицидов, и фторфенил используемый при синтезе противоопухолевых препаратов.

При анализе ЛП, содержащих алкалоиды, определили, что атропин и скополамина гидробромид, проявляют высокую антибиотическую активность как в отношении *P. leiognathi* Sh1, так и других бактерий [15]. Предположительно это связано с тем что действующие вещества ЛП являются аналогами холина, и содержат в структуре третичный атом азота у которого в качестве заместителей содержатся метильные группы, что позволяет этим соединениям связываться с LytA амидазой [16]. А так же в них содержится аналог бицикло[2.2.1]гептан обладающий антимикробной активностью [11].

Эфедрин обладал неспецифическим антибактериальным действием. Поскольку вся молекула близка по структуре к аминокислоте тирозин, появление в среде обитания бактериальных клеток такого компонента приводит к нарушению функционирования тирозинкиназы [17, 18]. Лобелин обладал антибактериальной активностью за счет наличия в своей структуре 1-метилпиперидина, который влияет на FtsZ-белок, отвечающий за деление бактериальных клеток, а точнее, за образование бактериальной мембраны [19, 20].

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что вещества с не антибактериальным механизмом действия могут проявлять неспецифическую антибиотическую активность по отношению к биолюминесцентным бактериям *P. leiognathi* Sh1, которая зависела от типа фармакофорных групп, их количества и расположения в структуре соединения. При этом, наиболее выраженное действие ЛП проявлялось, когда такая группа была основой структуры молекулы и понижалось в 5 и более раз, если фармакофорный участок являлся заместителем в строении фармацевтической субстанции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам анализа биологической активности ЛП в отношении люминесцентных бактерий *P. leiognathi* Sh1 были выделены четыре группы по силе ингибирования люминесценции: сильные ингибиторы с ЭК50 до 10 мкг/мл, ингибиторы – ЭК50 от 10 до 100 мкг/мл, умеренные ингибиторы, для которых ЭК50 находилась в диапазоне концентраций от 100 до 500 мкг/мл

и нейтральные вещества с ЭК50 до 1000 мкг/мл. Определены различия между значениями острого и хронического ЭК50, которые варьирует от 1.2 до 15 раз в зависимости от свойств и строения действующего вещества ЛП. При сопоставлении физико-химических параметров и значений ЭК50 выявлены определенные взаимосвязи. Для ЛП, содержащих алкалоиды показано, что повышение значений ЭК50 происходит при уменьшении величин MV и tPSA. Увеличение ЭК50 антибактериальных препаратов сопровождалось повышением Log P, CLog P и снижением значений tPSA. Представителей H1-антигистаминных средств характеризовало уменьшение Log P, MV, CLog P с одновременным увеличением ЭК50O и ЭК50X, а повышение tPSA приводило к росту ЭК50 как при остром, так и при хроническом действии. Для препаратов, из группы местных анестетиков, при росте значений ЭК50 наблюдали увеличение CLog P и снижение Log P. Но в то же время не определили связь между ЭК50 и MV, tPSA для данной группы препаратов.

Установлено, что наиболее сильным антибиотическим действием ($ЭК50 \leq 100$ мкг/мл), обладают вещества, у которых фармакофорные группы являются базовой структурой соединений, подобных известным антибактериальным субстанциям.

Результаты биолюминесцентного анализа биологической активности ЛП, различных фармакологических групп, совместно с их физико-химическими параметрами и химической структурой могут быть использованы для создания комплексного подхода при анализе SAR для вновь синтезированных веществ, а также способствуют прогнозированию, не специфической, антибиотической активности у уже известных соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Özçelik B., Kartal M., Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. // Pharm Biol. – 2011. – V. 49 (4). – P. 396-402.
2. Theuretzbacher U. Global antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens and clinical need. // Current Opinion in Microbiology. – 2017. – V. 39. – P. 106–112
3. Раевский О.А. Дескрипторы молекулярной структуры в компьютерном дизайне биологически активных веществ. // Успехи химии/ – 1999. – Т. 68 (6). – С. 555–575.
4. Neale P.A., Leusch F.D.L., Escher, B.I., Applying a mixture toxicity modulating to predict

bacterial bioluminescence inhibition by non-specifically acting pharmaceuticals and specifically acting antibiotics. // *Chemosphere*. – 2017. – V. 173. – P. 387–394.

5. Vesterlund S., Paltta J., Lauková A., Karp M., Ouwehand A.C. Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances. // *J Microbiol Methods*. – 2004. – V. 57 (1). – P. 23–31.

6. Bolelli L., Ferri E.N., Girotti S. The management and exploitation of naturally light-emitting bacteria as a flexible analytical tool: A tutorial. // *Anal Chim Acta*. – 2016. – V. 934. – P. 22–35

7. Кацев А.М. Новые термофильные люминесцентные бактерии, выделенные из Азовского моря. // *Таврический медико-биологический вестник*. – 2014. – Т. 17. № 2 (66). – С. 59–64.

8. Bisio C., Carniato F., Marchese L., Palumbo C., Guidotti M., Starodub M.F., Safronyuk S.L., Katsev A.M. Nanosized inorganic metal oxides as heterogeneous catalysts for the degradation of chemical warfare agents. // *Catalysis Today*. – 2016. – Т. 277. – С. 192–199.

9. Кацев А.М., Сафронюк С.Л., Цокало И.Е., Шереметьева А.В., Стародуб Н.Ф. Оценка применимости биолюминесцентного анализа при определении активности лекарственных препаратов. // *Ветеринарна біотехнологія*. – 2013. – № 22 (22). – С. 188–195.

10. Наумова Н.В., Мельникова Е.Д., Сафронюк С.Л., Цокало И.Е., Кацев А.М. Химический и биолюминесцентный биологический анализ экстрактов солодки голой. // *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. – 2016. – Т. 6. № 1. – С. 22–26.

11. Сафронюк С.Л., Крамарь Т.В., Назаренко М.В. Оценка влияния заместителей в гетерофункциональных производных 1,2,4-триазинохиназолинтоиуксусной кислоты на биолюминесценцию бактерий. // *Вестник Томского государственного университета. Химия*. – 2016. – Т. 4 № 6. – С. 39–49.

12. Jean-Paul Ebejer, Michael H. Charlton and Paul W. Finn. Are the physicochemical properties of

antibacterial compounds really different from other drugs? // *Cheminform*. – 2016; 8:30

13. Panchaud P., Bruyère T., Blumstein A.C., Bur D., Chambovey A., Ertel E.A., Gude M., Hubschwerlen C., Jacob L., Kimmerlin T., Pfeifer T., Prade L., Seiler P., Ritz D., Rueedi G. Discovery and Optimization of Isoquinoline Ethyl Ureas as Antibacterial Agents. // *J Med Chem*. – 2017. – V. 60 (9). – P. 3755–3775

14. Gull Y., Rasool N., Noreen M., Altaf A.A., Musharraf S.G., Zubair M., Nasim F.U., Yaqoob A., DeFeo V., Zia-Ul-Haq M. Synthesis of N-(6-Arylbenzo[d]thiazole-2-acetamide Derivatives and Their Biological Activities: An Experimental and Computational Approach. // *Molecules*. – 2016. – V. 21 (3). – P. 266–283

15. Ittzes B., Weiling Z., Batai I.Z., Kerenyi M., Batai I. Atropine and glycopyrrolate do not support bacterial growth-safety and economic considerations. // *J Clin Anesth*. – 2016. – V. 35. – P. 560–563.

16. Maestro B., González A., García P., Sanz J.M. Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines. // *FEBS J*. – 2007. – V. 274 (2). – P. 364–376.

17. Hyuga S. The Pharmacological Actions of Ephedrine Alkaloids-free Ephreda Herb Extract and Preparation for Clinical Application. // *Yakugaku Zasshi*. – 2017. – V. 137 (2). – P. 179–186

18. Tulgar S., Alasehir E.A., Selvi O. The antimicrobial activity of ephedrine and admixture of ephedrine and propofol: an in vitro study. // *Rev Bras Anesthesiol* 2017. pii: S0034-7094(17)30437-3.

19. Kaul M., Zhang Y., Parhi A.K., Lavoie E.J., Pilch D.S. Inhibition of RND-type efflux pumps confers the FtsZ-directed prodrug TXY436 with activity against Gram-negative bacteria. // *Biochem Pharmacol*. – 2014. – V. 89 (3). – P. 321–328

20. Kuo Y.C., Lee Y.C., Leu Y.L., Tsai W.J., Chang S.C. Efficacy of orally administered *Lobelia chinensis* extracts on herpes simplex virus type 1 infection in BALB/c mice. // *Antiviral Res*. – 2008. – V. 80 (2). – P. 206–212.

Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»

Гавриченко Ю. Ю., аспирант кафедры медицинской и фармацевтической химии

Тел.: +7 (978) 113-64-58

E-mail: shkered.jolie@gmail.com

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU

Gavrichenko Y. Y., assistant of the Department of Medical and Pharmaceutical Chemistry

Ph.: +7(978) 113-64-58

E-mail: shkered.jolie@gmail.com

Сафронюк С. Л., Гавриченко Ю. Ю., Кацев А. М.

Кацев А. М., профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой медицинской и фармацевтической химии

Тел.: +7 (978) 883-71-04

E-mail: katsev@mail.ru

Katsev A. M., PhD, DSci., Full Professor, head of the Department of Medical and Pharmaceutical Chemistry

Ph.: +7 (978) 883-71-04

E-mail: katsev@mail.ru

Сафронюк С. Л., аспирант кафедры медицинской и фармацевтической химии

Тел.: +7 (978) 800-03-57

E-mail: pharmalab01@mail.ru

Safronyuk S. L., postgraduated student, Department of Medical and Pharmaceutical Chemistry

Ph.: +7 (978) 800-03-57

E-mail: pharmalab01@mail.ru

APPLYING OF THE BIOLUMINESCENT BACTERIA FOR ESTIMATION OF ANTIBIOTIC EFFECTS OF MEDICINAL PREPARATIONS

S. L. Safronyuk, Yu. Yu. Gavrichenko, A. M. Katsev

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU

Abstract. The biological activity of twenty-two drugs, various pharmacological groups, was studied using natural luminous bacteria of the strain *Photobacterium leiognathi* Sh1. The value of EC_{50} defined for all drugs. Based on the results of the conducted studies, it was also found that EC_{50} in the acute variant of bioactivity assessment is greater than EC_{50} in the chronic variant from 1.2 to 15 times. It was found that some medications, not antibiotics, inhibit luminescence in the range of concentrations characteristic for substances with antibacterial mechanism of action.

For the obtained results of biological effects of drugs, with respect to the test strain, their comparison with the values of the physicochemical parameters of the substances under study was made. Based on the results of the comparison of the whole set of data, it was impossible to establish a single-valued relationship. However, it is determined that for antibacterial drugs, H1-antihistamines and local anesthetics depends on the values of Log P, CLog P and tPSA. For the group of medicines containing alkaloids correlation relations were built between CLog P, Log P, MV and tPSA with EC_{50} . The relationship between EC_{50} in a chronic test, and MW is at $-91.05 \pm 0.1\%$, and tPSA within $-80.46 \pm 0.1\%$. These values suggest that as the MW and tPSA values decrease, the EC_{50} will increase and it will be accompanied by an increase in the effect of the substance, with respect to luminescent bacteria.

A search was made to find the relationship between the structure of the investigated drugs and their manifestations in relation to bacterial luminescent cells. Pharmacophores of substances were determined. Such groups as phenothiazine, dimethylamine and its homologues, ortho-dimethoxyphenol, benzyloquinoline, methoxy and ethoxy groups, acetamide moiety, sulpho group, chlorophenyl, fluorophenyl, choline, bicyclo[2.2.1]heptane and 1-methylpiperidine were identified as a structures which supposedly responsible for the inhibition of luminescence. The influence of their location in the structure of the substance on the values of EC_{50} was estimated. It is determined that if phenothiazine, diphenylmethane, dimethylamine and choline are the basis of the structure of the substance, then EC_{50} for these substances will be less than 100 $\mu\text{g/ml}$.

Keywords: Medicinal preparations, bioluminescence, *Photobacterium leiognathi* Sh1, nonspecific antibacterial activity.

REFERENCES

1. Özçelik B., Kartal M., Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids, *Pharm Biol*, 2011, V. 49 (4), pp. 396–402.
2. Theuretzbacher U. Global antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens and clinical

need, *Current Opinion in Microbiology*, 2017, V. 39, pp. 106–112

3. Raevskii O.A. Deskriptory molekulyarnoi struktury v komp'yuternom dizaine biologicheskii aktivnykh veshchestv (Descriptors of the molecular structure in the computer design of biologically active substances), *Uspekhi khimii*, 1999, T. 68 (6), pp. 555–575.

4. Neale, P.A., Leusch F.D.L., Escher, B.I. Applying a mixture toxicity modulating to predict bacterial bioluminescence inhibition by non-specifically acting pharmaceuticals and specifically acting antibiotics, *Chemosphere*, 2017, V. 173, pp. 387–394.
5. Vesterlund S., Paltta J., Lauková A., Karp M., Ouwehand A.C. Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances, *J Microbiol Methods*, 2004, V. 57 (1), pp. 23–31.
6. Bolelli L., Ferri E.N., Girotti S. The management and exploitation of naturally light-emitting bacteria as a flexible analytical tool: A tutorial, *Anal Chim Acta*, 2016, V. 934, pp. 22–35
7. Katsev A.M. Novye termofil'nye lyuminestsentnye bakterii, vydelennye iz Azovskogo morya. (New thermophilic luminescent bacteria isolated from the Azov Sea.), *Tavrisheskii medicobiologicheskii vestnik*, 2014, T. 17. No. 2 (66), pp. 59–64.
8. Bisio C., Carniato F., Marchese L., Palumbo C., Guidotti M., Starodub M.F., Safronyuk S.L., Katsev A.M. Nanosized inorganic metal oxides as heterogeneous catalysts for the degradation of chemical warfare agents, *Catalysis Today*, 2016, T. 277, pp. 192–199.
9. Katsev A.M., Safronyuk S.L., Tsokalo I.E., Sheremet'eva A.V., Starodub N.F. Otsenka primenimosti biolyuminestsentnogo analiza pri opredelenii aktivnosti lekarstvennykh preparatov (Evaluation of the applicability of bioluminescent analysis in the determination of drug activity), *Veterinarna biotekhnologiya*, 2013, No. 22 (22), pp. 188–195.
10. Naumova N.V., Mel'nikova E.D., Safronyuk S.L., Tsokalo I.E., Katsev A.M. Khimicheskii i biolyuminestsentnyi biologicheskii analiz ekstraktov solodki goloi (Chemical and biological bioluminescent analysis of glycyrrhiza glabra extracts), *Krymskii zhurnal eksperimental'noi i klinicheskoi meditsiny*, 2016, T. 6. No. 1, pp. 22–26.
11. Safronyuk S.L., Kramar' T.V., Nazarenko M.V. Otsenka vliyaniya zamestitelei v geterofunktsional'nykh proizvodnykh 1,2,4-triazinok hinazolintoiuksusnoi kisloty na biolyuminestsentsiyu bakterii (The influence of substituents in the heterofunctional derivatives of 1,2,4-triazinohinazolin thioacetic acid on bioluminescent bacteria), *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Khimiya*, 2016, T. 4 No. 6, pp. 39–49.
12. Jean-Paul Ebejer, Michael H. Charlton, Paul W. Finn. Are the physicochemical properties of antibacterial compounds really different from other drugs?, *Cheminform*, 2016; 8:30
13. Panchaud P., Bruyère T., Blumstein A.C., Bur D., Chambovey A., Ertel E.A., Gude M., Hubschwerlen C., Jacob L., Kimmerlin T., Pfeifer T., Prade L., Seiler P., Ritz D., Rueedi G. Discovery and Optimization of Isoquinoline Ethyl Ureas as Antibacterial Agents, *J Med Chem*, 2017, V. 60 (9), pp. 3755–3775
14. Gull Y., Rasool N., Noreen M., Altaf A.A., Musharraf S.G., Zubair M., Nasim F.U., Yaqoob A., DeFeo V., Zia-Ul-Haq M. Synthesis of N-(6-Arylbenzo[d]thiazole-2-acetamide Derivatives and Their Biological Activities: An Experimental and Computational Approach, *Molecules*, 2016, V. 21 (3), pp. 266–283
15. Ittzes B., Weiling Z., Batai I.Z., Kerenyi M., Batai I. Atropine and glycopyrrolate do not support bacterial growth-safety and economic considerations, *J Clin Anesth*, 2016, V. 35, pp. 560–563.
16. Maestro B., González A., García P., Sanz J.M. Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines, *FEBS J*, 2007, V. 274 (2), pp. 364–376.
17. Hyuga S. The Pharmacological Actions of Ephedrine Alkaloids-free Ephreda Herb Extract and Preparation for Clinical Application, *Yakugaku Zasshi*, 2017, V. 137 (2), pp. 179–186
18. Tulgar S., Alasehir EA., Selvi O. The antimicrobial activity of ephedrine and admixture of ephedrine and propofol: an in vitro study, *Rev Bras Anesthesiol* 2017. pii: S0034-7094(17)30437-3.
19. Kaul M., Zhang Y., Parhi A.K., Lavoie E.J., Pilch D.S. Inhibition of RND-type efflux pumps confers the FtsZ-directed prodrug TXY436 with activity against Gram-negative bacteria, *Biochem Pharmacol*, 2014, V. 89 (3), pp. 321–328
20. Kuo Y.C., Lee Y.C., Leu Y.L., Tsai W.J., Chang S.C. Efficacy of orally administered *Lobelia chinensis* extracts on herpes simplex virus type 1 infection in BALB/c mice, *Antiviral Res*, 2008, V. 80 (2), pp. 206–212.