

САФРОНИУК СЕРГЕЙ ЛЕОНИДОВИЧ

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К АНАЛИЗУ АНТИМИКРОБНОЙ  
АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2022

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор **Кацев Андрей Моисеевич**

**Официальные оппоненты:**

Белоусов Михаил Валерьевич – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой.

Шмыгарева Анна Анатольевна - доктор фармацевтических наук, доцент, заведующая кафедрой управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Оренбургский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Приволжский федеральный округ, Республика Башкортостан, г. Уфа.

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке по адресу: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171 и на сайте (<https://samsmu.ru/scientists/science/referats/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,**

кандидат фармацевтических наук, доцент

**Жданова Алина Валитовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Поиск и разработка новых методов оценки лекарственных средств, безопасных для человека и окружающей среды, обладающих эффективным целевым действием, является одной из актуальных задач фармацевтической науки. Одной из прикладных задач в фармации является разработка новых методов, направленных на контроль качества лекарственных средств, в том числе антибиотиков. Определению антимикробной активности лекарственных веществ посвящено множество разработок, включая диффузионные методы (Е-тесты, диффузия из лунок в агаре, из агаровых блоков), методы разведения в агаре, в жидкой питательной среде. [Ozçelik B., 2011; Scholz S., 2013; Balouiri M., 2019; Theuretzbacher U., 2017; Fedorov S. N., 2017].

В настоящее время оценку антимикробной активности антибиотиков, согласно фармакопейной методике, проводят методом луночной диффузии в агар [ГФ РФ, 14 издание]. Однако, процесс его выполнения многостадийный и трудоемкий, имеет длительный процесс анализа и трудности с автоматизацией [Nijss A., 2003; Егоров Н.С., 2004].

Одним из новых подходов, используемых при изучении антибиотического действия веществ, является билюминесцентный анализ, основанный на применении в качестве тест-объектов микроорганизмов, свечение которых, легко регистрируется с помощью современных электронно-оптических приборов и служит количественной характеристикой. [Дерябин Д. Г., 2009; Bolelli L., 2016; Yunpeng D., 2020]. Биотестирование на основе природных и генно-инженерных светящихся бактерий обладает рядом таких преимуществ, как высокая чувствительность, экспрессность и экономическая эффективность, что нашло широкое практическое применение в экологии, биологии и медицине, но практически не используется в фармацевтических исследованиях [Vesterlund S., 2004; Котова В. Ю., 2014; Neale P. A., 2017].

Таким образом, разработка, унификация и стандартизация новых методик билюминесцентного анализа оценки антимикробной активности веществ различного химического строения с применением билюминесцентных бактерий является новой и перспективной научной задачей фармацевтической химии.

**Степень разработанности темы.** В настоящее время разработано и регламентировано большое количество методов оценки антимикробной активности веществ *in vitro*. К ним относятся как диффузионные методы с использованием дисков с антибиотиками и Е-тесты, так и методы «серийных разведений» с разведением в жидкой и в агаризованной питательных средах [Woods G. L., 1995; ГФ XIV издания, The International Pharmacopoeia, 2018]. Все они позволяют определять чувствительность микроорганизмов к лекарственным средствам, оценивать минимальную подавляющую (МПК), минимальную ингибирующую (МИК) и минимальную бактерицидную (МБК) концентрации.

В исследованиях, проведенных Ginocchio C. C., 2002; Eloff J. N., 2019 и др., отмечены такие недостатки используемых методов, как длительное время анализа (24-72 часа), зависимость результатов анализа от физико-химических свойств исследуемого вещества, чувствительность тест-микроорганизмов к компонентам агаризованной среды и трудность автоматизации.

Билюминесцентные методы анализа широко используются в экологических и токсикологических исследованиях для определения загрязненности воды и/или почвы тяжелыми металлами, ПАВ, пестицидами и прочими ксенобиотиками [Дерябин Д. Г., 2009; Bolelli L., 2006; Fernández A., 1995; Jarque S. 2016; Ren S., 2005]. В некоторых исследованиях показано использование билюминесцентных методов в медико-биологических и

фармацевтических целях как для качественного и количественного анализа, так и для оценки антимикробного действия веществ различного происхождения [Bisio С., 2016; Arakawa Н., 2017; Neale Р. А., 2017; Starodub N. F., 2014]. Авторами отмечается, что тестирование образцов с использованием люминесцентных тест-систем приводит к значительному сокращению времени проведения анализа, а полученные значения МПК, МИК и МБК практически не отличаются от значений, полученных с помощью стандартных микробиологических методов [Martini S., 2017; Mogilnaya О. А., 2010; Roda А., 2016]. В связи с этим актуальность приобретает оценка возможности применения биолюминесцентных бактерий в фармацевтических исследованиях и разработка на их основе новых методов, направленных на анализ антимикробной активности лекарственных веществ.

**Цель исследования:** разработать методические подходы к изучению антимикробной активности лекарственных веществ с использованием природных и генно-инженерных биолюминесцентных тест-бактерий.

**Задачи исследования:**

1. Изучить биологические и аналитические характеристики природных и генно-инженерных люминесцентных тест-объектов.
2. Оценить применимость природных люминесцентных тест-бактерий для биолюминесцентного анализа фармацевтических субстанций и выявить влияние химической структуры, физико-химических свойств на результаты оценки антимикробной активности.
3. Разработать методику биолюминесцентного анализа антимикробной активности фармацевтических субстанций.
4. Определить валидационные характеристики методики биолюминесцентного анализа антимикробной активности фармацевтических субстанций.
5. Провести испытание методики биолюминесцентного анализа на основе природных люминесцентных тест-бактерий для оценки направленно синтезированных производных 2-[(3-*R*-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-*C*]хиназолин-6-ил)-тио]уксусных кислот (NKV) с целью изучения их антимикробной активности.
6. Произвести сравнение результатов биолюминесцентного скрининга NKV и их производных с данными об антимикробной активности соединений в отношении эталонных тест-культур микроорганизмов и оценить их активность с применением панели генно-инженерных lux-биосенсоров на основе *E. coli*.

**Научная новизна.** По результатам оценки биологических и аналитических характеристик новых природных люминесцентных бактерий впервые установлено, что штамм *P. leiognathi* Sh1 является перспективным тест-объектом для изучения антимикробной активности фармацевтических субстанций (ФС). Оценка аналитических характеристик 8-ми штаммов генно-инженерных люминесцентных тест-объектов на основе *E. coli* показала их применимость для определения механизмов антимикробной активности.

Изучена чувствительность люминесцентного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 к действию ФС различных химических групп, показано влияние структуры и физико-химических свойств исследованных субстанций на интенсивность бактериального свечения.

Разработана методика определения антимикробного действия ФС с использованием биолюминесцентного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, основанная на количественных измерениях биолюминесцентного индекса (БЛИ).

Впервые проведена валидационная оценка методики биолюминесцентного анализа антимикробной активности ФС, которая показала условия ее применимости.

Разработанная методика по изучению антимикробной активности лекарственных веществ с использованием природного биолюминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1 испытана при скрининге антибактериальной активности 42-х направленно синтезированных производных NKV. Выявлены ряд производных, обладающих антимикробным действием, что было подтверждено исследованиями на эталонных тест-объектах. С использованием батареи lux-биосенсоров на основе *E. coli* определены механизмы их антимикробной активности.

Научная новизна исследований подтверждена патентом Украины №64811, МПК C02F 3/32, G01N 33/18 «Способ биотестирования веществ различной природы» и патентом на изобретение 111855 C2 Украина, МПК A61K 31/53 (2006.01) C07D 487/04 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01) № а 2014 0356524 «Застосування N-циклоалкіл- або N-циклоалкаріл-2-[(8-R<sub>1</sub>-9-R<sub>2</sub>-10-R<sub>3</sub>-3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл)тіо]ацетамідів як активної основи лікарських препаратів противірусної дії щодо штамів *Influenza Virus* типів А та В».

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретическая значимость исследования заключается в формулировании методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных тест-объектов, основанных на результатах собственных экспериментальных исследований.

Проведена сравнительная оценка применимости новых люминесцентных бактерий для анализа антимикробного действия. Показаны преимущества природного штамма *P. leiognathi* Sh1, который был выбран в качестве основного тест-объекта в диссертационной работе.

Показано влияние химической структуры, физико-химических свойств на результаты оценки антимикробной активности ФС с применением природного люминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1.

Представлено обоснование применения методики биолюминесцентного анализа веществ на наличие антимикробной активности с применением тест-штамма бактерий *P. leiognathi* Sh1 путем определения валидационных характеристик.

Разработанные методики оценки антимикробной активности на основе тест-штаммов люминесцентных бактерий нашли применение в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедрах ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Полученные в рамках диссертационного исследования результаты могут стать основой для создания и внедрения новых методов биолюминесцентного анализа в фармацевтическую практику.

**Методология и методы исследования.** Методологической основой исследования является использование биолюминесцентных методов анализа для решения задач в области фармацевтической химии. Для этого были проанализированы работы отечественных и зарубежных ученых в данной области, проведены экспериментальные исследования с использованием новых природных штаммов светящихся бактерий, разработана методика биолюминесцентного анализа антимикробной активности ФС, которая прошла валидацию и была испытана при проведении скрининговых исследований.

В диссертационной работе были использованы следующие методы исследования: стандартные микробиологические методы (окраски по Граму метод луночной и дисковой

диффузии в агар, метод серийных разведений с применением в качестве тест-штаммов эталонных микроорганизмов *E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans*), определение ферментативной активности карбогидраз, оксидазы, каталазы и люциферазы, биолюминесцентный анализ (с применением в качестве тест-штаммов природных биолюминесцентных бактерий и рекомбинантных lux-биосенсоров на основе *E. coli* MG1655), определение растворимости веществ. Также был проведен общий и направленный синтез ряда производных 2-[(3-R-8-R<sub>1</sub>-9-R<sub>2</sub>-10-R<sub>3</sub>-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио]уксусной кислоты. Валидация разработанных методик биолюминесцентного анализа определения антимикробной активности ФС проведена в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV издания ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Полученные результаты исследования были статистически обработаны с использованием методов вариационной статистики, корреляционного, регрессионного и однофакторного анализов. Работа выполнена в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи РФ XIV издания.

**Связь задач исследования с планами научных работ.** Диссертационное исследование выполнено согласно тематическому плану научно-исследовательских работ Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (№ Гос. регистрации АААА-А17-117041850163-1; наименование НИОКТР «Разработка биолюминесцентных аналитических технологий на основе светящихся бактерий акваторий Черного и Азовского морей и рекомбинантных lux-биосенсоров для оценки биологического действия веществ и материалов различной природы»).

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Результаты оценки аналитических характеристик природных и генно-инженерных биолюминесцентных бактерий, таких как интенсивность люминесценции, удельная люминесценция, ЭК<sub>50</sub>, которые позволили выбрать тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 в качестве наиболее перспективного тест-объекта для изучения антимикробной активности ФС.
2. Результаты изучения чувствительности люминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 к действию различных ФС с учетом их химического строения и физико-химических свойств, которые позволили разработать методику биолюминесцентного анализа антимикробной активности.
3. Валидация разработанной методики анализа антимикробной активности ФС на основе биолюминесцентных тест-бактерий *P. leiognathi* Sh1.
4. Результаты испытания разработанной методики при проведении скрининговых исследований направленно синтезированных производных NKV на антимикробную активность с последующим подтверждением на эталонных тест-культурах микроорганизмов и с применением рекомбинантных lux-биосенсоров.
5. Технологическая схема анализа антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов.

**Достоверность научных положений и выводов.** Экспериментальные исследования проведены с использованием современного сертифицированного оборудования. Анализ экспериментальных данных осуществлен с применением методов статистической обработки, что позволяет считать полученные результаты достоверными.

**Апробация результатов исследования.** Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на ежегодных международных научно-практических

конференциях «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (с 81-й по 83-ю, 2009-2011 гг. и с 86-й по 91-ю, 2014-2019 гг, Симферополь); на XVIII Международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы инновационного развития экономики» (Ялта, 2013); на VII Съезде Российского фотобиологического общества (Шепси – Пушино, 2014); на VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015); на Всероссийской итоговой 75-ой студенческой научной конференции им. Н. И. Пирогова (Томск, 2016); на 13-м Европейском конгрессе по катализу EuroCat 2017, (Флоренция, 2017), на Научной конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых «Дни науки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского» (с I-ой по IV-ю Симферополь, 2016-2019), на IV Межвузовской научно-практической конференции «Современные проблемы фармакогнозии» (Самара, 2019), на XIV Всероссийской (88-я Итоговой) студенческой научной конференции СНО с международным участием, посвященной 90-летию Клиник СамГМУ «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты» (Самара, 2020). Проведение диссертационного исследования фрагментарно осуществлялось в рамках Итальяно-Украинского проекта «Nanostructured Materials for the Catalytic Decontamination of Chemical Warfare Agents»; проекта фундаментальных научных исследований, проводимого РФФИ и Советом министров Республики Крым «Исследование биоразнообразия светящихся бактерий прибрежных акваторий Крыма и создание Крымской коллекции культур билюминесцентных микроорганизмов Черного и Азовского морей», а так же проекта «Новые подходы к изучению биологической активности лекарственных веществ с использованием природных и генно-инженерных билюминесцентных бактерий», проходящего при финансировании Государственного Совета Республики Крым.

**Публикации.** По теме исследования автором диссертации опубликовано 25 печатных работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 1 статья в перечне ВАК по состоянию на 03.10.2014 Согласно письма Минобр науки РФ № 13-3869 от 02.10.2014, 1 статья в международных базах данных, получено 2 патента на изобретение.

**Внедрение результатов исследования.** Описанные в работе методы анализа ФС и производных NKV на основе природных и генно-инженерных люминесцентных бактерий используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре медицинской и фармацевтической химии Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского» (акты внедрения от 01.09.2021 и от 02.09.2021), в научно-исследовательской работе ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени НБС — ННЦ РАН» (акт внедрения от 16.06.2021), АО «Алуштинский эфиромасличный совхоз-завод» (акт внедрения от 30.08.2021), на кафедре базисной и клинической фармакологии Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского» (акт внедрения от 07.09.2021) и Центральной научно-исследовательской лаборатории Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского» (акт внедрения от 08.09.2021).

**Личный вклад автора.** Автору принадлежит основная роль в выполнении экспериментальных исследований, разработке методик, анализе и обобщении полученных результатов, проведении статистической обработки результатов, написании публикаций.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пункту 3 – «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления». В исследовании проводится разработка метода анализа, позволяющего проводить оценку биологически активных веществ синтетического происхождения с применением подходов, основанных на направленном изменении структуры соединения; проводится выявление связей между строением, физико-химическими и биологическими свойствами веществ, что соответствует пунктам 1 и 4 паспорта научной специальности 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки).

**Объем и структура работы.** Работа изложена на 180 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц, 23 рисунка и приложения. Диссертационная работа состоит из содержания, введения, обзора литературы, главы «Объекты и методы исследований», 3-х глав описания экспериментальных исследований, списка используемых сокращений, библиографии. Список цитированной литературы включает 267 источников, в том числе 217 – на иностранных языках.

Во **введении** обоснована актуальность темы, определены цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость.

В **главе 1** представлен обзор научной литературы, посвященный современным подходам к анализу антимикробной активности веществ различной природы с использованием как стандартных, так и биолюминесцентных тест-систем в различных форматах. Кроме того, приведен литературный обзор биолюминесцентных тест-объектов и их применения в аналитических целях.

В **главе 2** подробно описаны объекты исследования и содержатся материалы и методы использованные в рамках диссертационного исследований.

В **главе 3** изложены результаты изучения биологических и аналитических характеристик биолюминесцентных тест-объектов.

**Глава 4** посвящена разработке и обоснованию использования методики биолюминесцентного анализа для оценки антимикробной активности фармацевтических субстанций, где в качестве тест-объекта применен природный люминесцентный штамм *P. leiognathi* Sh1

В **главе 5** представлено применение разработанной методики при скрининге антимикробной активности у направленно синтезированных 2-((2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)уксусной кислоты и их производных и показан вероятных их механизм. Кроме того, представлены методические подходы к изучения антимикробной активности веществ с использованием природных и генно-инженерных биолюминесцентных тест-бактерий.

Диссертационная работа завершается заключением, общими выводами и списком литературы. В приложениях диссертации представлены акты внедрения и патенты.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Биологические и аналитические характеристики природных и генно-инженерных люминесцентных тест-объектов

В качестве тест-объектов для разработки методики оценки антимикробной активности лекарственных веществ выбраны морские биолюминесцентные бактерии. Для их выделения были проведены полевые и лабораторные исследования в прибрежных зонах акваторий Азовского и Черного морей, в ходе которых, были получены пять изолятов, обладающих стабильным свечением (табл. 1).

Таблица 1 – Данные о выделенных природных изолятах и их свойствах

Код изолята	Sh1	Fsh	F1	Wy	Ms3
Кол-во клеток, кл/мл $\times 10^8$	$2,80 \pm 0,11$	$1,72 \pm 0,23$	$2,91 \pm 0,17$	$2,38 \pm 0,27$	$4,85 \pm 0,16$
Интенсивность люминесценции, RLU $\times 10^6$	$1,09 \pm 0,15$	$0,22 \pm 0,02$	$1,19 \pm 0,21$	$0,13 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,01$
Удельная люминесценция, RLU/кл	$3,87 \times 10^{-3}$	$1,27 \times 10^{-3}$	$4,09 \times 10^{-3}$	$5,20 \times 10^{-4}$	$2,39 \times 10^{-4}$
Глицерин	+	+	-	-	+
Маннит	-	-	+	-	+
Сахароза	-	-	-	-	+
Глюкоза	+	+	+	+	+
D(+)-мальтоза	-	-	+	-	+
D(+)-манноза	+	+	+	+	+
D(+)-лактоза	-	-	-	-	-
Каталазная активность	-	-	+	-	+
Оксидазная активность	+	+	+	-	+
$T_{ER}, c^{-1}$	0,75	0,83	0,51	0,52	0,09

Примечание: «+» – положительный результат, свидетельствующий и наличии признака, «-» – отрицательный результат, свидетельствующий об отсутствии признака

На основании изучения морфо-культуральных и биохимических свойств изолятов, (табл. 1), установили их видовую принадлежность. Бактерии с кодировкой Sh1, Wy, Fsh отнесли к виду *P. leiognathi*, Ms3 к виду *V. harveyi*, а F1 к виду *A. fischeri*, соответственно. Из пяти выделенных изолятов для оценки их применимости в качестве тест-объекта использовали три штамма *P. leiognathi* Sh1, *A. fischeri* F1 и *V. harveyi* Ms3, поскольку среди представителей своих видов они обладали наибольшими показателями удельного свечения.

Выбор тест-объектов, из трех ранее отобранных, для дальнейших исследований проводили путем изучения чувствительности биолюминесценции бактерий к действию цинка сернокислого, который часто используется в качестве стандартного ингибитора их свечения [Дерябин Д. Г., 2009]. В качестве параметра, характеризующего ответную реакцию микроорганизмов, использовали величину ЭК<sub>50</sub> – эффективную концентрацию агента, снижающую свечение бактерий на 50% от контрольных значений. Расчеты показали, что средние значения ЭК<sub>50</sub> цинка сульфата для наиболее ярко светящихся тест-объектов составили: для *V. harveyi* Ms3 –  $4,08 \pm 1,26$  мкг/мл; *P. leiognathi* Sh1 –  $4,51 \pm 0,69$  мкг/мл, *A. fischeri* F1 –  $5,14 \pm 0,57$  мкг/мл. Таким образом, все три штамма

люминесцентных бактерий оказались чувствительны к действию сульфата цинка, что показало их применимость в качестве тест-объектов для дальнейших исследований.

Одним из новых, перспективных направлений в анализе антимикробной активности лекарственных веществ, включая оценку механизмов ее проявления, является использование в качестве тест-объектов рекомбинантных бактерий на основе *E. coli* MG1655 с конститутивным и индуцибельным типами билюминесценции (lux-биосенсоры) [Котова В. Ю., 2014]. В ходе работы изучены их аналитические характеристики, такие как фоновый уровень свечения, изменение свечения бактериальной культуры в присутствии сигнальных молекул, оптимальные индукторы первого типа (ИПТ) и их концентрации, время начала и достижения максимальных значений индукции. Результаты этих исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Основные аналитические характеристики lux-биосенсоров

Тип плазмиды lux-биосенсора	ИПТ	Оптимальная концентрация ИПТ, мг/мл	Время начала индукции, мин	Время достижения БЛИ <sub>max</sub> , мин	БЛИ <sub>max</sub>
1	2	3	4	5	6
Fab <sup>+</sup> ::lux	Фенол	0,01	15 ± 1	135 ± 15	1,71 ± 0,23
Ibp <sup>+</sup> ::lux	Спирт этиловый	3,84	60 ± 5	135 ± 15	1,99 ± 0,66
Grp <sup>+</sup> ::lux	Спирт этиловый	1,92	120 ± 5	165 ± 15	2,16 ± 0,50
Sox <sup>+</sup> ::lux	Пероксид водорода	0,65	30 ± 2	135 ± 15	2,35 ± 0,83
Kat <sup>+</sup> ::lux	Пероксид водорода	0,65	15 ± 1	135 ± 15	27,2 ± 10,55
Col <sup>+</sup> ::lux	Диоксидин	0,02	90 ± 5	195 ± 15	20,19 ± 3,10
Rec <sup>+</sup> ::lux	Диоксидин	0,02	60 ± 4	195 ± 15	21,09 ± 3,50

#### Оценка показателей антимикробной активности фармацевтических субстанций с использованием бактериальных билюминесцентных тест-объектов

Для разработки методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с применением бактериальных билюминесцентных тест-объектов произведена оценка их чувствительности к фармацевтическим субстанциям и изучены факторы, которые влияют на результаты анализа. Для этого, тест-штаммы, отобранные на предыдущем этапе работы, были использованы для изучения действия антибиотика широкого спектра действия – гентамицина сульфата (рис. 1).

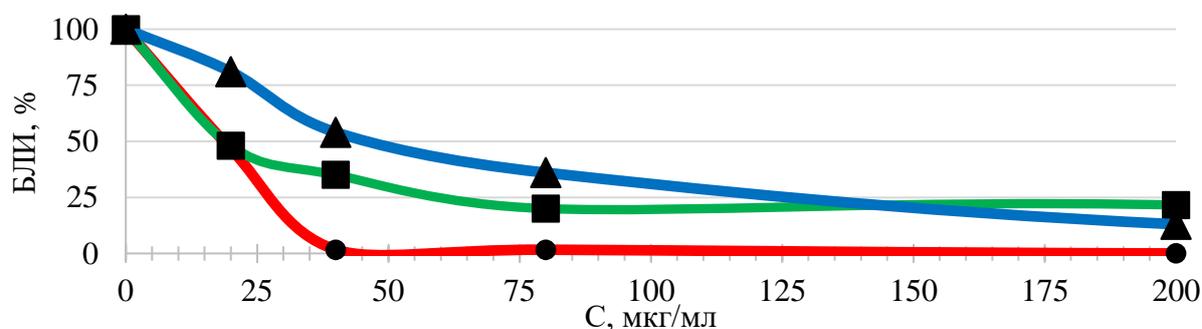


Рисунок 8 – Влияние гентамицина сульфата на билюминесценцию

● *P. leiognathi* Sh1, ■ *A. fischeri* F1 и ▲ *V. harveyi* Ms3.

По результатам тестирования установлено, что увеличение концентрации антибиотика в пробе вызывало снижение свечения бактерий, аналогичное для всех трех штаммов. ЭК<sub>50</sub> гентамицина сульфата, ингибирующие свечение *P. leiognathi* Sh1, *A. fischeri* F1 и *V. harveyi* Ms3, составили:  $18,65 \pm 0,19$  мкг/мл,  $18,8 \pm 0,57$  мкг/мл и  $45,50 \pm 1,30$  мкг/мл, соответственно. Наиболее чувствительными к данному антибиотику оказались бактерии *P. leiognathi* Sh1.

Для подтверждения возможности использования природных светящихся бактерий штамма *P. leiognathi* Sh1 в качестве тест-объекта для изучения антимикробной активности провели биотестирование антибиотиков различной химической структуры и механизмом действия. Было установлено, что ЭК<sub>50</sub> для бензилпенициллина и тетрациклина через 15 минут инкубации составили  $501,6 \pm 1,6$  мкг/мл и  $28,3 \pm 0,17$  мкг/мл (рис. 2). Для стрептомицина и цефтриаксона аналогичные значения превышали 1000 мкг/мл, что характеризовалось снижением значений БЛИ на 28,08 % и 38,65 % соответственно.

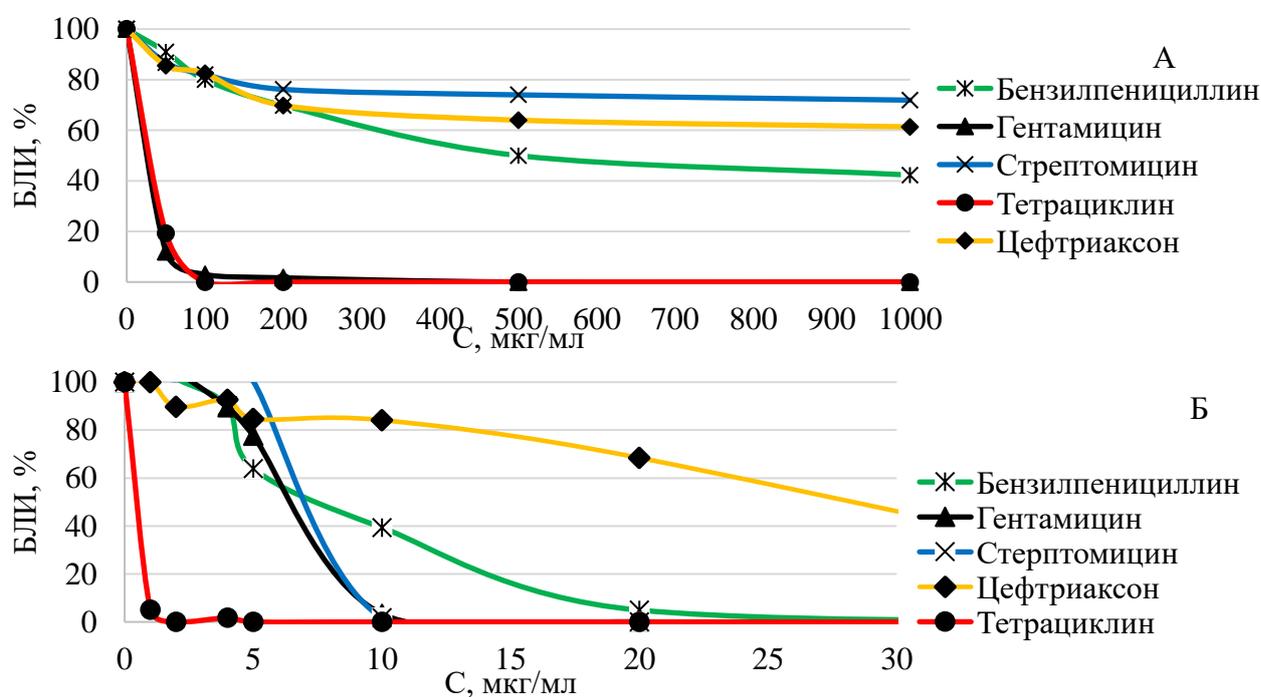


Рисунок 2 – Влияние растворов антибиотиков на люминесценцию тест-штамм *P. leiognathi* Sh1. А – 15-ти минутное действие, Б – 18-ти часовое действие.

При увеличении времени контакта антибиотика с тест-бактериями до 18 ч наблюдалось значительное снижение ЭК<sub>50</sub> бензилпенициллина, гентамицина, тетрациклина, стрептомицина и цефтриаксона в 66,9; 33,3; 142,9; 56,6 и 35,1 раз, соответственно.

Результаты проведенных исследований подтвердили данные чувствительности штамма *P. leiognathi* Sh1 к антибиотикам различной химической структуры, проявляемую в виде снижения БЛИ. Важно отметить, что если при оценке 15-ти минутного действия не удалось вывить ФС с выраженным ингибирующим действием люминесценции тест-штамма, свидетельствующим о наличии антимикробной активности, то как вспомогательный метод может быть использована оценка 18-ти часового действия, позволяющая с более высокой вероятностью показать проявления антимикробной активности.

Поскольку разрабатываемая методика предполагает определение антимикробной активности различных лекарственных веществ, на следующем этапе работы изучили влияние ряда ФС, в том числе и не антибиотиков, на люминесценцию бактерий штамма *P. leiognathi* Sh1. При этом было выявлено четыре типа проявления активности лекарственных веществ. Первая группа – сильные ингибиторы люминесценции: атропин, гентамицина сульфат, папаверина гидрохлорид, дротаверина гидрохлорид и скополамина гидробромид, для которых ЭК<sub>50</sub> через 15 минут инкубирования, составляла до 10 мкг/мл и характерна для антибактериальных препаратов (табл. 3).

Таблица 3 – Физико-химические дескрипторы и ЭК<sub>50</sub> исследуемых ФС

№ П/П	Название ФС	ЭК <sub>50</sub> , мкг/мл		Log P	MW	tPSA
		15-ти минутное действие	18-ти часовое действие			
1	Бензилпенициллин натрия	501,6 ± 1,6	7,5 ± 0,9	1,8	334,39	69,64
2	Гентамицина сульфат	18,7 ± 0,2	1,2 ± 0,4	-2,40	477,60	173,26
3	Стептомицина сульфат	>1000	7,0 ± 0,8	-7	581,58	336,43
4	Тетрациклина гидрохлорид	28,3 ± 0,2	0,5 ± 0,1	-1,14	444,44	161,39
5	Цефтриаксон	>1000	28,5 ± 1,3	-1,3	554,58	208,45
6	Атропина сульфат	3,5 ± 0,4	3,5 ± 0,4	1,67	289,37	49,77
7	Галоперидол	22,8 ± 2,3	40,1 ± 4,0	4,53	375,90	48,95
8	Дипразин	18,2 ± 1,8	11,1 ± 1,1	0,76	424,98	102,26
9	Дифенгидрамин	41 ± 4,1	10,5 ± 1,1	3,90	284,42	6,48
10	Дротаверина гидрохлорид	9,6 ± 0,9	8,0 ± 0,8	4,53	397,51	48,95
11	Лидокаин	162 ± 16,2	25,6 ± 2,6	2,41	234,34	32,34
12	Лобелина гидрохлорид	500 ± 50,0	10 ± 1,0	3,45	337,46	40,54
13	Метамизол натрия	445 ± 44,5	227,5 ± 22,8	0,06	311,36	81,16
14	Папаверина гидрохлорид	8,1 ± 0,8	7,5 ± 0,8	3,57	339,39	49,28
15	Пипольфен	11,4 ± 1,1	11,1 ± 1,1	3,90	284,42	6,48
16	Пирацетам	>1000	>1000	-1,73	142,16	63,40
17	Прокаина гидрохлорид	211 ± 21,1	226,5 ± 22,7	1,32	236,31	55,56
18	Скополамина гидробромид	0,41 ± 0,1	0,15 ± 0,1	0,53	303,35	62,30
19	Строфантин	>1000	469 ± 46,9	2,22	584,65	131,75
20	Сульфокамфорная кислота	110 ± 11,0	115,3 ± 11,5	1,32	232,30	71,44
21	Ультракаин	177 ± 17,7	46 ± 4,6	1,99	284,37	67,43
22	Унитиол	310 ± 31,0	86,2 ± 8,6	-0,22	188,30	54,37
23	Хлорпромазина гидрохлорид	19,3 ± 1,9	16,1 ± 1,6	5,23	318,86	6,48
24	Эфедрина гидрохлорид	>1000	65,3 ± 6,5	0,93	165,24	32,26

Примечание: где Log P – соотношение распределения вещества в системе октанол-вода; MW –молекулярный вес; tPSA –площадь полярной поверхности молекулы.

Вторая группа – ингибиторы люминесценции: димедрол, аминазин, дипразин, пипольфен и галоперидол. ЭК<sub>50</sub> от 10 до 100 мкг/мл. Такие концентрации характерны для веществ, обладающих высоким уровнем токсичности (тяжелые металлы и их соли, кислоты, щелочи и др.). Третья группа – умеренные ингибиторы люминесценции: лидокаин,

ультракаин, унитиол, прокаина гидрохлорид, сульфокамфокаин и метамизол натрия. ЭК<sub>50</sub> для них находилась в диапазоне концентраций от 100 до 500 мкг/мл. Такие значения ЭК<sub>50</sub> характерны для большинства веществ, обладающих антимикробным действием (и/или токсичностью). Четвертая группа – нейтральные вещества: лобелина гидрохлорид, строфантин, эфедрин гидрохлорид и пираретам, для которых при концентрациях до 1000 мкг/мл не регистрировали изменения люминесценции более чем на 20 % от контрольных значений.

При увеличении времени воздействия ФС на бактерии до 18-ти часов, в первую группу сильных ингибиторов вошли ФС: скополамина гидробромид, атропин, гентамицина сульфат, дротаверина гидрохлорид, лобелина гидрохлорид и папаверина гидрохлорид. Во вторую группу вошли димедрол, лидокаин, ультракаин, унитиол, галоперидол, аминазин, дипразин, пипольфен и эфедрин гидрохлорид. Прокаина гидрохлорид, строфантин, сульфокамфокаин и метамизол натрия составили третью группу. При этом действие пираретама практически не менялось.

Поскольку исследуемые ФС являются производными различных химических групп и некоторые из них оказывали выраженное ингибирование люминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 предприняли попытку выявить зависимость результатов антимикробного действия от физико-химических характеристик ФС, а именно значений LogP, MW и tPSA (табл. 3).

По результатам сравнения для антибиотиков наблюдали повышение значений ЭК<sub>50</sub> при увеличении значений LogP и снижение значений tPSA. Представители H<sub>1</sub>-антигистаминных средств характеризовались уменьшением значений LogP и MV в отличие от антибиотиков при повышении значений ЭК<sub>50</sub>, а увеличение tPSA приводило к росту ЭК<sub>50</sub>. Для ФС, содержащих местные анестетики, увеличение LogP приводило к увеличению значений ЭК<sub>50</sub> и не наблюдалось влияние MV, tPSA на значения ЭК<sub>50</sub> для данной группы ФС. Для ФС из группы алкалоидов выявили достоверные корреляции ЭК<sub>50</sub>, при 15 минутном взаимодействии, и tPSA равной -0,85, ЭК<sub>50</sub> при 18-ти часовой инкубации с MW на уровне -0,91, а с tPSA – -0,81.

При анализе строения изучаемых ФС выявлены некоторые структурные компоненты, обладающие антибиотической активностью, такие как фенотиазин, дифенилметан, диметиламин, орто-диметоксифенол, 1-бензилизохинолин, метокси, этокси и сульфо группы, ацетамидный участок, остаток 2-тиофенкарбоновой кислоты, содержащей 3-пропиламинбутановый радикал, хлорфенил и фторфенил. Данные структуры являются основами для синтеза инсектицидов, пестицидов, фунгицидов и противоопухолевых препаратов, а также могут прикрепляться к ферментам и изменять их активность [Maestro B., 2007; Kuo Y., 2008; Kaul M., 2014; Gull Y., 2016; Ittzes B., 2016; Nyuga S., 2017; Panchaud P., 2017; Tulgar S., 2018]. Таким образом, они могут выступать в качестве функциональных групп, которые ответственны за проявление антимикробных и токсических свойств ФС, не являющихся антибиотиками.

## **2. Методика анализа антимикробной активности фармацевтических субстанций с использованием биолюминесцентного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1**

На основании проведенных экспериментов была разработана методика оценки антимикробной активности веществ с применением природных биолюминесцентных бактерий.

Антимикробное действие анализируемой пробы на тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 определяется по снижению интенсивности биолюминесценции за 15-ти минутный период инкубации. Количественная оценка влияния антимикробной субстанции на тест-штамм выражается в виде индекса биолюминесценции «БЛИ» с функциональным параметром ЭК<sub>50</sub>. Индекс биолюминесценции «БЛИ», равный отношению БЛИ =  $I_0/I_k$  (выражается в относительных единицах) или БЛИ =  $(I_0/I_k) \times 100$  % (выражается в процентах), где  $I_0$  – интенсивность люминесценции тест-штамма в опытном образце, а  $I_k$  – интенсивность люминесценции тест-штамма в контрольном образце.

Методика допускает четыре ступени индекса БЛИ:

- 1) БЛИ менее 0,5 или 50 % при концентрации исследуемого вещества менее 10 мкг/мл в пробе – сильные ингибиторы, вещества с антимикробной активностью;
- 2) БЛИ менее 0,5 или 50 % при концентрации исследуемого вещества от 10 до 100 мкг/мл в пробе – ингибиторы, вещества с возможной антимикробной активностью, требующие оценки их биологического действия на тест-штамм с временем инкубации 18 часов;
- 3) БЛИ менее 0,5 или 50 % при концентрации исследуемого вещества от 100 до 500 мкг/мл – умеренные ингибиторы, вещества не обладают антимикробным действием;
- 4) БЛИ более 0,8 или 80 % при концентрации исследуемого вещества от 0 до 1000 мкг/мл в пробе – нейтральные вещества или ФС, снижения свечения люминесцентных бактерий не регистрируется более чем на 20% от контрольных значений, вещества не обладают антимикробным действием.

Ряд проб может вызывать увеличение люминесценции тест-штамма и регистрируемые значение индекса БЛИ более 1 или 100 %. В таком случае индекс БЛИ принимается равным 1 или 100 %.

Подготовительные работы для оценки антимикробной активности ФС должны проводиться в лабораторных условиях, исключающих возможность загрязнения проб и образцов для анализа.

Подготовка тест-бактерий штамма *P. leiognathi* Sh1 для проведения анализа осуществляется путем культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде с 3 % содержанием натрия хлорида за 18 - 24 часа до начала исследования. Все последующие разбавления полученной бактериальной суспензии и исследуемых образцов ФС проводят 3 % раствором натрия хлорида. Перед началом тестирования необходимо выдержать полученную суспензию тест-бактерий на протяжении 30 минут при постоянном перемешивании перед внесением к образцу для анализа.

Процедура оценки антимикробной активности ФС состоит из четырех этапов: подготовка образцов для анализа и тест-штамма; обработка результатов анализа; определение биолюминесцентного индекса; контроль качества методики.

В кюветы люминометра вносят по 0,85 - 0,95 мл раствора, содержащего разбавленную 1 к 40 жидкую питательную среду для культивирования микроорганизмов (Nutrient broth M002, Himedia, Индия) с конечной концентрацией натрия хлорида в пробе равной 3 % и 0 - 0,1 мл раствора исследуемого вещества. Полученные образцы выдерживают при 25 °С в течение 5 минут при постоянном перемешивании 60 об/мин на вибрационной мешалке (СВ-1, Россия) для равномерного распределения вещества в пробе. Далее вносят по 50 мкл бактериальной суспензии, содержащей  $5 \times 10^6$  клеток/мл. Образцы термостатируют при 25 °С в термостате ТСО-1/80 (СПУ, Россия) на протяжении всего периода анализа. Измерение свечения образца проводят через 15 минут от момента

внесения клеток тест-штамм в пробу с использованием подходящего биолюминометра (например, БХЛ-06, Россия).

Погрешность методики биотестирования контролируют с использованием цинка сульфата. Для этого готовят раствор соли цинка сернокислого на дистиллированной воде в концентрации, так чтобы конечная концентрация вещества в пробе составила 7,0 мкг/мл. Испытания проводят в соответствии с описанной выше методикой в трех независимых опытах. Чувствительность тест-объекта проверяют на соответствие необходимым требованиям при взаимодействии бактерий с цинком сернокислым 7-ми вводным. При этом значение БЛИ должно быть равным либо меньшим 0,5 или 50 % при концентрации сульфата цинка 7-ми водного 7,0 мкг/мл в пробе.

### 3. Определение некоторых валидационных характеристик методики биолюминесцентного анализа антимикробной активности с использованием природных люминесцентных тест-объектов

Подтверждение пригодности разработанной методики для анализа антимикробной активности ФС проводили путем определения некоторых валидационных характеристик. Определены такие показатели, как предел обнаружения (ПО), предел количественного определения (ПКО), линейность и аналитическая область при действии гентамицина сульфата на биолюминесценцию тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 (табл. 4).

Таблица 4 – Валидационные характеристики и параметры методик оценки антимикробной активности гентамицина сульфата с использованием тест-штамм *P. leiognathi* Sh1

Валидационные характеристики и параметры	Время				
	15 минут	30 минут	60 минут	18 часов	
S	0,173	0,127	0,029	0,089	
Коэффициент чувствительности, b.	-0,038	-0,059	-0,094	-1,254	
$\Delta x$ , мкг/мл.	$\pm 0,238$	$\pm 0,204$	$\pm 0,097$	$\pm 0,171$	
$\bar{\varepsilon}$ , %.	8,046	7,314	3,278	8,813	
ПО, мкг/мл.	15,046 $\pm$ 0,217	7,088 $\pm$ 0,245	1,046 $\pm$ 0,037	0,236 $\pm$ 0,146	
ПКО, мкг/мл.	45,594 $\pm$ 9,119	21,478 $\pm$ 4,296	3,171 $\pm$ 0,634	0,715 $\pm$ 0,143	
Линейность методики	$y = -0,038 \times x + 4,516$	$y = -0,059 \times x + 4,551$	$y = -0,094 \times x + 4,707$	$y = -1,254 \times x + 4,639$	
Коэффициент детерминации, R <sup>2</sup> .	0,992	0,993	0,999	0,829	
Аналитическая область, мкг/мл	от	15,046 $\pm$ 0,217	7,088 $\pm$ 0,245	1,046 $\pm$ 0,037	0,236 $\pm$ 0,146
	до	119,463 $\pm$ 3,671	76,354 $\pm$ 1,824	50,129 $\pm$ 0,693	3,699 $\pm$ 0,259

На основании полученных результатов установлено, что при увеличении времени инкубации наблюдается снижение показателей ПО и ПКО (в 2 - 63 раза), стандартного квадратичного отклонения (S), полуширины доверительного интервала ( $\Delta x$ , мкг/мл), относительной ошибки результата среднего определения, ( $\bar{\varepsilon}$ , %) и незначительное увеличение значений коэффициента детерминации (табл. 4.). Одновременно происходит уменьшение аналитической области валидируемых методик.

Таким образом, оптимальными условиями анализа антимикробной активности с использованием биолюминесцентных тест-бактерий *P. leiognathi* Sh1 можно считать 15

минутное биотестирование, при котором сохраняется линейная зависимость ( $R^2 = 0,992$ ) в аналитической области от  $15,046 \pm 0,217$  мкг/мл до  $119,463 \pm 3,671$  мкг/мл.

#### 4. Испытание биолюминесцентного метода на основе природных люминесцентных тест-бактерий для скрининга направленно синтезированных производных 2-[(3-*R*-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-*C*]хиназолин-6-ил)-тио]уксусных кислот (NKV) на наличие антимикробной активности

На следующем этапе работы провели испытания разработанной методики для скрининга антимикробной активности. В качестве тестовой группы веществ использованы направленно синтезированные производные 2-[(3-*R*-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-*C*]хиназолин-6-ил)-тио]уксусных кислот (NKV). Для их получения применена методика направленного синтеза *N*-арил-(бензил-, фенитил-)2-[(3-*R*-9-*R*<sub>1</sub>-10-*R*<sub>2</sub>-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-*C*]хиназолин-6-ил)тио]уксусных кислот и их тиацетамидных производных с последующей модификацией структуры молекулы путем дополнительного введения галогенов как в триазиновый фрагмент, так и в фенильный заместитель в положении 3, что должно привести к усилению ранее выявленных видов биологической активности для данной группы веществ [Böhm, H. – J., 2004, Nagmann, W. K., 2008, Verest, G. G., 2010]

Синтезированные соединения (NKV 42-54, 67) – светло-желтые (42, 43, 46, 47, 48, 50, 51, 53, 54, 67), желтые (44, 49), белые с желтым оттенком (45), оранжевые (52) амфотерные вещества, растворимые в ДМФА, мало растворимые в диоксане, спиртах, не растворимы в хлороформе и диэтиловом эфире. Для анализа на антимикробную активность соединения NKV 42-54, 67 очищены переосаждением. Синтезированные соединения (29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71) – желтые кристаллические вещества, растворимые в ДМФА, мало растворимые в диоксане и спиртах, практически нерастворимые в воде. Соединения 29, 32, 34, 58, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71 не давали депрессии температуры плавления, а также имели одинаковые хроматомасс-спектральные данные, что служит доказательством их чистоты [Nosulenko I. S., 2014].

Обобщённые результаты анализа производных NRV на наличие антимикробной активности с использованием разработанного биолюминесцентного метода представлены на рисунке 4 в виде зависимости БЛИ от концентрации вещества.

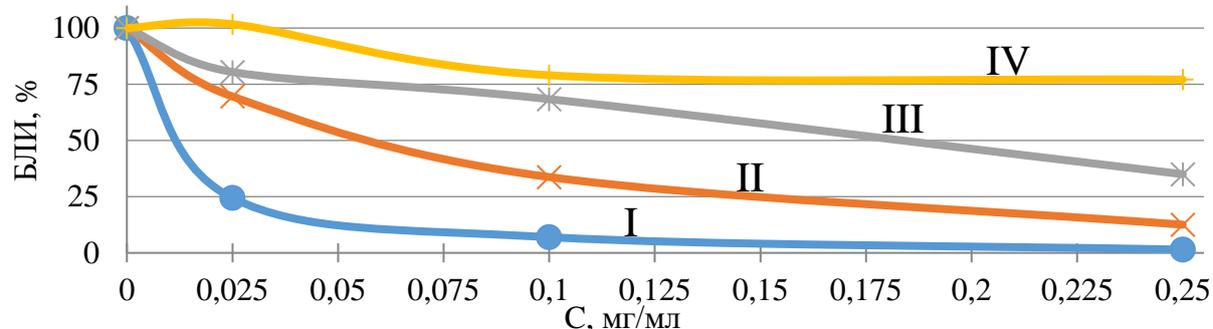


Рисунок 4 – Зависимость интенсивности люминесценции от концентрации производного NKV в пробе. I – «нейтральные вещества»; II – «слабые ингибиторы»; III – «умеренные ингибиторы»; IV – «сильные ингибиторы»

На основании полученных данных все производные NKV можно разделить на 4 группы по величине  $ЭК_{50}$ , аналогично проведенным ранее исследованиям антимикробной

активности ФС. В группу «нейтральные вещества», ЭК<sub>50</sub> свыше 0,25 мг/мл вошли представители NKV – 29, 33, 34, 36, 38, 40, 56, 57, 62, 63, 68, 69. Группа «слабые ингибиторы» (ЭК<sub>50</sub> от 0,175 мг/мл до 0,25 мг/мл), состоит из NKV – 30, 32, 35, 37, 39, 55, 61. Группа «умеренные ингибиторы» (ЭК<sub>50</sub> от 0,05 мг/мл до 0,1 мг/мл), состоит из NKV – 31, 58, 60, 64, 65, 66, 70, 71. Группа «сильные ингибиторы» (ЭК<sub>50</sub> меньше 0,025 мг/мл), состоит из NKV – 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 67. Сопоставимые результаты показали и данные, полученные при оценке 18 часового действия производных NKV.

Сравнения структуры и биоактивности NKV выявили ряд зависимостей. Увеличение влияния NKV на БЛИ непосредственно связано с изменением числа галогенов от 1 до 6 единиц в структуре соединения с учетом индивидуальных физико-химических свойств атомов в ряду йод, бром, хлор, фтор. Замещение атома водорода на галоген в 9 положении относительно основной гетероциклической цепи производных NKV характеризуется более сильным снижением люминесценции, чем в 10. Определили, что 2-[(3-R-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)-тио]уксусные кислоты являются более сильными ингибиторами бактериальной люминесценции штамма *P. leiognathi* Sh1, чем их тиацетамиды. Выявлена группа производных 2-((9-R<sub>1</sub>-10-R<sub>2</sub>-3-(4-R<sub>3</sub>-фенил)-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)уксусных кислот, которые являются сильными ингибиторами биолюминесценции тест-бактерий и могут обладать антимикробной активностью.

### 5. Сравнение результатов антимикробного действия NKV и их производных в отношении тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 с данными об их активности относительно эталонных тест-культур микроорганизмов и панели генно-инженерных lux-биосенсоров на основе *E. coli*.

Для подтверждения полученных данных, на следующем этапе работы оценивали влияние производных NKV с наиболее выраженным антимикробным действием в отношении штамма *P. leiognathi* Sh1 на генно-инженерный люминесцентный штамм *E. coli* (Xen<sup>+</sup>::lux), а также на рост эталонных культур микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Антибактериальная и противогрибковая активность 2-[(3-R-8-R<sub>1</sub>-9-R<sub>2</sub>-10-R<sub>3</sub>-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио]уксусных кислот

№ NKV	<i>P. leiognathi</i> Sh1	<i>E. coli</i> MG1655 (Xen <sup>+</sup> ::lux)	<i>E. coli</i>		<i>St. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	
			ЭК <sub>50</sub> , мкг/мл	ЭК <sub>50</sub> , мкг/мл	МИК, мкг/мл	МБК, мкг/мл	МИК, мкг/мл	МБК, мкг/мл	МИК, мкг/мл	МФК, мкг/мл
44	10,91±1,64	101,55±11,16	100,0	200,0	100,0	200,0	100,0	200,0	50,0	50,0
45	9,45±0,45	103,14±11,34	100,0	200,0	200,0	200,0	100,0	200,0	50,0	200,0
47	9,47±0,45	164,58±18,11	100,0	200,0	12,5	25,0	200,0	200,0	25,0	50,0
51	31,32±6,06	339,67±37,36	200,0	200,0	100,0	200,0	100,0	200,0	50,0	100,0
52	29,12±4,71	208,68±22,95	200,0	200,0	12,5	50,0	100,0	200,0	100,0	100,0
67	9,85±0,78	423,37±46,57	100,0	200,0	50,0	200,0	100,0	200,0	100,0	100,0

В ходе исследования установили, что все производные NKV из группы «сильные ингибиторы» снижают свечение тест-штамма *E. coli* MG1655 (Xen<sup>+</sup>::lux) от 20 до 98 %, что подтверждает результаты определения их антимикробной активности, полученные с применением природного люминесцентного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1.

По результатам оценки антибактериальной и противогрибковой активности шести производных NKV, представленные в таблице 5, установили, что NKV-47 и 52 эффективно ингибируют и подавляют рост штамма *St. aureus*.

Производные NKV-44, 45, 47, 51 эффективно ингибируют рост штамма *C. albicans*. Производное NKV-67 также обладало противомикробной активностью в отношении эталонных тест штаммов, но при более высоких концентрациях. Также следует отметить, что исследованные производные мало эффективны против стандартных штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa*.

Для определения возможного механизма антимикробной активности, выявленной у производных NKV, дальнейшие исследования проводили с использованием батареи из 7 рекомбинантных lux-биосенсоров, обладающих индуцибельным типом люминесценции. Было установлено, что антибактериальный эффект производных NKV 44, 45 связан с ДНК-тропным действием. NKV-42, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 53 характеризовались прооксидантным действием. Повреждение клеточных белков могли вызывать производные 47, 51, а повреждение мембран клеток NKV-42, 43, 46, 53.

При сравнении строения производных NKV и результатов оценки их вероятных механизмов антимикробной активности при взаимодействии lux-биосенсорами установили, что наличие тиацетатной функциональной группы приводило к увеличению БЛИ у *E. coli* MG1655 с pKatG-lux и/или pSoxS-lux. Однако при биотестировании на *E. coli* MG1655 (Kat<sup>+</sup>::lux) оказывали влияние производные, содержащие атом галогена в 10 положении главной гетероциклической цепи, а на *E. coli* MG1655 (Sox<sup>+</sup>::lux) в 9 положении. Усиление окислительного стресса регистрировали у производных NKV содержащих метокси-группу в пара-положении фенильного радикала. В тоже время замещение метокси на метильную группу приводит к снижению влияния на указанные плазмиды. Атома фтора, в 4-м положении фенильного радикала, приводит к снижению всех видов изученных эффектов. Атома галогена в 9-м положении основной цепи способствует проявлению у производных ДНК-тропных эффектов, а в десятом – мембранотропного действия. Наиболее электроотрицательного атома галогена, йода, в десятом положении приводит к выраженному увеличению БЛИ до 22,65 у lux-биосенсора с плазмидой pIbpA-lux.

## **6. Методические подходы к изучению антимикробной активности веществ с использованием природных и генно-инженерных билюминесцентных тест-бактерий**

Представленные результаты собственных исследований по оценке аналитических характеристик генно-инженерных люминесцентных тест-объектов на основе *E. coli* MG1655 и природного билюминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1 и его применимости для анализа антимикробной активности ФС, разработанная методика билюминесцентного анализа антимикробной активности антибиотиков и фармацевтических субстанций с не антибактериальной активностью, оцененные валидационные характеристики данной методики позволяют предложить следующий подход к изучению антимикробной активности лекарственных веществ, представленный в виде технологической схемы (рис. 5).

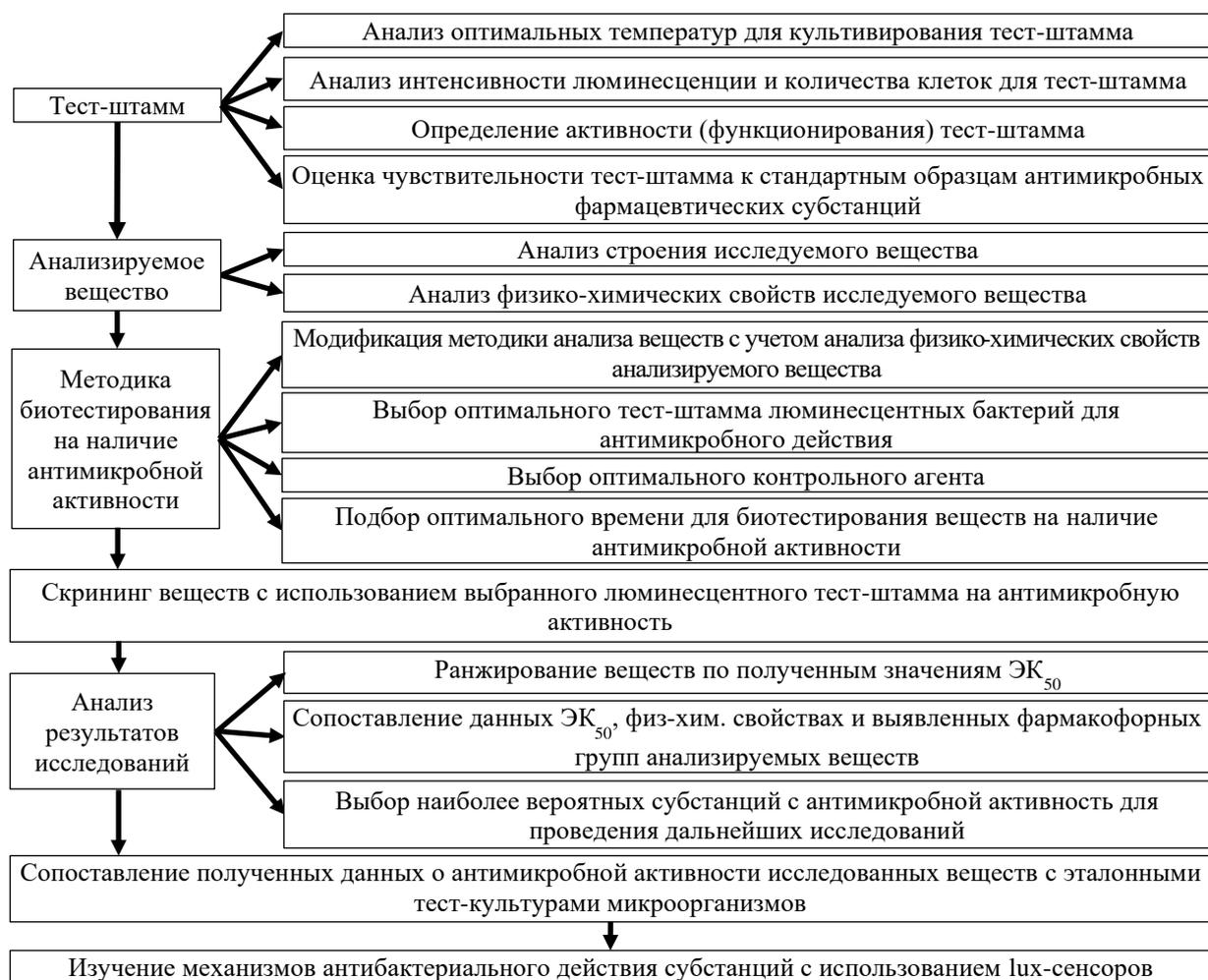


Рисунок 5 – Технологическая схема анализа веществ на наличие антимикробной активности с использованием биолюминесцентных тест-объектов

На первом этапе анализа веществ на наличие антимикробного действия проводится оценка таких ключевых характеристик исследуемого вещества, как растворимость в растворителях, значение рН и солености растворов, которые образуются при растворении вещества, а также провести расчет физико-химических параметров и определить фармакофорные группы при известном строении исследуемого соединения. Провести модификацию разработанной методики оценки антимикробной активности веществ с учетом полученных данных из предыдущего анализа таким образом, чтобы исключить влияние всех факторов, кроме биологического действия анализируемого вещества, на свечение тест-штамма бактерий. Параллельно проводится выбор оптимального штамма светящихся бактерий для оценки как специфического антибактериального, так и не специфического антимикробного действия путем сравнения влияния «эталонных» веществ на свечение тест-штамма. Отбор наиболее перспективного тест-штамма проводится на основании таких показателей, как оптимальная температура тестирования, стабильность свечения культуры бактерий при воздействии растворителя, применяемого для растворения анализируемого вещества, а также минимальная эффективная концентрация «эталонного» вещества, снижающей свечение бактерий более чем на 80 % от контрольных значений.

После подбора условий для проведения анализа и выбора тест-штамма проводится скрининг антибиотических эффектов анализируемых веществ. По результатам проведенного скрининга вещества ранжируются по ЭК<sub>50</sub>, что позволяет отобрать вещества,

для которых эффективная концентрация, снижающая свечение, характерна для известных «эталонных» веществ (антибиотиков) или превосходит ее.

На следующем этапе проводится сопоставление ранее определенных физико-химических параметров и фармакофорных групп анализируемых веществ с результатами скрининга антимикробной активности веществ – ЭК<sub>50</sub>. После определяют вещества, которые зарекомендовали себя как наиболее вероятные субстанции с антимикробной активностью, и, для них, проводится сопоставление полученных данных об их антимикробной активности с их антимикробной активностью в отношении эталонных культур микроорганизмов. После чего для наиболее активных веществ (проявляющих выраженную антимикробную активность в отношении все применённых в предыдущих исследованиях микроорганизмов) проводится определение механизмов их антибактериального действия с использованием бактерии lux-сенсоров. После проведенных аналитических и статистических анализов делают заключение об отсутствии или наличии антимикробной активности у исследованных соединений и вероятных механизмах их антибактериального действия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований по разработке методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных тест-объектов были сделаны следующие выводы:

1. Показана применимость биолюминесцентных бактериальных тест-объектов для анализа антимикробной активности ФС. Из акваторий Черного и Азовского морей выделены 5 природных изолятов светящихся бактерий, проведена их видовая идентификация, изучены ряд биологических и аналитических характеристик. Также были проанализированы 8 штаммов рекомбинантных люминесцентных бактерий (lux-биосенсоры) на основе *E. coli*, выявлена их применимость для определения некоторых специфических видов антимикробной активности.

2. Изучено антимикробное действие 24 ФС различных фармакологических групп по их влиянию на биолюминесценцию бактерий *P. leiognathi* Sh1, выбранных в качестве тест-объекта. Определены значения ЭК<sub>50</sub>, на основе которых проведена классификация ФС. Выделены 4 группы веществ, обладающих сильным, средним и умеренным антимикробным действиями, а также нейтральные ФС. Установлено, что среди лекарственных веществ, которые не относятся к антибиотикам, может наблюдаться некоторая антимикробная активность, которая связана с особенностями химического строения и может быть проявлением токсичности.

3. На основе полученных данных о действии ФС на биолюминесценцию тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, а также о влиянии на результаты тестирования физико-химических свойств (LogP, MV, tPSA) и химической структуры лекарственных веществ, разработана методика биолюминесцентного анализа антимикробной активности ФС.

4. Проведена оценка валидационных характеристик разработанной методики биолюминесцентного анализа антимикробной активности с использованием гентамицина сульфата. Установлено, что при времени регистрации аналитического сигнала в течение 15 минут аналитическая область имеет линейный характер от  $15,046 \pm 0,217$  до  $119,463 \pm 3,671$  мкг/мл, описывается уравнением  $y = -0,038 \times x + 4,516$  с коэффициентом детерминации 0,99 и характеризуется ПО =  $15,046 \pm 0,217$  мкг/мл и ПКО =  $45,594 \pm 9,119$  мкг/мл.

5. Разработанная методика анализа антимикробной активности ФС с использованием биолюминесцентных бактерий *P. leiognathi* Sh1 была испытана при проведении скрининговых исследований 42-х направленно синтезированных производных 2-[(3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-C]хиназолин-6-ил)-тио]уксусных кислот (NKV). Выявлено, что группа веществ (NKV 42-54, 67), которые ингибировали люминесценцию тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 (ЭК<sub>50</sub> от 0,1 до 0,25 мг/мл), проявляют высокую противомикробную активность в отношении рекомбинантных бактерий *E. coli* MG1655 (Xen<sup>+</sup>::lux) и эталонных микроорганизмов *E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans*.

6. Проведены дополнительные исследования антимикробной активности 14-ти производных NKV с использованием рекомбинантных lux-биосенсоров на основе *E. coli* MG1655 с индуцибельным типом биолюминесценции. Выявлены наиболее вероятные механизмы антимикробной активности веществ: ДНК-тропное действие (NKV – 44, 45); окислительный стресс (NKV – 42, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 53); повреждение белков (NKV – 47, 51) и мембран клеток (NKV – 42, 43, 46, 53).

7. В результате проведенных исследований сформированы методические подходы к изучению антимикробной активности веществ с использованием природных и генно-инженерных биолюминесцентных тест-бактерий, составлена технологическая схема проведения анализа.

**Практические рекомендации.** По результатам диссертационной работы предложены практические рекомендации: использовать разработанные методические подходы для анализа других групп ФС, а также увеличить количество представителей исследованных фармакологических групп с применением данных подходов; полученные результаты рекомендуется принимать во внимание при разработке и изучении новых антибактериальных веществ и научно-исследовательской работе; использовать разработанные методики для определения механизмов антимикробной активности у известных ФС.

**Перспективы дальнейшей разработки темы.** Основываясь на результатах проведенных исследований, представленный алгоритм анализа антимикробной активности субстанций и методики оценки антимикробной активности фармацевтических субстанций с использованием биолюминесцентных тест-объектов, которые могут найти применение в скрининговых исследованиях. Разработанные методические подходы возможны к применению для анализа как у известных ФС, так и у вновь синтезируемых веществ для выявления у них антимикробной активности. Полученные результаты могут способствовать подтверждению прогнозируемой антимикробной активности при анализе с использованием моделей SAR и QSAR.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Сафронюк, С. Л. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из акватории Черного и Азовского морей [Текст] / С. Л. Сафронюк, Э. Т. Шарипов, А. М. Кацев // Аспирантский вестник Поволжья. – 2017. – № 5–6. – С. 19–23.
2. Сафронюк, С. Л. Применимость рекомбинантных lux-биосенсоров для выявления некоторых механизмов антибактериальной активности направленно синтезированных производных 2-((2-оксо-3-фенил-2H-[1,2,4]триазино[2,3-C]хиназолин-6-ил)тио)уксусной кислоты [Текст] / С. Л. Сафронюк, Ю. Ю. Гавриченко, А. М. Кацев // Биофармацевтический журнал. – 2020. – Т. 12. № 5. – С. 26–32.

3. Сафронюк, С. Л. Использование билюминесцентных бактерий для оценки антибиотических эффектов лекарственных препаратов [Текст] / С. Л. Сафронюк, Ю. Ю. Гавриченко, А. М. Кацев // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 1. – С. 194–203

4. Кацев, А. М. Билюминесцентный подход с использованием светящихся бактерий к исследованию лекарственных препаратов [Текст] / А. М. Кацев, Е. Г. Мельниченко, С. Л. Сафронюк, И. Э. Цокало // Проблемы, достижения и перспективы развития медико–биологических наук и практического здравоохранения. Тр. Крым. Мед. ин-та. – 2009. – Т. 145. Ч. 5. – С. 37–40.

5. Кацев, А. М. Оценка применимости билюминесцентного анализа при определении активности лекарственных препаратов [Текст] / А. М. Кацев, С. Л. Сафронюк, И. Е. Цокало, А. В. Шереметьева, Н. Ф. Стародуб // Ветеринарна біотехнологія. 2013. – Т. 22 (22). – С. 188–195.

6. Starodub, N. F. Determination of binding parameters of Miramistin to serum albumin by the bioluminescent method [Text] / N. F. Starodub, E. R. Abduramanova, A. M. Katsev, M. V. Taran, S. L. Safronyuk // Advances in biological chemistry. – 2014. – Vol. 4(5). – P. 331–338.

7. Nosulenko, I. S. [(9–R1–10–R2–3–R3–охо–2Н–[1,2,4]triazino[2,3–с]quinazolin–6–yl)thio]acetamides derivatives with the fragments of carcass amines / I. S. Nosulenko, O. YU. Voskoboynik, G. G. Berest [et al.] // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2014. – Т. 12, № 1(45). – С. 17–27

8. Nosulenko, I. S. Synthesis and antimicrobial activity of 6–Thioxo–6,7–dihydro–2Н–[1,2,4]triazino[2,3–с]quinazolin–2–one derivatives [Text] / I. S. Nosulenko, O. Y. Voskoboynik, G. G. Berest [et al.] // Sci Pharm. 2014. – Vol. 24;82(3). – P. 483–500.

9. Сафронюк, С. Л. Оценка влияния заместителей в гетерофункциональных производных 1,2,4–триазинохиназолинтоиуксусной кислоты на билюминесценцию бактерий [Текст] / С. Л. Сафронюк, Т. В. Крамарь, М. В. Назаренко // Вестник Томского государственного университета. Химия. – 2016. – Т. 4 № 6. – С. 39–49

10. Сафронюк, С. Л. Оценка применимости природных люминесцентных бактерий, выделенных из Азовского и Черного морей, для определения антимикробной активности антибиотиков [Текст] / С. Л. Сафронюк, В. В. Самолук, А. М. Милова, Ю. Ю. Гавриченко, А. М. Кацев // Аспирантский вестник Поволжья. – 2020. – Т. 20. № 5-6. – С. 175-183.

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

Тезисы в материалах конференций и съездов.

1. Сафронюк, С. Л. Ингибирование люминесценции светящихся бактерий под действием лекарственных препаратов различных фармакологических групп [Текст] / С. Л. Сафронюк, Л. Р. Гафарова // Материалы 81 международной научно–практической конференции «Теоретические и практические аспекты современной медицины». – 2009. – С. 87–88

2. Сафронюк, С. Л. Определение концентрации гентамицина сульфата в плазме крови при проведении фармакокинетических исследований билюминесцентным методом [Текст] / С. Л. Сафронюк // Материалы 82 международной научно–практической

конференции «Теоретические и практические аспекты современной медицины». – 2010. – С. 140

3. Сафронюк, С. Л. Сравнительная оценка спектрофотометрического и биолюминесцентного методов при количественном анализе хлоргексидина [Текст] / С. Л. Сафронюк // Материалы 83 международной научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты современной медицины». – 2011. – С. 169-170

4. Сафронюк, С. Л. Проведение фармацевтического анализа с использованием светящихся бактерий и его экономическое обоснование [Текст] / С. Л. Сафронюк, А. М. Кацев, Л. М. Прилепа // Материалы XVIII Международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы инновационного развития экономики» – 2013. – С. 260.

5. Сафронюк, С. Л. Исследование зависимости биологической активности производных 1,2,4-триазинов от их структуры и физико-химических свойств с использованием морских светящихся бактерий [Текст] / С. Л. Сафронюк, Л. М. Прилепа, И. С. Побегайлов // Материалы 86 международной научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты современной медицины». – 2014. – С. 142

6. Сафронюк, С. Л. Изучение ферментативных свойств штаммов светящихся бактерий, выделенных из черного и азовского морей [Текст] / С. Л. Сафронюк, Л. М. Прилепа // Материалы 86 международной научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты современной медицины». – 2014. – С. 143

7. Сафронюк, С. Л. Идентификация бактерий, выделенных из Азовского и Черного морей / С. Л. Сафронюк, Л. М. Прилепа, Н. А. Расулов // Материалы 86 международной научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты современной медицины». – 2014. – С. 143

8. Кацев, А. М. Биоаналитические аспекты использования светящихся бактерий Черного и Азовского морей в медико-биологических исследованиях [Текст] / А. М. Кацев, Э. Р. Абдураманова, С. Л. Сафронюк // Материалы VII Съезда Российского фотобиологического общества. – 2014. – С. 106.

9. Сафронюк, С. Л. Оценка биологически активных производных 1,2,4-триазинохиназололин-2-онов биолюминесцентным методом с последующий поиск отношения "Структура-эффекта" [Текст] / С. Л. Сафронюк // Материалы VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». – 2015. – С. 273–274.

10. Писачева, А. О. Установление соотношений структура биологический эффект 1,2,4-триазинохиназолинтиоуксусных кислот биолюминесцентным методом [Текст] / А. О. Писачева, Б. Р. Нурмамбетова, С. Л. Сафронюк // Материалы 87-й конференции студентов и молодых ученых медицинской академия имени С. И. Георгиевского, "Теоретические и практические аспекты современной медицины". – 2015. – С. 127.

11. Сафронюк, С. Л. Изучение зависимости биологической активности производных 1,2,4-триазинохиназолинтиоуксусной кислоты от их строения с использованием люминесцентных бактерий [Текст] / С. Л. Сафронюк, Э. Т. Шарипов, Т. В. Крамарь // Материалы 88-й международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Теоретические и практические аспекты современной медицины». – 2016. – С. 112–113.

12. Крамарь Т. В. Изучение биологического действия нанопроизводных бентонита биоаналитическими технологиями на основе *Photobacterium leiognathi* Sh1

[Текст] / Т. В. Крамарь, С. Л. Сафронюк // Сборник материалов Всероссийской итоговой 75-я студенческой научной конференции им. Н. И. Пирогова под ред. Г. Э. Черногорюка. – 2016. – С. 377-378.

13. Сафронюк, С. Л. Новые подходы к оценке взаимосвязи строения и специфической активности веществ на примере производных 1,2,4-триазинохиназолин-2-онов [Текст] / С. Л. Сафронюк, А. М. Кацев // Сборник трудов V Научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых. – 2019. – С. 126–131.

14. Сафронюк, С. Л. БиOLUMиНесцентные аналитические технологии быстрой оценки антибактериальной активности лекарственных веществ [Текст] / С. Л. Сафронюк, А. М. Кацев // Сборник «Современные проблемы фармакогнозии. IV Межвузовская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 100-летию Самарского государственного медицинского университета; под общ. ред. В. А. Куркина. – 2019. – С. 80–85.

### Патенты

1. Пат. №64811 Україна, C02F 3/32, G01N 33/18. Способ биотестирования веществ различной природы [Текст] / Кацев А. М., Абдураманова Е. Р., Чорний П. В., Сафронюк С. Л. (UA); заявл. 15. 03. 2011; опубл. 25. 11. 2011, Бюл. №22. – С. 4

2. Пат. №111855 Україна, C2 A61K 31/53 (2006. 01) C07D 487/04 (2006. 01) A61P 31/16 (2006. 01). Застосування N-циклоалкіл- або N-циклоалкаріл-2-[(8-R1-9-R2-10-R3-3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл)тіо]ацетамідів як активної основи лікарських препаратів проти вірусної дії щодо штамів Influenza Virus типів А та В. Коваленко С. І., Воскобойнік О. Ю., Носуленко І. С., Берест Г. Г., Кацев А. М., Сафронюк С. Л. (UA) заявитель патентообладатель Запорізь. держ. мед. ун-т. – № а 2014 0356524 ; заявл. 07. 04. 2014; опубл. 24. 06. 2016, Бюл. № 12. – 12 с.