

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. И. ВЕРНАДСКОГО»
МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
На правах рукописи

САФРОНИУК СЕРГЕЙ ЛЕОНИДОВИЧ

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

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Кацев Андрей Моисеевич
доктор биологических наук,
профессор

Симферополь – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ВЕЩЕСТВ, В ТОМ ЧИСЛЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	16
1.1. Диффузионные методы оценки антимикробной активности веществ	16
1.2. Методы разведений для оценки антимикробной активности веществ	18
1.3. Проточный цитофлуориметрический метод	22
1.4. Биолюминесцентный анализ.....	22
1.4.1 Биолюминесцентные тест-объекты и их применение в аналитических целях	23
1.4.2. Аналитические характеристики биолюминесцентных тест-объектов	25
1.4.3. Применение биолюминесцентных бактерий в аналитических целях	27
1.4.4. Применение биолюминесцентных бактерий для выявления зависимости химическая структура–физико-химические свойства–активность.....	35
Выводы по главе 1	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1. Объекты, материалы исследования	42
2.2. Методы исследования.....	45
2.2.1. Методы оценки биологических и аналитических характеристик природных биолюминесцентных тест-объектов.....	45
2.2.2. Методики биотестирования с использованием природных биолюминесцентных тест-объектов.....	47
2.2.3. Рекомбинантные lux-биосенсоры и методика биотестирования с их использованием	48
2.2.4. Анализ антибактериального и противогрибкового действия синтезированных производных NKV с использованием эталонных тест-культур микроорганизмов.....	50
2.2.5. Изучаемые валидационные характеристики биолюминесцентного метода анализа.....	50
2.2.6. Математические и статистические методы	52

ГЛАВА 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИРОДНЫХ И ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ	53
3.1. Биологические характеристики биолюминесцентных бактерий, выделенных из Азовского и Черного морей	54
3.2. Аналитические характеристики природных люминесцентных тест-бактерий	57
3.2.1. Определение некоторых валидационных характеристик методики биолюминесцентного анализа антимикробной активности с использованием природных люминесцентных тест-объектов	59
3.3. Генно-инженерных люминесцентные тест-объекты и их аналитические характеристики	61
Выводы по главе 3	65
ГЛАВА 4. ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ	67
4.1. Изучение антимикробной активности антибиотиков с использованием природных биолюминесцентных тест-бактерий	68
4.2. Изучение антимикробной активности фармацевтических субстанций, не антибиотиков, с использованием природных биолюминесцентных тест-бактерий	72
4.3. Оценка влияния физико-химических свойств и химической структуры фармацевтических субстанций на показатели антибактериальной активности ФС с использованием биолюминесцентных тест-объектов	79
4.4. Методика анализа антимикробной активности фармацевтических субстанций с использованием биолюминесцентных тест-объектов	87
4.5. Определение некоторых валидационных характеристик методики биолюминесцентного анализа антимикробной активности антибиотиков	91
4.6. Технологическая схема анализа антимикробной активности фармацевтических субстанций с использованием биолюминесцентных тест-объектов	94
Выводы по Главе 4	97

ГЛАВА 5. 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-С]ХИНАЗОЛИН-6-ИЛ)-ТИО]УКСУСНЫХ КИСЛОТ (NKV) НА НАЛИЧИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ	98
5.1. Описание, растворимость и физико-химические свойства 3-R-6-тио-6,7-дигидро-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-2-онов и их галогенсодержащих аналогов.....	98
5.2. Изучение возможности использования растворов NKV и их производных в диметилсульфоксиде (ДМСО) для биотестирования с применением биолюминесцентных тест-объектов.....	103
5.3. Скрининг антимикробной активности направленно синтезированных NKV и их производных с использованием природного тест-штамма <i>P. leiognathi</i> Sh1 и рекомбинантного lux-биосенсора <i>E. coli</i> MG1655 с плазмидой <i>Xen`::lux</i> с последующей оценкой ее взаимосвязи со строением NKV и их производных....	104
5.4. Сравнение результатов оценки антимикробной активности направленно синтезированных NKV и их производных с использованием биолюминесцентных тест-объектов со стандартными эталонными штаммами бактерий.....	118
5.5. Изучение антимикробной активности направленно синтезированных NKV и их производных с использованием рекомбинантных lux-биосенсоров	121
5.6. Методические подходы к изучению антимикробной активности веществ с использованием природных и генно-инженерных биолюминесцентных тест-бактерий	125
Выводы по главе 5.....	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	130
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	135
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	167
Приложение 1. Морфо-культуральные свойства выделенных светящихся микроорганизмов.....	167

Приложение 2. Акты о внедрении результатов диссертационного исследования.....	169
Приложение 3. Патент на изобретение «Застосування N-циклоалкіл- або N-циклоалкаріл-2-[(8-R ₁ -9-R ₂ -10-R ₃ -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».....	179
Приложение 4. Патент на полезную модель «Способ биотестирования веществ различной природы».	180

ВВЕДЕНИЕ

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. [Ozcelik 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 [Nijs A., 2003; Егоров Н.С., 2004].

Одним из новых подходов, используемых при изучении антибиотического действия веществ, является биолюминесцентный 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 обладая рядом таких преимуществ, как высокая чувствительность, экспрессность и экономическая эффективность, что нашло широкое практическое применения 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 биолюминесцентного анализа оценки антимикробной активности веществ

различного химического строения с применением биолюминесцентных 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.

Биолюминесцентные методы анализа широко используются в экологических и токсикологических исследованиях для определения загрязнённости 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 биолюминесцентных методов в медико-биологических и фармацевтических целях как для качественного и количественного анализа, так и для оценки антимикробного действия веществ различного происхождения [Bisio C., 2016; Arakawa H., 2017; Neale P. A., 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 O. A., 2010; Roda A., 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-2H-[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-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 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 биolumинесцентных 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 биolumинесцентного 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 биolumинесцентного анализа в фармацевтическую практику.

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования является использование биolumинесцентных 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 биolumинесцентного

анализа антимикробной активности ФС, которая прошла валидацию и была испытана при проведении скрининговых исследованиях.

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-R₁-9-R₂-10-R₃-2-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, ЭК₅₀, 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 EuroraCat 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 биолюминесцентных микроорганизмов Черного и Азовского морей», а так же проекта «Новые подходы к изучению биологической активности лекарственных веществ с использованием природных и генно-инженерных биолюминесцентных 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.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ВЕЩЕСТВ, В ТОМ ЧИСЛЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Одной из актуальных задач фармацевтической химии как науки является как качественный и количественный анализ лекарственных субстанций (ЛС) и их препаратов, который направлен на контроль качества ЛС и регламентируется на территории РФ согласно ГОСТ Р 52249 «Правила производства и контроль качества лекарственных средств» и приказом Минпромторга России 14 июня 2013 г. N 916 (в ред. Приказа Минпромторга России от 18.12.2015 N 4148), так и оценка антимикробной активности лекарственных веществ. На этапе контроля качества лекарственных субстанций и их препаратов оцениваются такие показатели, как описание, растворимость, подлинность, температура плавления, прозрачность раствора, цветность раствора, pH, термическая устойчивость, родственные примеси, сульфатная зола, тяжелые металлы, потеря в массе при высушивании, бактериальные эндотоксины, микробиологическая чистота, количественное определение и условия хранения. Важным показателем является биологическая активность лекарственной субстанции. Существует огромное разнообразие методов, направленных на оценку биологического действия ЛС. Антимикробная активность антибиотиков определяется диффузией в агар на плотной питательной среде [7]. Существуют и другие подходы к оценке антимикробной активности веществ, в частности, диффузионные методы, методы разведения, тонкослойная хроматография (ТСХ) с биоавтографией, проточный цитофлуориметрический метод и биолюминесцентный анализ.

1.1. Диффузионные методы оценки антимикробной активности веществ

Наиболее известными методами оценки антимикробной активности веществ *in vitro* являются диско-диффузионный метод и методы серийных разведений в бульоне или агаре. Диско-диффузионный метод, разработанный в 1940 г. [145], является официальным методом и используется во многих лабораториях клинической микробиологии для рутинного тестирования антимикробной

активности препаратов [7, 92, 95]. С помощью этого метода проведена стандартизация тестирования антимикробных свойств веществ для таких патогенов, как стрептококки, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Neisseria meningitidis* с использованием специальных питательных сред, различных условий инкубации и критериев интерпретации зон ингибирования [95]. Анализ с применением диско-диффузионного метода дает качественные результаты, классифицируя бактерии на чувствительные, промежуточные или устойчивые [86, 161]. Поскольку подавление роста бактерий не всегда сопровождается их гибелью, этот метод не может различить бактерицидные и бактериостатические эффекты. Диско-диффузионный метод не подходит для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) ЛС, так как невозможно количественно определить содержание антимикробного агента, диффундировавшего в агаровую среду. Для некоторых микроорганизмов и антибиотиков приблизительный МИК рассчитывается путем сравнения зон ингибирования с имеющимися данными [207]. Тем не менее, диско-диффузионный метод имеет такие преимущества, по сравнению с другими методами, как простота исполнения, низкая стоимость, возможность тестирования большого количество антимикробных агентов на различных микроорганизмах и простоту интерпретации полученных результатов [101, 102, 118, 177], которая связана с хорошей корреляцией между данными *invitro* и *in vivo* [86].

Другим подходом, применяемым для оценки антимикробной активности веществ, является E-test (метод антимикробного градиента). Он сочетает в себе принципы методов разбавления и диффузионных методов для определения значений МИК. E-test основан на возможности создания градиента концентраций исследуемого антимикробного агента в агаризованной среде. Он используется для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотиков, противогрибковых и антибактериальных средств [143]. Значение МПК определяется на пересечении полосы и эллипса ингибирования роста. Исследования показали хорошую корреляцию между значениями МПК, определенными с помощью E-test, и значениями, полученными с помощью методов

серийных разведений, путем разбавления бульона или агара [61, 70, 137]. E-test также можно использовать для исследования совместной антибактериальной активности нескольких лекарственных препаратов [104, 136, 265].

В исследовательских лабораториях используются дополнительные диффузионные методы для оценки антимикробной активности веществ, такие как методы диффузии в агар и перекрестной полосы.

Метод диффузии в агар широко используется для оценки антимикробной активности веществ различной природы [7, 93, 259]. Аналогично процедуре, используемой в диско-диффузионном методе, поверхность чашки с агаром инокулируется путем распределения объема микробного инокулята по всей поверхности агара. Затем пробивается отверстие диаметром от 6 до 8 мм в асептических условиях стерильным пробоотборником или наконечником и в лунку вводится объем (20–100 мл) противомикробного агента в необходимой концентрации. После чашки с агаром инкубируют в подходящих для тестируемого микроорганизма условиях. Антимикробный агент диффундирует в агаровую среду и подавляет рост тестируемого штамма микробов.

Методы дисковой диффузии перекрестных полос часто используется для выявления антагонизма между микроорганизмами [109, 160], процедура исследований аналогична той, что используется в диско-диффузионном методе.

1.2. Методы разведений для оценки антимикробной активности веществ

Методы разведений являются наиболее подходящими для определения значений МИК, поскольку они дают возможность оценить концентрацию тестируемого антимикробного агента в агаре (агаровое разведение) или бульонной среде. Для количественного измерения антимикробной активности веществ *in vitro* в отношении бактерий и грибов используются методы серийных разведений в бульоне или агаре. Регистрируемое значение МИК определяется как самая низкая концентрация антимикробного агента, подавляющая видимый рост тестируемого микроорганизма, обычно выражается в мг/мл или мг/л. Разработка таких

методологических стандартов не гарантирует клиническую значимость такого тестирования. Тем не менее, он позволяет проводить биотест в рамках стандартизированного подхода для оценки клинической значимости результатов [225].

Минимальная бактерицидная концентрация (МБК) или минимальная фунгицидная концентрация (МФК), также известная как минимальная летальная концентрация (МЛК), являются наиболее распространенными характеристиками при оценке бактерицидной или фунгицидной активности веществ. МБК определяется как самая низкая концентрация противомикробного агента, необходимая для уничтожения 99,9 % конечного инокулята после инкубации в течение 24 часов в стандартных условиях, описанных в документе M26-A [93]. МФК также определяется как самая низкая концентрация лекарственного средства, которая приводит к смерти 98 - 99,9 % клеток бактерий по сравнению с исходным посевным материалом [55].

Метод разбавления агаром предполагает включение необходимых концентраций антимикробного агента в расплавленную агаровую среду, обычно с использованием серийных двукратных разведений с последующим посевом определенного микробного инокулята на поверхность чашки с агаром. Конечная точка МИК регистрируется как самая низкая концентрация противомикробного агента, которая полностью подавляет рост при подходящих условиях инкубации.

Этот метод подходит для тестирования как антибактериальных, так и противогрибковых препаратов и хорошо коррелирует с методами дисковой диффузии, микроразведений и E-test при тестировании антибактериальной активности как на грамположительных, так и на грамотрицательных бактериях [61].

Микро- или макроразбавление бульона – один из основных методов определения как чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам, так и оценки их антимикробной активности. Процедура включает приготовление двукратных разведений противомикробного агента в жидкой питательной среде, разливаемой в пробирки, содержащих его минимальный объем.

Каждую пробирку или лунку инокулируют микробным посевным материалом, приготовленным в той же среде после разведения стандартизированной микробной суспензии, доведенной до 0,5 шкалы Макфарланда. После тщательного перемешивания засеянные пробирки или 96-ти луночный планшет для микротитрования инкубируют (в основном без перемешивания) в подходящих условиях в зависимости от тестируемого микроорганизма. МИК определяется как самая низкая концентрация противомикробного агента, которая полностью подавляет рост микроорганизмов в пробирках или лунках для микроразбавлений, обнаруживаемых невооруженным глазом [7, 94]. Основными недостатками метода макроразбавления являются утомительные ручные операции, риск ошибок при приготовлении большого количества проб для каждого теста, сравнительно большое количество реактивов и необходимое пространство [161]. Основными преимуществами метода микроразбавления является воспроизводимость и экономия реагентов и пространства, возникающая из-за миниатюризации теста [53, 76, 87, 180, 186, 203, 214, 234].

Тем не менее, на результат исследования значительное влияние оказывают условия проведения тестирования, которые необходимо тщательно контролировать для получения воспроизводимых внутри- и межлабораторных результатов [7, 93]. Хорошо известно, что размер посевного материала [127], тип питательной среды [201], время инкубации и подход к приготовлению посевного материала влияют на значения МИК [129, 241]. Поэтому разбавление бульона стандартизировано для тестирования бактерий, которые растут в аэробных условиях, дрожжей и мицелиальных грибов [7].

Использование time-kill теста и проточных цитофлуориметрических методов, которые способны предоставить информацию о природе ингибирующего эффекта (бактерицидный или бактериостатический) у тестируемого микроорганизма применяют для углубленного изучения антибактериального или противогрибкового действий исследуемых веществ.

Тест time-kill – это метод определения бактерицидного или фунгицидного эффекта, используется для получения информации о динамическом

взаимодействии между антимикробным агентом и микробным штаммом. Тест time-kill показывает зависящий от времени или зависящий от концентрации антимикробный эффект [225]. Для бактерий этот тест хорошо стандартизирован и описан в литературе. Обычно бактерицидный эффект достигается при процентной летальности 90 % в течение 6 часов, что эквивалентно 99,9 % летальности в течение 24 часов [177]. Метод можно использовать для определения синергизма или антагонизма между лекарствами (двумя или более) в комбинациях [225, 265], а также для исследования противогрибковых веществ [121, 170].

В 1946 году Гудолл и Леви [130] объединили метод бумажной хроматографии с контактной биоавтографией для обнаружения различных пенициллинов. После этого Фишер и Лотнер [121] представили метод тонкослойной хроматографии в этой же области. Для исследования антимикробной активности соединений с помощью такого подхода описаны три метода: диффузия в агаре, прямая биоавтография и анализ наложения агара.

Метод распространения в агаре, также известный как контактный агар, является наименее используемым. Он включает в себя перенос путем диффузии антимикробного агента с хроматограммы на пластину с агаром, ранее засеянную тестируемым микроорганизмом. Через несколько минут или часов после диффузии хроматограмма удаляется и пластина с агаром инкубируется. Зоны задержки роста появляются в местах контакта антимикробных соединений со слоем агара [197].

Среди этих трех методов прямая биоавтография – наиболее часто применяемый метод [105]. Для визуализации роста микробов используют соли тетразолия [78, 197], а для обеспечения лучшего прилегания к пластине для ТСХ и поддержания соответствующей влажности для роста бактерий рекомендовано применение бульона Мюллера-Хинтона с добавлением агара [246].

Прямая биоавтография может использоваться как для грибов, так и для бактерий. Это самый простой метод обнаружения противогрибковых веществ, который дает стабильные результаты для спорообразующих грибов, таких как *Aspergillus*, *Penicillium* и *Cladosporium* [140, 150, 151, 250].

Биоанализ с наложением агара, известный как иммерсионная биоавтография, можно рассматривать как гибрид обоих предыдущих методов [197]. Как прямая биоавтография, он применяется ко многим микроорганизмам, включая *Candida albicans* [63] и плесень [198].

1.3. Проточный цитофлуориметрический метод

В последние годы многими учеными для исследования антибактериальной и противогрибковой активности используется метод проточной цитометрии многих препаратов [131, 132, 220, 231]. Имеются данные об исследованиях эффективности проточного цитометра в качестве инструмента для тестирования антибактериального действия эфирных масел против *Listeria monocytogenes* [220]. Быстрое обнаружение поврежденных клеток обеспечивается благодаря использованию соответствующих красителей [231, 232]. Проточный цитофлуориметрический метод позволяет выявить устойчивость к противомикробным препаратам и оценить влияние тестируемой молекулы на повреждение клеток тестируемого микроорганизма [253], а также дает воспроизводимые результаты (2 – 6 часов по сравнению с 24 – 72 часами для метода микроразбавления) [231].

1.4. Биолюминесцентный анализ

Биолюминесцентный анализ имеет широкий спектр применений, таких как исследование цитотоксичности [99], оценка *in situ* влияния биопленок [77] и скрининг лекарственных веществ на *Leishmania* [218]. Он использовался несколькими авторами в антибактериальных [120] и антимикобактериальных тестах [65, 119, 123, 212]. Экспрессность – одно из преимуществ этого метода, позволяющее получать достоверные количественные результаты анализа. В ряде исследований показано, что в антибактериальных тестах время получения результатов занимает от 15 до 60 минут, [74, 75, 127, 206], в то время как для традиционных методов определения противомикробной активности оно составляет 16 – 18 часов [7]. В некоторых исследованиях, направленных на изучение

противотуберкулезной активности препаратов, продемонстрировано, что этот метод позволяет получить результаты от через 3 – 5 дней в сравнении с общепринятым методом разведения, который требует от 3 – 4 недель инкубации [65, 212]. Преимущество билюминесцентного метода анализа заключается еще и в том, что он используется для антимикробного тестирования *in vivo* и *in situ* [263].

1.4.1 Билюминесцентные тест-объекты и их применение в аналитических целях

Люминесценция – это оптическое излучение, возникающее при поглощении энергии возбуждения, которое может длиться от 10^{-10} секунд до нескольких часов. В зависимости от типа источника люминесценции выделяют фотолюминесценцию, (свет), электролюминесценцию (электрическое поле), рентгенолюминесценцию (рентгеновские лучи) и хемилюминесценцию (химические реакции). Для нас представляет интерес билюминесценция, являющаяся частным случаем хемилюминесценции [22].

Билюминесценция – это свечение живых организмов различных систематических групп (бактерий, грибов, моллюсков, насекомых и рыб), возникающее в результате протекания химических реакций. Его появление происходит в результате преобразования химической энергии в световую за счёт внутриклеточных метаболических процессов [3, 144].

Билюминесценция представляет собой форму хемилюминесценции, генерируемой светящимися организмами, которые представлены большим количеством видов и 800 различными родами [8, 248]. Светлячки являются одними из первых живых организмов, на которых изучено возникновение люминесценции. В результате трудоёмких исследований выяснено, что ее появление происходит в результате биохимической реакции, где основными её источниками являются АТФ, ион Mg^{2+} , молекулярный кислород, фермент люцифераза и субстрат органической природы – люциферин [226]. Другими представителями, способными к билюминесценции, являются грибы, свечение которых описывали

Макэлрой и Эйрт, ещё в 1959 году доказавшие существование люминесценции экстрактов из светящихся грибов [213].

Одними из самых распространенных светящихся организмов являются люминесцентные бактерии, большинство из которых – представители морей [8]. Биолюминесцентные бактерии представлены шестью родами: морскими *Aliivibrio*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella*, наземным родом *Photorhabdus*, а также не культивируемым родом *Candidatus photodesmus* [8, 115, 127, 149, 183, 195, 252]. Ферментная система люминесцентных бактерий, направленная на испускание света, представлена ферментом люциферазой [79, 113]. В результате химической реакции происходит окисление восстановленного флавинмонокнуклеотида FMN-H₂ до FMN и образование кванта света (рисунок 1).

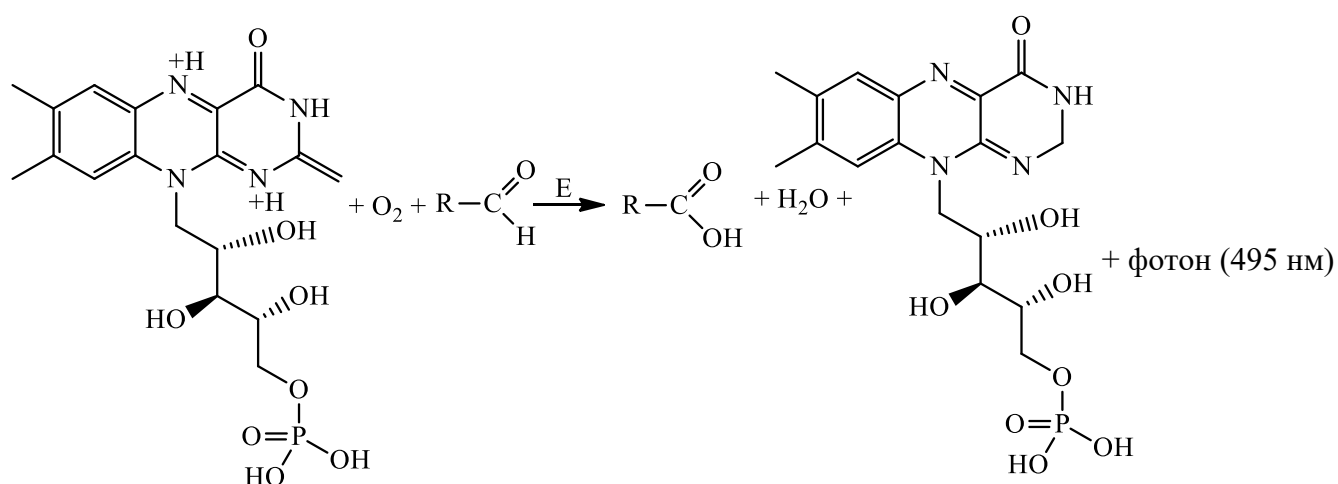


Рисунок 1 – Реакция биолюминесценции светящихся бактерий, где E – люцифераза, RCHO – алифатический альдегид, RCOOH – жирная кислота, образующаяся при окислении альдегида.

Впервые феномен бактериальной люминесценции применён в исследовательских целях М. Бейеринком в 1902 г. В его работах продемонстрирована дыхательная активность хлоропластов с применением известной зависимости биолюминесценции от присутствия кислорода. Позднее, в 30 – 40-х гг. XX в., свечение бактерий было использовано в аналитических целях для определения наркотических средств, токсинов и антибиотиков [8, 12, 17, 52].

1.4.2. Аналитические характеристики биолюминесцентных тест-объектов

На протяжении нескольких десятков лет в качестве биотестов для решения многих фундаментальных задач в области медицины и фармации применяются люминесцентные бактерии [8, 12, 17, 52, 56, 74, 75, 107]. Такое предпочтение аргументируется множеством преимуществ тестов на основе светящихся бактерий, например, высокой чувствительностью, быстротой реакции, простотой использования, незначительными материальными затратами [134]. В исследованиях с использованием биолюминесцентных тест-объектов применяют как культивируемые в лаборатории, так и лиофилизированные бактерии. Они одинаково подходят для тестирования образцов, и их чувствительность практически эквивалентна. Одной из важных аналитических характеристик, как для свежих, так и лиофилизированных люминесцентных тест-объектов, является интенсивность излучаемого света. Характеристики свечения у различных тест-объектов могут отличаться, поскольку эмиссия света зависит от протекающих химических реакций внутри бактериальной клетки, их механизмов, условий окружающей среды и времени [75]. Кинетика эмиссии света у свежих и лиофилизированных бактерий различна, но аналитическая информация очень похожа. Свежие культуры демонстрируют максимальное испускание света в конце фазы экспоненциального роста, то есть примерно через 18 часов в случае роста при комнатной температуре или выше, и через более длительное время, когда температура роста ниже оптимальной. Для свежих бактерий тенденция значений эмиссии света будет смещаться к более низкому уровню в течение времени анализа, тогда как для лиофилизированных, регидратированных бактерий, обычно называемых «восстановленными», люминесценция будет повышаться с увеличением жизнеспособности и количества бактерий. В работе L. Bolelli и соавторов [74] с точки зрения интенсивности и стабильности светового сигнала оптимальные результаты получены восстановлением лиофилизированных бактерий за день до экспериментальной сессии путем добавления минимального объема стерильной воды к лиофилизату и последующим разбавлением полученной

суспензии культуральным бульоном [75]. За это время бактерии полностью восстанавливают жизнеспособность, которая сопровождается постоянным излучением света как при острых (5 - 60 мин.), так и при хронических (12 - 24 ч.) испытаниях. Такие «препараты» можно использовать без потери активности и чувствительности в течение одной недели после восстановления при температуре хранения 4 °C [75].

При использовании культивируемых в лаборатории люминесцентных бактерий физико-химические параметры морской зоны, из которой они были получены, должны быть известны и учтены при планировании исследований и анализе проб в лаборатории [8]. Ведущим фактором, влияющим на стабильность свечения природных светящихся тест-бактерий, является осмотическое давление раствора, в котором проводится анализ. Для поддержания осмотического давления эквивалентного осмотическому давлению морской воды, из которой были отобраны бактерии, необходимо дополнительное введение солей. Однако дополнительное введение в пробу солей меняет условия тестирования, сокращая растворимость некоторых органических веществ и, следовательно, это должно быть принято во внимание при подготовке к исследованию. В тех случаях, когда изменения физико-химических параметров пробы отличны от стандартных, указанных в документации, регламентирующей проведение биотестирования с использованием природных люминесцентных бактерий, рекомендуется провести тест, чтобы определить минимально возможное количество солей, которое необходимо добавить. Однако в большинстве исследований для поддержания необходимого осмотического давления в пробе при проведении тестирования используется раствор натрия хлорида. Также для поддержания стабильного излучения света рекомендуется вводить ионы, такие как K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} в случае, если они еще не присутствуют в тестируемом растворе (образец с добавлением бактериальной суспензии). Конечное осмотическое давление раствора может различаться в зависимости от вида бактерий и исходной солености окружающей среды. Особое внимание следует уделить оценке солености воды и ионного состава образцов с высоким общим содержанием растворенных твердых веществ при их

подготовке к биотестированию с использованием природных люминесцентных бактерий [233].

Другим фактором, влияющим на стабильность свечения светящихся тест-бактерий, является температура. Биолюминесцентные бактерии, полученные из теплой морской воды, могут быть использованы в лабораторных условиях при комнатной температуре. В то же время тест-системы на основе штаммов светящихся бактерий с другим температурным оптимумом требуют стабилизации температуры при проведении исследований, что приводит к необходимости термостатирования систем с анализируемыми образцами, а также постоянный контроль температуры [8, 75].

Таким образом, свечение тест-объектов как аналитическая характеристика биолюминесцентных бактерий является достаточно изученным явлением, которое имеет свои закономерности. Для достижения наиболее достоверных результатов, при использовании как свежих, так и лиофилизированных люминесцентных тест-объектов в аналитических целях необходимо учитывать и тщательно контролировать условия тестирования.

1.4.3. Применение биолюминесцентных бактерий в аналитических целях

Бактериальная люминесценция обладает высокой чувствительностью к действию различных биологически активных соединений, что проявляется в ее угнетении или усилении. Стандартный анализ с использованием люминесцентных тест-объектов позволяет установить как острое действие исследуемых веществ на клетку (5 - 60 мин), так и хроническое действие (12 - 24 ч.). Такой подход к тестированию дает возможность динамически анализировать токсичность образца в отношении клетки и способствует выявлению веществ, которые могут влиять на биохимические пути, поддерживающие долгосрочные процессы (рост и размножение). Необходимость одновременного выполнения анализа в остром и хроническом варианте тестирования можно избежать в случае, если исследуемый образец имеет заведомо известную структуру, механизм и время действия [154].

При проведении тестирования на биolumинесцентных бактериях необходимым условием выполнения исследования является контроль условий тестирования, которые могут повлиять на точность проведения анализа, например, колебания pH раствора и осмотического давления, обусловленные внесением высокой концентрации исследуемых химических веществ [63, 122, 141, 233].

В работах Ю. А. Владимирова и др. [3], Д. Г. Дерябина [8], А. М. Кацева [17], Э. К. Родичевой и соавторов [29] отмечается необходимость соответствия контрольных и анализируемых проб по их физико-химическим свойствам. Авторами показано, что эталонным образцом может быть только бактериальный раствор с добавлением идентичного к исследуемым образцам состава пробы для анализа. При анализе объектов окружающей среды оптимально использовать образцы воды, почвы или отложений, которые имеют те же характеристики, что и анализируемые образцы, но не содержат исследуемых ксенобиотиков (загрязняющих, токсичных веществ). Использование физиологического раствора или культурального бульона в качестве эталонной пробы не будет отражать реальную картину ингибирования или стимуляции, создаваемые естественными компонентами матрицы пробы (ионами, питательными веществами и т.д.). Анализируя качество воды поверхностных водоемов, следует помнить, что реакция теста зависит от температуры, концентрации кислорода и состава фитопланктона [149].

В работе Sh. A. Hassan изучалась целесообразность использования сред с низким содержанием органических веществ, которые при исследовании токсичности тяжелых металлов в образцах могут приводить к их адсорбции и осаждению и тем самым, — приводить к искажению результатов оценки биологического действия [142].

В исследовательских работах сообщается о трудностях, которые выявлены при изучении мутных или темных образцов, таких как стоки с заводов по окрашиванию тканей. При изучении действия таких образцов на биolumинесцентные бактерии часть свечения поглощается вследствие мутности и окраски образцов. В качестве одного из способов решения этой проблемы

предложено поместить бактерии в контакт с образцом, центрифугировать пробу, а затем ресуспендировать осадок в чистой морской воде. После этого проводить измерение излучения света ресуспендированных контрольных образцов и испытуемых образцов для оценки ингибирующего действия [116].

Светопоглощающий эффект цветных образцов может быть оценен с использованием кюветы с двойными стенками, как предложено в процедуре ISO 11348-3: 2008 [154]. Образец добавляют во внешнюю камеру, а взвесь бактерий – во внутреннюю, и проводят измерение ослабления излучения света по сравнению с излучением, полученным из прозрачного солевого раствора. Анализ проводится с неразделенными бактериями и образцом, а кюветы с двойными стенками выступают в качестве одного из контролей.

Альтернативный подход к измерению мутных и окрашенных образцов заключается в проведении биологического анализа в режиме кинетики, но для этого измерения люминометр должен быть оснащен дозатором, контроллером и смесителем [184, 185]. При этом исследование почв и отложений может быть проведено при помощи модифицированного твердофазного анализа. Для этого исследуемые образцы смешивают с физиологическим раствором в соотношении 1:5 (вес/объем) или выше. Затем готовят несколько серийных разведений и проводят тестирование на бактериях. Фильтрация необходима для удаления твердых остатков перед измерением интенсивности излучения света. Незагрязненные эталонные образцы почв и отложений следует использовать в качестве контрольных образцов. В данном варианте анализа гидрофильные или гидрофобные характеристики загрязняющих веществ являются ограничивающим фактором при определении их общей токсичности. Гидрофобные химические вещества могут быть экстрагированы подходящим растворителем (метанолом, этанолом) и затем разбавлены в хлориде натрия до тех пор, пока концентрация растворителя не опустится в диапазон 1 - 3 % в зависимости от устойчивости к растворителям конкретных бактерий [124, 128]. Обнаружено, что состав отложений влияет на показатели токсичности: высокое содержание ила или глины в осадке снижает значения эффективной концентрации образца, вызывающий

угнетение свечения суспензии бактерий на 50 % по сравнению с контролем (EC_{50}), т.е. результаты исследования указывают на более высокую токсичность в отношении отложений без ила или глины, но с тем же уровнем содержания ксенобиотиков [237].

Определение токсического действия соединений, присутствующих в твердом образце, требует стадии экстракции физиологическим раствором или иным растворителем при исследовании гидрофобных аналитов. Это имело место в исследованиях при определении концентрации антибиотиков в экскрементах животных [74]. В этом случае эталонным образцом был разбавленный экстракт из экскрементов животных, получавших тот же корм, но без содержания антибиотиков.

Несмотря на преимущества использования биолюминесцентного метода анализа на основе светящихся бактерий существуют некоторые отрицательные стороны данного метода, связанные с нестабильностью ферментных систем под влиянием различных неблагоприятных факторов, таких как изменение температурного оптимума, значений pH, осмотического давления и др. факторов. В таком случае возможны колебания уровня биолюминесценции, что может приводить к неточностям при проведении исследований. Однако Galiger C. и соавторы [113] предложили способ снизить влияние отрицательных факторов на ферментные системы с помощью применения в качестве носителей полисахаридных (крахмальных) и желатиновых (полипептидных) гелей, обладающих нейтральностью и нетоксичностью для ферментной системы бактерий.

Несмотря на указанные выше недостатки, использование люминесцентных бактерий в качестве биотестов достаточно широко распространено в биологических методах анализа [8, 29, 100]. Биолюминесцентные бактерии применяются для определения концентрации кислорода в различных средах, поскольку люминесценция без участия кислорода невозможна [8, 22]. Также данные биотесты широко используют при изучении токсичности загрязняющих веществ окружающей среды [29, 50, 154, 157]. Люминесцентные бактерии все чаще

используются в качестве чувствительных элементов биосенсора для оценки активности антибиотиков и других лекарственных препаратов [8, 59, 74, 75].

Применение природных морских люминесцентных бактерий является простым и экспрессным методом в случае анализа водных образцов. Анализ проводят следующим образом: определенный объем бактериальной суспензии помещают в контакт с раствором испытуемого образца и сравнивают зарегистрированную интенсивность света с эталонным контрольным образцом (бактериальная суспензия в растворе, свободном от аналитов).

Согласно современным литературным сведениям, биолюминесцентные методы широко используются в аналитической химии, экологии и токсикологии в мониторинге окружающей среды. Биолюминесцентные бактерии применяются не только для обнаружения промышленных и городских загрязнителей в окружающей среде, но также для оценки токсичности некоторых природных соединений или поверхностно-активных веществ [16, 165, 187, 202, 206]. Биолюминесцентные тесты позволяют оценить токсичность лекарственных средств или отходов фармацевтических предприятий, образовавшихся во время их разработки и производства [227, 240].

Влияние ксенобиотиков на излучение света в соответствии с процедурой ISO 11348-3 [154] выражается в относительных единицах (%) ингибирования света в фиксированное время по отношению к контрольным образцам. Согласно данной процедуре, значения эффективной концентрации образца (ЕС), вызывающие угнетение свечения биосенсора на 20 % или 50 % по сравнению с контролем, (ЕС₂₀ или ЕС₅₀) можно рассчитать с соответствующим доверительным интервалом или оценить с помощью системы координат (графически). В работе М. Azimova и коллег [59] представлен практический пример такой обработки данных о токсичности. Значения ЕС могут быть рассчитаны и использованы в разное время после добавления образца и при сравнении с другими биотестами. Для нелинейного регрессионного анализа доступны различные модели в стандартных графических или статистических программных пакетах. Они основаны на функциях нормального распределения (анализ Пробита), логистического распределения

(анализ Логита) или распределения Вейбулла [60, 155]. Надежность тестов с использованием люминесцентных бактерий неоднократно оценивалась, например, путем определения значений EC_{50} для стандартных растворов ксенобиотиков и сопоставления их с единицами токсичности, о которых сообщили Фарре и Барсело [116]. Тем не менее, вредные воздействия на биоту, измеренные биолюминесценцией, можно сравнить только с теми, которые определены другими биоанализами, основанными на водных или наземных организмах.

Различные биотесты неоднократно сравнивались на основе соответствующих значений EC_{50} . В работах Dalzell, D. J. B. A [100], Kaiser, K. L. E. [163], Padrtova, R. R. и соавт. [217] и Ren, S. И соавторов [236] подчёркивается существенная корреляция между результатами стандартных тестов на токсичность и данных, полученных с помощью анализа биолюминесценции. Попытки сравнения с млекопитающими, такими как крыса и мышь, обнаружили лучшую корреляцию с данными LC_{50} (смертельная концентрация, которая убивает 50 % обработанных особей) для внутривенного пути введения [163]. Более того, тест на ингибирование биолюминесценции *Aliivibrio fischeri* очень часто оказывался более чувствительным для токсических веществ, чем стандартные тесты [100, 217]. С другой стороны, такая высокая чувствительность делает анализ трудновыполнимым для исследования высокотоксичных образцов [236].

Тест-системы, основанные на излучении света люминесцентными бактериями, применяются в качестве чувствительного, быстрого и неинвазивного анализа в различных областях [81, 82]. Существуют биолюминесцентные цельноклеточные биосенсоры – lux-биосенсоры, разработанные с использованием генно-инженерных микроорганизмов для мониторинга загрязнения органическими веществами, пестицидами и тяжелыми металлами [21]. Микроорганизмы, используемые в этих биосенсорах, обычно производятся с помощью сконструированной плазмиды, в которой гены, кодирующие люциферазу, помещены под контроль промотора, распознающего интересующий аналит. Когда такие бактерии метаболизируют органические загрязнители, механизм генетического контроля также включает синтез люциферазы [21, 199].

Типичным примером является *Pseudomonas fluorescens* НК44, биолюминесцентный биореporter на основе lux, который способен излучать свет при воздействии нафталина, салицилата и других замещенных аналогов [146, 238]. В свою очередь, большое количество факторов окружающей среды вызывает реакцию теплового шока [58]. Соответственно, штаммы *E. coli*, содержащие промотор теплового шока *grpE*, *dnaK* или *lon*, в комбинации с репортером lux, увеличивают биолюминесценцию в ответ на многие химические вещества [66, 260].

Lux-биосенсоры широко исследовались для обнаружения тяжелых металлов, таких как Hg^{2+} [46], Zn^{2+} [112], хромат-арсенат меди [83], Ni^{2+} и хромат [223], антимонит и арсенит [230] и Cd^{2+} и Pb^{2+} [254]. Престон и др. [228] оценили токсичность тяжелых металлов, таких как Zn, Cu и Cd, по отдельности и в комбинации, используя два люминесцентных микробных биосенсора из разных экологических ниш: *Escherichia coli* HB101 pUCD607 и *Ps. fluorescens* 10586 pUCD607. Между токсическими эффектами Zn и Cu, а также комбинаций Zn и Cd происходили значительные синергетические взаимодействия [228].

Bundy J. и соавт. [80] изучали токсичность двух распространенных оловоорганических загрязнителей и продуктов их начального распада (трибутилолова, дибутилолова, трифенилолова и дифенилолова). Данные продукты оценивали в экстрагированных почвенных растворах с использованием двух различных биолюминесцентных микробных биосенсоров: Microtox и lux-модифицированного *P. fluorescens* pUCD 607. Два биосенсора показали разные ответы, при этом Microtox был более чувствителен к триорганотинам, а *P. fluorescens* – к диорганотинам.

В работе Fabricant J. D. и соавт. [114] показана реакция биолюминесцентного штамма *E. coli* на несколько биоцидов, которая оказалась быстрой и чувствительной к низким концентрациям этих веществ в пробе. Растворители, применяемые для защиты растений, также исследовались с применением люминесцентных *E. coli*, содержащих гены теплового шока lux [174, 242, 260].

Многие описанные в литературе методы мониторинга клеточного метаболизма в бактериальных культурах [244] являются трудоемкими и часто требуют контроля роста, жизнеспособности или метаболизма микробных культур. В связи с чем тесты на основе биолюминесцентных микроорганизмов являются реальной альтернативой таких подходов [196, 258]. В типичном исследовании, включающем рост *E. coli* с использованием фенотипа *lux* в качестве индикатора, замечено, что световое излучение быстро увеличивалось до поздней логарифмической фазы роста. Однако к концу культивирования световое излучение культур снизилось до неопределяемого уровня, но колониеобразующие единицы не пострадали. Это указывает на то, что, несмотря на полное отсутствие клеточной метаболической активности, клетки сохраняют способность культивироваться [196].

И. В. Мануховым и соавторами сконструированы высокочувствительные специфические *lux*-биосенсоры для детекции антибиотиков тетрациклинового и β -лактаманного рядов, квинолонов, а также аминогликозидов на основе бактерий *Escherichia coli*. Для создания биосенсоров использовали бактерии, содержащие гибридные плазмиды *pTetA':lux*, *pAmpC':lux*, *pColD':lux*, *pIbpA':lux*, в которых транскрипция генов репортеров *luxCDABE* *Photorhabdus luminescens* осуществлялась с индуцируемых промоторов генов *tetA*, *ampC*, *cda*, *ibpA* соответственно. Определены основные характеристики (пороговая чувствительность, амплитуда и время ответа) *lux*-биосенсоров. Показана высокая специфичность биосенсоров, реагирующих исключительно на антибиотики определенного вида [21].

Таким образом, технологии, связанные с биолюминесценцией, постоянно развиваются. До недавнего времени применение люциферазы в основном основывалось на измерении АТФ как биотического маркера и позволяло анализировать различные ферменты, субстраты и ко-факторы [88, 179]. В настоящее время появляется несколько концепций, которые предоставляют новые инструменты для понимания клеточных механизмов, контролирующей реакцию на токсичные химические вещества. К ним относятся и биолюминесцентные

бактериальные сенсоры, которые могут дополнять аналитические химические методы путем обнаружения биодоступных химических веществ в различных образцах. Поскольку эти подходы должны быть стандартизованы, лишь некоторые из них получили признание в качестве рутинных аналитических методов.

1.4.4. Применение биолюминесцентных бактерий для выявления зависимости химическая структура–физико-химические свойства–активность

Современные требования экологической и токсикологической безопасности ставят перед учёными различных специальностей – химиками, биологами, фармакологами – задачу разработки биологически активных веществ, обладающих, наряду с минимальной опасностью для человека и окружающей среды, эффективным целевым действием [19]. В свою очередь широкое распространение бактериальных инфекций и возрастающая антибиотикорезистентность микроорганизмов ставят перед исследователями задачу разработки новых эффективных лекарственных средств направленного действия, обладающих низкой токсичностью для человека.

По некоторым данным, за последние десятилетия не было изобретено антибактериальных средств, обладающих новой структурой, мишенью или механизмом действия [216, 255].

В мире существуют различные проекты по прогнозированию биологической активности веществ, основанные как на статистическом анализе частоты встречаемости функциональных групп (PASS), так и на соответствии определенного набора физико-химических дескрипторов наблюдаемым биологическим эффектам вещества (MATRIX) [47, 48, 117].

При поиске и создании новых лекарственных средств наряду с развитием скрининговых систем все большее значение приобретают рациональные подходы, основанные на исследовании зависимости биологической активности химических соединений от молекулярной структуры. Взаимосвязь «структура–активность» (Structure – Activity relationship – SAR; Quantitative Structure – Activity Relationship

– QSAR) может быть использована для прогнозирования биологического действия новых соединений с целью отбора более перспективных химических структур для последующих углубленных исследований [4, 107, 190, 219, 249].

Модели взаимосвязи структуры и активности (модели SAR и QSAR) – это регрессионные модели, используемые в химии, биологии или фармации для того, чтобы связать набор предикторных переменных с эффективностью биологического ответа. Прогнозирующие переменные связаны с физико-химическими характеристиками химических соединений, такими как коэффициент распределения (LogP), молекулярный вес (MV), топологическая площадь полярной поверхности молекулы (tPSA) и иными физико-химическими свойствами. Переменная ответа может быть биологическим параметром, таким как цитотоксичность, выраженная в виде ингибирования биолюминесценции. Модели SAR и QSAR пытаются найти связь между оценкой химических дескрипторов и изучаемыми биологическими эффектами, позволяя прогнозировать биологическую активность новых химических веществ на основе информации об их теоретических дескрипторах. Конечная цель моделей SAR и QSAR – генерировать токсикологические данные *in silico* для новых химических веществ и прогнозировать их биологическую активность на основе их физико-химических дескрипторов [96, 173].

Биолюминесцентные микроорганизмы также нашли свое применение в моделировании QSAR [56, 147, 173, 264]. Благодаря своей простоте использования и высокой пропускной способности модели SAR и QSAR используются для создания баз данных биологических ответов на химические вещества. Эти биологические данные в сочетании с измеренными или вычисленными химическими предикторами молекул предоставляют информацию, которая оказалась весьма востребованной в медицинской химии, экологии, токсикологии и фармации. Моделирование SAR и QSAR позволило найти корреляцию между токсичностью и основными физико-химическими параметрами органических химических веществ, такими как MW, tPSA или самая высокая занятая молекулярная орбиталь и самая низкая незанятая молекулярная орбиталь (HOMO

и LUMO, соответственно) и их механизмом токсического действия [173]. Так, в исследованиях Hermes с соавт. [147] обнаружили, что LogP вместе с другими химическими дескрипторами позволяют объяснить токсичность 22-х органических веществ для *A. fischeri*. Croning с соавт. [97] установили, что LogP дает объяснение токсичности алканолов в отношении *A. fischeri*. Croning с соавт. [96, 97] идентифицировали альдегиды, проявляющие свою токсичность для *A. fischeri* как электрофилы Шиффовых оснований, а алкены – как акцепторные электрофилы типа Михаэлиса.

Тем не менее, начиная с 2000 года модели SAR и QSAR на основе химических дескрипторов начали демонстрировать некоторые недостатки, такие как неспособность предсказать токсичность химических веществ, действующих различными способами (такие как полярные и неполярные наркотические средства или электрофильные реагенты), а также необходимость измерения физико-химических свойств соединений до моделирования SAR и QSAR. Это является реальным недостатком при изучении очень большого числа химических веществ [191]. Усилия исследователей сосредоточены на разработке и тестировании новых стратегий SAR и QSAR и методов выбора переменных, основанных на новых математических моделях. Так, RenS. с соавт. [235, 236] предложили ввести параметр сольватации, чтобы иметь возможность предсказывать токсичность полярных и неполярных наркотических средств с помощью одной и той же модели QSAR. Они смоделировали токсичность 98 органических химических веществ в отношении рекомбинантных биолюминесцентных бактерий *Pseudomonas Shk1* и *A. fischeri*. Новые подходы QSAR на основе фрагментов получили популярность в медицинской химии, экологии, токсикологии и фармации из-за их высокой прогностической активности [52, 56, 89, 167, 173, 191, 243]. QSAR на основе фрагментов основываются на предпосылке, что молекула может быть описана суммой ее фрагментов. Эту базовую концепцию можно применить по аналогии для создания *in silico* химических дескрипторов. Например, коэффициент распределения соединения можно оценить как функцию коэффициента распределения его фрагментов, а не измерять его экспериментально. В 2002 году

Khadikar с соавт. [167] разработали модель QSAR, основанную на топологическом индексе, для моделирования как гидрофобности, так и токсичности для *D. magna*, *F. minnow* и *A. fischeri* для галоген- и метил-замещенных производных бензола. Они обнаружили, что даже монопараметрические модели QSAR дают отличные результаты, моделируя гидрофобность и токсичность таких химических веществ. Agrawal с соавт. [52] использовали связь между молекулами, механизм действия которых основан на наркотическом эффекте, чтобы объяснить токсичность 39 органических химических веществ для *A. fischeri*. Они показали, что топологический индекс вместе с индикаторными переменными, учитывающими информацию о степени ветвления и субструктурных особенностях, дают хорошие оценки измеряемой токсичности. Клорман с соавт. [171, 172, 173] опубликовали серию монографий по применению одной из первых коммерчески доступных токсикологических программ моделирования QSAR для пользователей ПК (M-CASE). Программа работает на основе QSAR для поиска химических субструктур, которые коррелируют (положительно или отрицательно) с биологической активностью, включая некоторые модуляторы для уточнения прогноза, которые могут включать дополнительные активные структурные фрагменты или физические свойства, такие как LogP или HOMO/LUMO. Они изучили несколько утилит M-CASE с наборами данных соответствующих организмов. В области оценки токсичности вод они изучали ее применимость с помощью набора данных о токсичности 901 химического вещества для *A. fischeri* [173]. M-CASE смогла предсказать токсичность исследуемых химических веществ и идентифицировать основные токсикофторы (химические фрагменты, повышающие токсичность) и биофобы (химические фрагменты с отрицательной корреляцией с токсичностью) и определить их основной механизм действия.

С 2003 г. возрастает интерес как к объединению *in silico* химических дескрипторов, так и к токсичности смесей химических веществ [54, 173, 188]. С увеличением числа доступных дескрипторов интерес начал вызывать разработка методов вариативного отбора, связанных с отбором наилучшего подмножества химических дескрипторов и параметров для объяснения биологического действия.

Melagraki с соавт. [200] разработали новую методику обучения нейронных сетей, основанную на радиальной базисной функции, для прогнозирования токсичности 39 гетерогенных наборов химических веществ для *A. fischeri*. Модель работала быстрее и значительно точнее, чем традиционные модели QSAR. Asadollahi-Baboli М. [57] исследовал применимость методов машинного обучения в QSAR для анализа токсичности фенолов и тиофенолов для *A. fischeri*. Luis P. с соавт. [191] сосредоточились на разработке нового метода прогнозирования вклада различных функциональных групп в токсичность ионных жидкостей для *A. fischeri*. Они изучили тысячи ионных жидкостей. Метод позволил оценить вклад различных комбинаций функциональных групп в общую токсичность соединений. Некоторые выводы исследований заключались в том, что в целом катионные функциональные группы повышали токсичность (пирролидиниевые, имидазолиевые и пиридиниевые группы вносили около 3, 20 и 33% токсичности, соответственно), а анионные группы снижали токсичность, за исключением дицианамидных и этилсульфатных групп, которые оказались очень токсичными для *A. fischeri*. Aruoja с соавт. [56] изучали токсичность 58 замещенных анилинов и фенолов для *A. fischeri* и других организмов. Они обнаружили, что занятое пара-положение в целом имеет тенденцию к повышению токсичности, тогда как орто – замещенные производные проявляют пониженную токсичность.

Kim с соавт. [168] изучали экологическую опасность ацетаминофена, карбамазепина, дилтиазема и шести основных сульфаниламидов с использованием *D. magna*, *Oryctolagus lapiles* и *A. fischeri*. Они обнаружили, что токсичность объясняется физико-химическими дескрипторами, связанными с химической реактивностью (EHOMO / ELUMO). Vighi с соавт. [262] сравнили зависимость от «наркоза» и токсичность полярного «наркоза», индуцируемую регулируемыми химическими веществами на *A. fischeri* в сравнении с другими модельными организмами (водорослями, дафниями и рыбами). Исследователи пришли к выводу, что бактерии (представленные *A. fischeri*) также реагировали, как и эукариоты (водоросли, дафнии и рыбы) на полярные наркотики, однако *A. fischeri* был на два порядка более чувствителен, чем дафнии и рыбы к полярным

наркотикам. Qin с соавт. [229] изучали сравнительную токсичность нескольких экологически значимых органических загрязнителей для семи водных организмов (включая *A. fischeri*). Jiang и др. [159] и Zou с соавт. [267] предсказали токсичность антибиотиков на *P. phosphoreum* и смоделировали хроническую токсичность на основе данных острой токсичности. Chen с соавт. [89] создали модель QSAR для прогнозирования токсичности 95 диоксинов и диоксиноподобных соединений для *A. fischeri*.

Таким образом, результаты оценки токсичности различных веществ с использованием биолюминесцентных бактерий легли в основу разнообразных регрессионных моделей, направленных на выявление зависимости в ряду «химическая структура–физико-химические свойства–токсичность», что в свою очередь также подтверждает возможность использования люминесцентных тест-объектов в аналитических целях, в том числе для идентификации веществ по их биологической активности в отношении светящихся бактерий.

Выводы по главе 1

1. В современном мире наблюдается широкое разнообразие методов оценки жизнеспособности микроорганизмов, которые нашли свое применение в биологии, экологии и фармации. Кроме того, в последнее время для первоначального тестирования биологической активности органических и неорганических соединений бактерии являются привлекательной альтернативой эукариотическим организмам.

2. Люминесцентные бактерии применяются в качестве биотестов для токсичных субстратов, в связи с чем широко используются в токсикологических исследованиях и могут представлять реальную альтернативу уже имеющимся методам анализа на стадии скрининга.

3. Биолюминесцентные тест-объекты нашли широкое применение для обнаружения и изучения проб различного состава и применяются в аналитических целях в качестве биоселективного элемента биосенсора в экологических, токсикологических, биологических, фармацевтических и др. исследованиях.

4. На основе светящихся бактерий разработано и унифицировано большое количество подходов для анализа образцов различного происхождения, в том числе лекарственных препаратов. Получаемые с помощью люминесцентных тест-объектов результаты анализа проб на наличие ксенобиотиков сопоставимы с данными других биологических и химических методов.

5. Анализ литературы показал, что лимитирующей стадией в поиске новых фармацевтических субстанций с антимикробным действием является отсутствие быстрых систем крупномасштабного скрининга новых химических соединений на антимикробную активность.

6. Обзор научных исследований подтвердил перспективность разработки методического подхода к анализу антимикробной активности веществ с использованием биолюминесцентных тест-объектов.

В данной работе представлена разработка методического подхода к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных тест-объектов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты, материалы исследования

В работе изучены двадцать четыре фармацевтические субстанции различных химических групп. Из группы аминогликозидных антибиотиков использованы гентамицина сульфат (ООО "Фармацевтическая компания "Здоровье", Украина, серия 370319) и стрептомицина сульфат (Корпорация «Артериум», Украина, серия 461108), из группы 6-аминопенициллановой кислоты – бензилпенициллин натриевая соль (ОАО "Киевмедпрепарат", Украина, серия 570806), из группы 7-аминоцефалоспоровановой кислоты – цефтриаксон (ЗАО «Дарница», Украина, серия CN10110) и производное нафтацена – тетрациклина гидрохлорид (Нинся Циюань Фармасьютикал, Китай, серия 180403-61), которые по фармакологической классификации являются антибиотиками. В работе применяли производное ацетанилида – лидокаина гидрохлорид (ООО «Гротекс», Россия, серия 590519), бензилизохинолина – дротаверина гидрохлорид (ООО «Татхимфармпрепараты», Россия, серия 10318), папаверина гидрохлорид (ФКП «Армавирская биофабрика», Россия, серия 000924). Из группы бутирофенона – галоперидол (Мосхимфармпрепараты им. Н. А. Семашко, Россия, серия 101256). Также исследованы эфедрина гидрохлорид (BASF Pharmachemikalien GmbH & Co. KG, Германия, серия NN3056), соединение из группы гидроксиарилалкиламинов – димедрол (Бейджинг Тайанг Фарм, Китай, серия M150903) из группы дифенилгидрамина и производное камфорной кислоты – сульфокамфорная кислота (ОАО «Фармстандарт – УфаВИТА», Россия, серия 530115). В исследовании использовали производное п-аминобензойной кислоты – прокаина гидрохлорид (новокаин, АО «Усолъе-Сибирский химфармзавод», Россия, серия 20218), производное пергидроциклопентафенантрена – строфантин (ООО «ОЗ ГНЦЛС», Украина, серия 31008), класса пиперидина – лобелина гидрохлорид (ЗАО "Дарница", Украина, серия 30387), класса пиразола – метамизол натрия (АВ «Sanitas», Литва, серия 2440886), производное пропан-1-сульфоната – унитиол (Белмедпрепараты РУП, Республика Беларусь, серия 1400887) и производное тиофекарбоновой кислоты – ультракаин (АО «Санофи-авентис груп», Франция,

серия E055). Производным пирролидина, использованным в исследованиях, выступал пирацетам (ПАО «Красфарма», Россия, серия 650119). В исследовании изучены два производных тропана – атропин (ЗАО «Дарница», Украина, серия 10110) и скополамина гидробромид (АО «Санофи-авентис груп», Франция, серия 6406060) и три производных фенотиазина – хлорпромазин (аминазин, Корпорация «Артериум», АТ «Галичфарм», Украина, серия 51590101), дипразин (Фирма ООО "Конектбиофарм", Россия, серия 5589001) и пипольфен (Группа ЭГИС, Россия, серия 101203).

Изучена антимикробная активность сорока различных производных 2-((2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)уксусной кислоты, с кодировкой NKV, которые синтезированы на кафедре органической и биоорганической химии Запорожского государственного медицинского университета под руководством заведующего кафедрой Коваленко Сергея Ивановича, профессора, доктора фармацевтических наук, общая структурная формула представлена на рисунке 2.

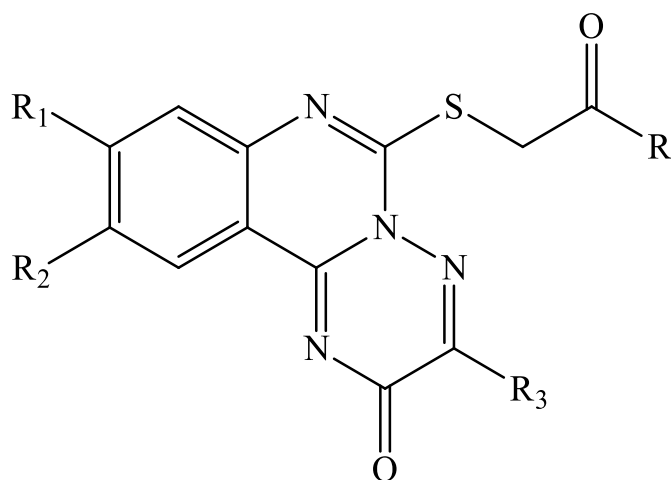


Рисунок 2 – Формула исследуемых производных NKV где, R = (2S,3S)-3-этилбицикло[2.2.1]гептан-2-амин (NKV-34, 68, 69, 70, 71), 4-(трифлюорометил)фенил)метанамин (NKV-37), 4-(трифлюорометил)фенил)метанамин (NKV-40), 4-метоксифенил)метанамин (NKV-39), 1-(2-флюорофенил)пиперазин (NKV-31), 1-(бицикло[2.2.1]гептан-2-ил)этанамин (NKV-29, 32), 1-циклогексилпиперазин (NKV-35), 2-(трифлюорометил)анилин (NKV-36), 2,4,6-триметилморфолин (NKV-30),

N-(4-бромфенил) (NKV-38), -ОН (NKV-42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 67), Адамантан-2-амин (NKV-58, 61, 62, 63, 64, 65, 66), Азепан (NKV-33), Морфолин (NKV-55), Пиперидин (NKV-57), Пиридин-3-амин (NKV-60), Пирролидин (NKV-56); $R_1 = H$ (NKV-29, 30, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 60, 63, 64, 66, 67, 69, 71), F (NKV-34, 36, 38, 43, 44, 45, 61, 62, 68), Br (NKV-32, 37, 54, 65, 70); $R_2 = H$ (NKV-32 34 36 37 38 43 44 45 54 55 56 57 58 60 61 62 65 67 68 70), Cl (NKV-29 39 40 46 49 50 51 63), Br (NKV-30 35 42 52 53 64 69), I (NKV-31 33 47 48 66 71); $R_3 = 4-C_6H_5$ (NKV-30, 39, 45, 51, 53, 61), $4-CH_3C_6H_4$ (NKV-50), $4-CH_3OC_6H_4$ (NKV-29, 33, 34, 40, 42, 43, 46, 47), $4-FC_6H_4$ (NKV-31, 32, 35, 36, 37, 38, 44, 48, 49, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71).

Соединения, представленные на рисунке 2, синтезированы согласно известным методикам с использованием реактивов компаний «Merck» (Дармштадт, Германия), «Sigma-Aldrich» (Миссури, США), «Симбиас» (Донецк, Украина) и «Enamine» (Киев, Украина) [208, 245, 264]. Методика синтеза заключалась в добавлении к суспензии калиевой соли соответствующего 3-R-8- R_1 -9- R_2 -10- R_3 -6-тио-6,7-дигидро-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-2-она, растворенного в 20 мл пропанола-2, эквимолярного количества раствора хлоруксусной кислоты растворенной в 5 мл гидроксида калия с последующим кипячением полученной системы в течение 60-120 минут до нейтрального значения pH среды и очисткой синтезированных соединений путем охлаждения системы и ее фильтрации.

Растворимость NKV оценена визуально, согласно методике оценки прозрачности и степени мутности жидкостей в компараторе [7]. Растворы NKV и их производных готовили путем добавления в пробирки 1,5 мл, типа Эппендорф (каталожный № 0030120086, Диаз-М, Россия) диметилсульфоксида (ДМСО, Таурус, Россия) или 2,5 - 3 % (масса/объем) раствор натрия хлорида (НПФ «Невский химик», Россия) по 1 мл с последующим внесением 5 мг твердого образца производного NKV, отвешенного на аналитических весах ВЛР-200 (Госметр,

Россия). Полученную систему интенсивно перемешивали с помощью вибрационной мешалки (ВМ-2, Россия) в течение 10 - 15 минут. Прозрачность полученных растворов оценивали визуально путем сравнения с эталонным раствором (смесь ДМСО и 3 % натрия хлорида в соотношении от 1:100 до 1:10) в одинаковых объемах и пробирках с притертой пробкой из прозрачного бесцветного стекла с внутренним диаметром около 15 мм.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методы оценки биологических и аналитических характеристик природных биолюминесцентных тест-объектов

Изучение морфо-культуральных и биохимических свойств микроорганизмов для их последующей дифференцировки проведено по основным фенотипическим признакам семейства *Vibrionaceae* [125]. Морфо-культуральные характеристики светящихся изолятов изучены визуально и при помощи световой микроскопии. На плотных питательных средах зрительно оценена величина, форма, цвет, консистенция, контура края, структура и характер поверхности колоний. Морфология бактерий в нативных и окрашенных по Граму препаратах проведена под микроскопом [10, 49].

Физиологические свойства изолятов оценены по температурным оптимумам роста при их культивировании на жидких питательных средах (HiMedia M001, Индия), приготовленных на основе 3 % раствора натрия хлорида, при +4 °C, +20 °C, +25 °C, +35 °C и +37 °C в течение 24 часов.

Биохимические свойства бактерий оценены с использованием сред Гисса по их способности ферментировать такие субстраты, как глицерин, D(+)-маннит, сахарозу, D(+)-глюкозу, D(+)-мальтозу, D(+)-маннозу и D(+)-лактозу (AppliChem, Германия), концентрация которых составила 0,5 % в пробе [10]. Каталазная активность изучаемых изолятов оценена по реакции биомассы бактерий отдельных колоний, выращенных в течение 16 - 24 часов на питательном агаре при нанесении на их поверхность 0,01 мл 3 % раствора пероксида водорода (AppliChem, Германия) [106]. Оксидазную активность изучали с помощью коммерческого теста

(OXItest Mikrolatest, Erba Lachema s.r.o., Чехия). Тест-полоску смачивали 2 мкл дистиллированной воды, после чего на индикаторную зону тест-полоски наносили исследуемую культуру клеток и через 0,5 - 1 мин. наблюдали за изменением окраски.

Один из основных подходов к изучению биохимических свойств бактериальных изолятов и их идентификации, использованный в данной работе, заключался в определении типа кинетики люциферазной реакции [14, 22]. Для этого проведено накопление биомассы бактерий путем их культивирования в 500 мл жидкой питательной среды при постоянном перемешивании в течении 24 часов. Полученную систему центрифугировали при 3000 об/мин в течении 15 мин в ОПН-8, удаляя супернатант. Оставшуюся в виде осадка массу клеток суспендировали в 5 мл натрий-фосфатном буфере с $\text{pH} = 7,2 \pm 0,1$ и подвергали осмотическому лизису путем поочередного замораживания и оттаивания бактериальной суспензии. После трехкратного повторения данной процедуры систему центрифугировали повторно. Осаждение белков проводили ступенчатым насыщением полученного супернатанта сульфатом аммония (НПФ «Невский химик», Россия) от 20 до 80 %. Кинетика затухания люциферазной реакции изучена в присутствии додеканала (Fluka, Швейцария). Образцы для анализа включали в себя 50 мкл 0,01 % водно-спиртовой эмульсии альдегида, 500 мкл натрий-фосфатного буфера с $\text{pH} = 7,2 \pm 0,1$ и 50 мкл ферментного препарата с экспериментально подобранной концентрацией. Инициация реакции проведена быстрым введением 500 мкл раствора 10^{-5} моль/л фотовосстановленного ФМНН₂ (AppliChem, Германия), содержащего 10^{-3} моль/л ЭДТА (AppliChem, Германия). По полученным результатам измерения интенсивности биолюминесценции от времени определяли время полужатухания ($t_{1/2}$), по значениям которого оценен тип ферментативной кинетики ($T_{\text{ER}} = 1 / t_{1/2}$) [14, 103, 125].

2.2.2. Методики биотестирования с использованием природных биолюминесцентных тест-объектов

Изучение антимикробной активности фармацевтических субстанций (ФС) проведено с использованием светящихся штаммов *P. leiognathi* Sh1, *A. fischeri* F1 и *V. harveyi* Ms3 из коллекции Института «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» [14]. Как было показано в Главе 1, люминесцентные бактерии обладают высокой чувствительностью к действию веществ различной природы и могут быть использованы для реализации поставленной цели [17, 23, 39, 71]. Для оценки нормального функционирования природных люминесцентных бактерий применяли цинк сернокислый 7-водный (АО "ЛенРеактив", Россия).

Методика анализа антимикробной активности веществ с использованием природных биолюминесцентных тест-объектов заключалась в том, что в кюветы люминометра вносили 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 выдерживали при 25 °С в течение 15 минут при постоянном перемешивании 60 об/мин на вибрационной мешалке (СВ-1, Россия) для равномерного распределения вещества в пробе. Далее вносили по 50 мкл бактериальной суспензии, содержащей 5×10^6 клеток/мл. Образцы термостатировали при 25 °С в термостате ТСО-1/80 (СПУ, Россия) на протяжении всего периода анализа. Измерение свечения образцов проводили через 15, 30, 60 минут и 18 часов от момента внесения клеток в пробу [13, 50].

Интенсивность свечения тест-систем определяли с использованием кюветного биохемилюминометра БХЛ-06 (Н. Новгород, Россия) и планшетного люминометра LuMate (Awareness Technology, Inc. Palm City, USA).

Результаты измерений свечения тест-штаммов представляли в виде индекса биолюминесценции (БЛИ), который рассчитывали по формулам $\text{БЛИ} = I_o/I_k$ (выражается в относительных единицах) или $\text{БЛИ} = (I_o/I_k) \times 100 \%$ (выражается в

процентах), где I_0 – интенсивность люминесценции тест-штамма в опытном образце, а I_k – интенсивность люминесценции тест-штамма в контрольном образце.

Для интерпретации полученных результатов применяли ЭК₅₀ – эффективная концентрация образца, вызывающая снижение свечения тест-штамма на 50 % по сравнению с контролем.

Биологические проявления ФС и NKV и их производных в отношении люминесцентных штаммов *P. leiognathi* Sh1, *A. fischeri* F1 и *V. harveyi* Ms3 оценивали по значениям эффективной концентрации ФС, снижающей свечение тест-штамма микроорганизмов на 50 % через 15, 30, 60 минут и 18 часов.

2.2.3. Рекомбинантные lux-биосенсоры и методика биотестирования с их использованием

В работе применяли восемь рекомбинантных штаммов *E. coli* MG1655, содержащих плазмиды различных типов, которые любезно предоставлены заведующим лабораторией молекулярной генетики МФТИ, д.б.н. Мануховым Ильей Владимировичем. pXen7-lux (Xen⁺::lux) детектирует общий (интегральный) уровень токсичности веществ. pRecA-lux (Rec⁺::lux) и pColD-lux (Col⁺::lux) – ДНК-фрагменты, содержащие промоторы генов recA и colD, соответственно, позволяют детектировать ДНК-тропные агенты. pKatG-lux (Kat⁺::lux) – ДНК-фрагмент, содержит промотор гена katG, используемый для оценки ответа клетки на окислительный стресс, вызываемый появлением в среде пероксидов и окисленного глутатиона. pSoxS-lux (Sox⁺::lux) – ДНК-фрагмент, содержит промотор гена soxS, отвечающий за детекцию ответа на окислительный стресс, вызываемый появлением в среде супероксид-аниона и оксида азота. pGrpE-lux (Grp⁺::lux) и pIbpA-lux (Ibp⁺::lux) – ДНК-фрагменты, содержащие промоторы генов grpE и ibpA, соответственно, детектирующие вещества, вызывающие повреждение белков. pFabA-lux (Fab⁺::lux) – ДНК-фрагмент, содержит промотор гена fabA, позволяющий выявлять вещества, вызывающие повреждение мембран клеток. Данные штаммы *E. coli* использовали для изучения биологического действия

направленно синтезированных NKV и их производных, а также для определения механизмов выявленных антимикробных свойств.

При проведении биотестирования на первом этапе рекомбинантные штаммы *E. coli* MG1655 выращивали в бульоне LB с содержанием 100 мкг/мл ампициллина в течение 21 ± 3 часов при температуре 37°C . Ночную культуру разводили до концентрации 10^7 кл/мл в свежем бульоне LB и растили при 30°C в течение $2 \pm 0,5$ часов. Затем в лунки 96-луночного планшета вносили по 240 мкл бактериальной суспензии в 1 % растворе натрия хлорида с содержанием идентичного количества антибиотика в бульоне LB и добавляли по 10 мкл растворов производных NKV в ДМСО.

В качестве контроля нормального функционирования lux-биосенсора использовали значение интенсивности люминесценции lux-биосенсоров при наличии в пробе индуктора первого типа (ИПТ). В качестве ИПТ для *E. coli* MG1655 с плазмидами типов pGrpE-lux и pIbpA-lux использовали этиловый спирт 95 % (ОАО «Флора Кавказа», Карачаево-Черкесская Республика, РФ серия 2391019), который также применяли для оценки функционирования рекомбинантного штамма *E. coli* MG1655 (Xen`::lux) в таком же количестве, как и для *E. coli* MG1655 (Grp`::lux). Для штаммов с плазмидами pRecA-lux и pColD-lux применяли диоксидин (Диоксидин p-p 10 мг/мл 10 мл ампулы, Новосибхимфарм, РФ, серия 210710). Пероксид водорода (3%, ООО «ЮжФарм», Краснодарский край, РФ, серия 401017) в качестве сигнального вещества использовали для штаммов с плазмидами pKatG-lux и pSoxS-lux. Фенол (Sigma-Aldrich, Inc., США, серия 6428463) использовали для индукции свечения у рекомбинантного штамма *E. coli* MG1655 (Fab`::lux).

Контрольные пробы содержали 250 мкл бактериальной суспензии в 1 % растворе натрия хлорида с содержанием 100 мкг/мл ампициллина (ОАО Синтез, РФ).

Биотестирование, оценка свечения тест-систем и интерпретация результатов проводилась, как описано в разделе 2.2.2.

2.2.4. Анализ антибактериального и противогрибкового действия синтезированных производных NKV с использованием эталонных тест-культур микроорганизмов

Антимикробную активность вновь синтезированных производных NKV в отношении эталонных тест-культур микроорганизмов выполняли в соответствии с методиками [1, 2, 224]. Во время исследований готовили ряд двукратных серийных разведений препарата в бульоне Мюллер-Хинтон в объеме 1 мл, после чего добавляли в каждую пробирку по 0,1 мл бактериальной суспензии (10^6 кл/мл). Минимальную ингибирующую рост бактерий концентрацию (МИК) вещества определяли при отсутствии видимого роста в пробирке с минимальной концентрацией препарата, минимальную бактерицидную или фунгицидную концентрацию (МБК / МФК) – при отсутствии роста на агаре после высева из прозрачных пробирок. Для первичного скринингового исследования синтезированных производных NKV применяли эталонные тест-культуры как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, принадлежащих к разным по морфофизиологическим свойствам клинически значимых групп возбудителей инфекционных заболеваний. В качестве набора стандартных тест-штаммов применяли *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885-653. Все тест-штаммы получены из бактериологической лаборатории ГУ «Запорожский областной лабораторный Центр государственной санитарно-эпидемиологической службы Украины». В качестве контроля противомикробной активности соединений по отношению к эталонным тест-культурам микроорганизмов применяли субстанцию антибактериального препарата триметоприм (O.L.KAR, Украина) [2, 224].

2.2.5. Изучаемые валидационные характеристики биолюминесцентного метода анализа

В работе определены такие валидационные характеристики биолюминесцентного метода анализа антимикробной активности

фармацевтических субстанций, как предел обнаружения, предел количественного определения, аналитическую область и линейность. Их оценку проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [7].

На первом этапе определяли линейность методики путем полученной зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации исследуемого вещества или ФС до логарифмической функции. Далее полученное математическое уравнение логарифмировали по натуральному основанию для получения линейной модели (IV), для которой также рассчитывали коэффициент детерминации (R^2):

$$y = b \times x + a \quad \text{IV}$$

где, x – количество или концентрация определяемого вещества или ФС, y – величина отклика, b – угловой коэффициент, a – свободный член. Величины в линейной модели рассчитаны согласно ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» [7].

За предел обнаружения (ПО) принимали минимальную концентрацию исследуемого вещества, которую на первом этапе рассчитывали по формуле (V) [7]:

$$\text{ПО} = 3,3 \times S/b, \quad \text{V}$$

где, S – стандартное отклонение аналитического сигнала – интенсивности биолюминесценции, равное стандартному отклонению свободного члена уравнения полученного графика; b – угловой коэффициент (коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине, оценённый методом наименьших квадратов).

Полученное значение ПО подтверждали прямым экспериментом при количестве (концентрации) определяемого вещества или ФС в диапазоне близком к теоретически рассчитанной величине ПО.

Пределом количественного определения (ПКО) считали наименьшую концентрацию вещества или ФС в образце, которое может быть количественно оценено с использованием валидируемой методики по формуле (VI):

Аналитическую область методики определяли как интервал между минимальной и максимальной концентрацией исследуемого вещества или ФС, установленный по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели.

2.2.6. Математические и статистические методы

Физико-химические характеристики фармацевтических субстанций, такие как десятичный логарифм распределения вещества в системе октанол-вода (LogP), молекулярная масса (MW) и площадь полярной поверхности (tPSA) получены на основе литературных данных, а также подтверждены с использованием компьютерной программы ACD/ChemSketch (ACD/Labs, США) [27]. Обработку результатов исследований проводили с использованием программы Microsoft Excel. Статистическую обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики с оценкой однородности выборок, расчетом среднего значения ($\bar{x}$), дисперсии (S^2), стандартного отклонения (S), полуширины доверительного интервала (Δx) и относительной ошибки результата среднего определения ($\bar{\epsilon}$). Значения определяемых величин представлены в виде $\bar{x} \pm \Delta x$, где $\bar{x}$ – среднее значение; Δx – полуширина доверительного интервала при доверительной вероятности 99 %. Сравнение выборочных средних значений проводили с помощью t-критерия Стьюдента для оценки однородности дисперсий. Величину уровня значимости (p) для t-критерия Стьюдента устанавливали равной 0,01. Статистический анализ полученных данных проводили согласно требованиям ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» [7, 20].

ГЛАВА 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИРОДНЫХ И ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ

Как видно из Главы 1, в мире разработано большое количество подходов к оценке антимикробной активности веществ *in vitro*. Однако современным аналитическим методам, направленным на обнаружение химических веществ, свойственны такие недостатки, как длительное время обнаружения, высокая стоимость оборудования и реагентов для анализа объектов, а также дополнительные затраты на обучение и подготовку персонала [158]. Разработка и внедрение простого и недорогого скрининг-теста для быстрого анализа образца является одним из перспективных и востребованных направлений современных аналитических технологий в фармации. Так, методы с использованием биолюминесцентных тест-систем соответствуют всем этим характеристикам и нашли широкое применение для обнаружения и изучения биологических свойств химических соединений [8].

Широкое использование светящихся организмов и тест-систем на их основе в последние десятилетия связано с тем, что биолюминесценция является общим показателем метаболизма клетки. Большое количество факторов, влияющих на рост, дыхание и биолюминесценцию клетки может быть измерено посредством её регистрации [100]. Поскольку светящиеся бактерии приобрели разнообразные фенотипические признаки в ходе филогенеза и, как следствие, имеют различную чувствительность к химическим соединениям. В связи с чем поиск новых люминесцентных тест-объектов, а также создание рекомбинантных светящихся бактерий, изучение их биологических и аналитических характеристик с последующим их применением для анализа веществ различной природы представляет собой особый интерес

3.1. Биологические характеристики биолюминесцентных бактерий, выделенных из Азовского и Черного морей

С целью поиска оптимальных тест-объектов выделены люминесцентные бактерии из акваторий Черного и Азовского морей в летне-осенний период, путем забора образцов воды и объектов морской фауны. Пробы воды фильтровали через мембранные бактериологические фильтры (мембраны типа МФАС – ОС, диаметр пор = 0,22 мкм, ЗАО НТЦ «Владипор», Россия), а полученный биоматериал механически измельчали до кусочков размером 0,5 см³. Подготовленные образцы помещали на плотные питательные среды (HiMedia M002, Индия) с 3 % содержания натрия хлорида (НПФ «Невский химик», Россия) и культивировали при температуре (t) +25 °С в течение 16 - 24 часов в термостате (ТСО-1/80 СПУ, Россия). Выросшую биомассу оценивали на наличие светящихся зон в темной комнате. В случае обнаружения таких областей из них выделяли и затем очищали светящиеся микроорганизмы при помощи комплекса стандартных микробиологических методов [32, 33, 75]. Культивирование выделенных штаммов в лабораторных условиях показало, что колонии данных бактерий на плотных питательных средах у всех изучаемых объектов характеризовались слизистой консистенцией, аморфной структурой, гладкой и выпуклой поверхностью с ровным краем в форме круга. При оценке размеров образующихся колоний после 24 часового культивирования микроорганизмов на питательном агаре все изоляты разделили на две группы: крупные колонии диаметром (d) более 5 мм, образовывали бактерии с кодом Ms3, а средним размером колоний с d от 3 до 5 мм характеризовались изоляты Sh1, M1, Fsh, F1. Полученные результаты представлены в «Приложении 1».

Микроскопия препаратов «висячая капля» и фиксированных мазков, окрашенных по Граму, показала, что все изоляты являются подвижными грамтрицательными палочковидными бактериями.

Анализ температурных характеристик показал, что при + 4 °С и + 37 °С не было замечено свечения изолятов. В то же время при + 25 °С и + 35 °С микроорганизмы характеризовались наличием люминесценции и способностью к

росту, которая проявлялась в виде увеличения клеточной биомассы. Полученные данные свидетельствуют о том, что среди выделенных образцов нет представителей видов *Vibrio logei* и *Photobacterium phosphoreum* [8, 125]. Результаты исследований представлены в «Приложении 1».

При изучении биохимических свойств выделенных чистых культур светящихся бактерий были выявлены их индивидуальные особенности ферментации субстратов и ферментативной активности живых клеток, которые представлены в табл. 1.

Сравнительный анализ результатов проведенных исследований позволил первично идентифицировать три изолята. Бактерий F1 в экспериментах по изучению ферментативных свойств окисляли D(+)-маннит, D(+)-глюкозу, D(+)-мальтозу и D(+)-маннозу обладали желтым пигментом и каталазной активностью, а также характеризовались люминесценцией и способностью к росту при температурах от +20 °C до +37 °C.

Таблица 1 – Биохимические свойства выделенных светящихся изолятов.

Параметр	Sh1	Fsh	F1	Wy	Ms3
1	2	3	4	5	6
Глицерин	+	+	-	-	+
Маннит	-	-	+	-	+
Сахароза	-	-	-	-	+
Глюкоза	+	+	+	+	+
D(+)-мальтоза	-	-	+	-	+
D(+)-манноза	+	+	+	+	+
D(+)-лактоза	-	-	-	-	-
Каталазная активность	-	-	+	-	+
Оксидазная активность	+	+	+	-	+

Примечание: «+» – сахар ферментируется или фермент присутствует, «-» – сахар не ферментируется или фермент отсутствует.

Они не образовывали кислот и/или газа при наличии в пробах глицерина, сахарозы и D(+)-лактозы. Наличие всех этих признаков является характерным для такого вида, как *A. fischeri*. Изолят с кодировкой Ms3 отнесли к виду *V. harveyi*, поскольку он ферментировал все субстраты, кроме лактозы, а также обладал

каталазной и оксидазной активностями. Клетки этих бактерий не обладали способностью накапливать желтый пигмент, а оптимум их биолюминесценции и роста находился в диапазоне температур 20 - 30 °С.

Для дальнейшей идентификации изолятов провели оценку кинетических характеристик люцифераз, результаты которой представлены в виде графических зависимостей интенсивности свечения (I , %) от времени на рисунке 3. По времени полужатухания люциферазной реакции определили тип ферментативной кинетики – характерный систематический признак для люминесцентных бактерий [103]. Изоляты с кодом F1, Sh1, Wy, Fsh характеризовались быстрым типом кинетики при $T_{ER} = 0,75 \text{ с}^{-1}$, $0,83 \text{ с}^{-1}$, $0,51 \text{ с}^{-1}$, $0,52 \text{ с}^{-1}$ соответственно, а изолят Ms3 – медленной кинетикой с $T_{ER} = 0,091 \text{ с}^{-1}$.

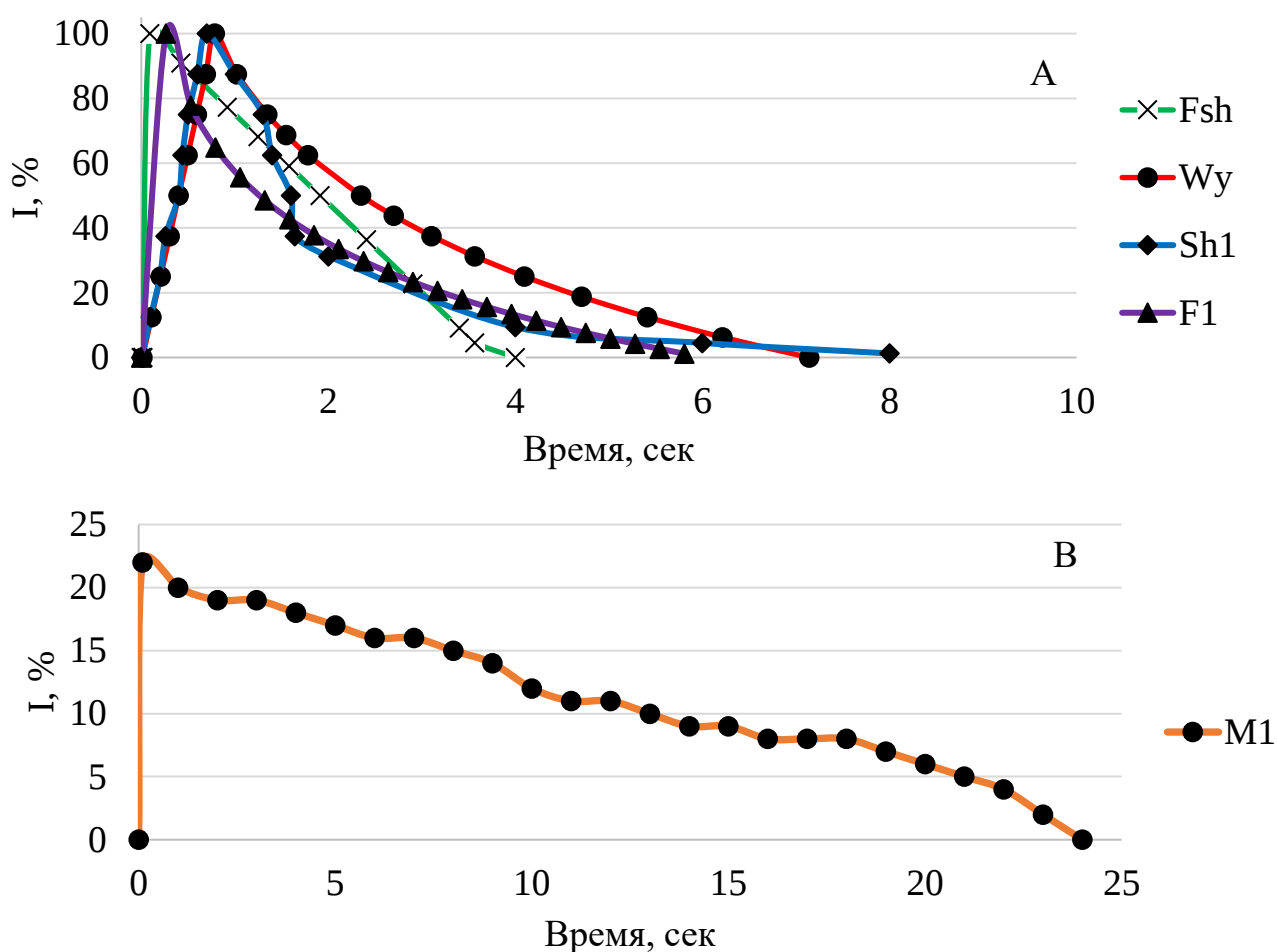


Рисунок 3 – Кинетика затухания люциферазной реакции. А – быстрый тип кинетики; В – медленный тип кинетики.

На основании вышеизложенных результатов исследований изоляты с кодировкой Sh1, Wy, Fsh отнесли к виду *P. leiognathi*, поскольку они ферментировали только D(+)-глюкозу и D(+)-маннозу, не обладали желтым пигментом и каталазной активностью, а также характеризовались T_{ER} , больше, чем $0,5 \text{ с}^{-1}$. Совокупность полученных данных позволила подтвердить принадлежность изолят Ms3 к виду *V. harveyi* T_{ER} составила $0,91 \text{ с}^{-1}$. Изолят F1 отнесли к виду *A. Fischeri*, поскольку при изучении ферментативных свойств данный изолят окислял D(+)-маннит, D(+)-глюкозу, D(+)-мальтозу и D(+)-маннозу, обладал желтым пигментом и каталазной активностью, характеризовался люминесценцией и способностью к росту при температурах от $+20^{\circ}\text{C}$ до $+37^{\circ}\text{C}$, $T_{ER} = 0,75 \text{ с}^{-1}$ и положительным ответом в оксидажном тесте, а также содержал желтый пигмент.

3.2. Аналитические характеристики природных люминесцентных тест-бактерий

На этом этапе работы провели поиск оптимального тест-штамма, среди выделенных ранее морских светящихся бактерий для изучения антимикробной активности фармацевтических субстанций. При исследовании количества клеток бактерий, способных образоваться в 1 мл питательной среды за 24 часа культивирования, и их совокупной интенсивности свечения определили, что их количество для всех изолятов колеблется в диапазоне от $1,72 \pm 0,23 \times 10^8$ клеток/мл до $4,85 \pm 0,16 \times 10^8$ клеток/мл, а удельное свечение от $2,39 \times 10^{-4}$ до $4,09 \times 10^{-3}$ мВ/клетку. Полученные результаты представлены в «Приложение 1». 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 они среди представителей своих видов обладали наибольшими показателями удельного свечения $3,87 \times 10^{-3}$, $4,09 \times 10^{-3}$ и $2,39 \times 10^{-4}$ мВ/клетку соответственно.

Для выбора тест-объекта для дальнейших исследований провели изучение интенсивности биолюминесценции суспензий фотобактерий в зависимости от концентрации цинка сульфата (рисунок 4). Для этого готовили раствор цинка

сульфата на дистиллированной воде в концентрации 7,0 мкг/мл. Затем готовили пробы, как описано в разделе 2.2.2. с добавлением в пробу 50 мкл натрий-фосфатного буфера с $\text{pH} = 7,2 \pm 0,1$ для нивелирования влияния кислотности раствора цинка сульфата. Относительная погрешность результатов определения биолуминесценции не превышала 5%.

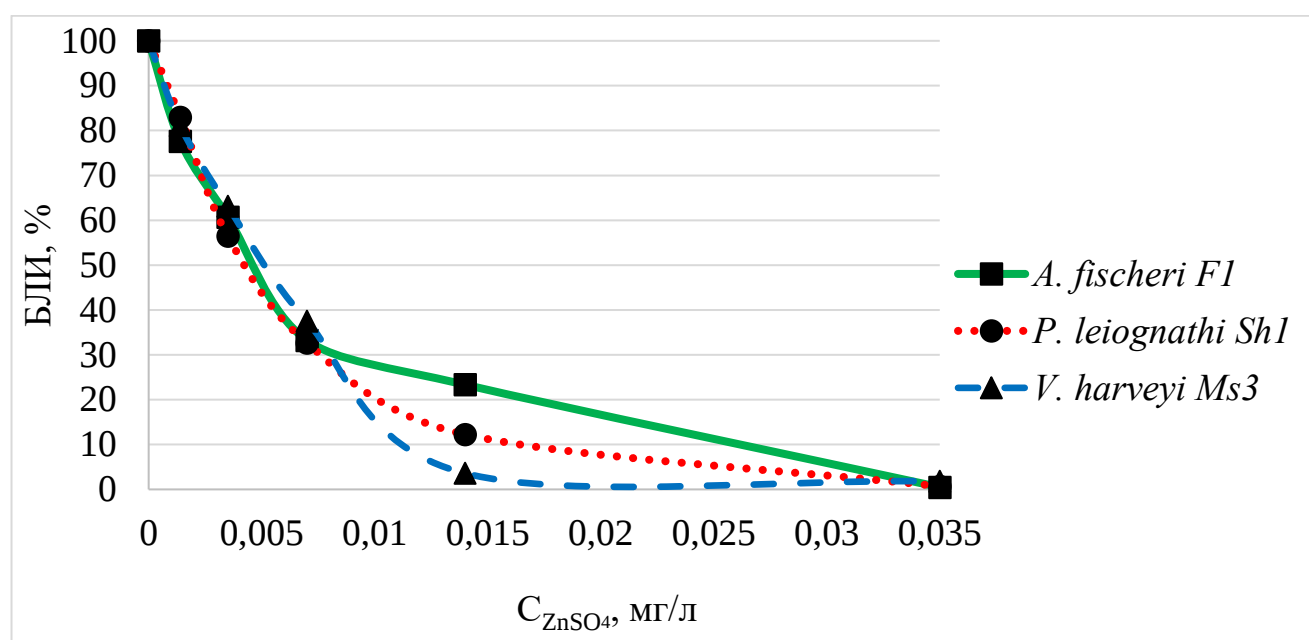


Рисунок 4 – Влияние различных концентраций цинка сульфата на люминесценцию природных светящихся бактерий.

По результатам тестирования было установлено, что увеличение концентрации цинка сульфата в пробе вызывало снижение свечения бактерий для всех трех штаммов. Было установлено, что эффективные концентрации ZnSO_4 , снижающие БЛИ исследуемых тест-объектов на 50%, составили: для *A. fischeri* F1 – $5,14 \pm 0,57$ мкг/мл, *V. harveyi* Ms3 – $4,08 \pm 1,26$ мкг/мл, *P. leiognathi* Sh1 – $4,51 \pm 0,69$ мкг/мл, табл. 2, рисунок 4. В зависимости от применённого тест-штамма полученные результаты позволяют определить концентрацию сульфата цинка от 1,9 до 2,9 мг/мл меньше, чем рекомендуемая концентрация в ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 [50], что может свидетельствовать о более высокой чувствительности применённых тест-объектов в сравнении с тест-системой «Эколюм».

3.2.1. Определение некоторых валидационных характеристик методики биoluminesцентного анализа антимикробной активности с использованием природных люминесцентных тест-объектов

Для определения валидационных характеристик на этом этапе работы провели построение зависимостей по влиянию различных концентрации цинка сульфата на БЛИ. При использовании метода наименьших квадратов установили, что все три зависимости имеют экспоненциальный вид, где величина БЛИ в относительных единицах, а x – концентрация вещества в мг/мл. После осуществляли математическую обработку полученных данных согласно методике, описанной в разделе 2.2.5.. В результате получены линейные зависимости с коэффициентом детерминации (R^2) 0,981 для штамма *A. fischeri* F1, 0,999 – *P. leiognathi* Sh1 и 0,917 – *V. harveyi* Ms3, представлены в таблице 2. Полученные математические уравнения подтверждают линейность использованной методики.

Таблица 2 – Определяемые валидационные характеристики и параметры для методик

Валидационные характеристики и параметры	Штамм тест-объекта		
	<i>A. fischeri</i> F1	<i>P. leiognathi</i> Sh 1	<i>V. harveyi</i> Ms3
1	2	3	4
n	10	10	10
S	0,034	0,153	0,111
S^2	0,185	0,391	0,333
b	-105,26	-167,35	-198,76
Δx , мкг/мл	$\pm 0,57$	$\pm 0,69$	$\pm 1,26$
$\bar{\varepsilon}$, %	11,12	15,33	30,93
ПО, мкг/мл $\times 10^{-3}$	$5,15 \pm 0,57$	$5,15 \pm 0,69$	$4,88 \pm 1,26$
ПКО, мкг/мл $\times 10^{-3}$	$15,595 \pm 0,588$	$15,618 \pm 1,241$	$14,799 \pm 1,056$
Линейность методики	$y = -105,26 \times x + 6,488$	$y = -167,35 \times x + 3,906$	$y = -198,76 \times x + 5,434$
R^2	0,981	0,999	0,917
ЭК ₅₀ , мкг/мл	$5,14 \pm 0,57$	$4,51 \pm 0,69$	$4,08 \pm 1,26$

Для расчета ПО и ПКО используемой методики определяли среднее значение, дисперсию и стандартное отклонение аналитического сигнала для каждого из тест-объектов согласно ОФС.1.1.0014.15 [7].

После проведенных расчетов полученные значения стандартного отклонения аналитического сигнала (S) и коэффициента чувствительности (b) позволили рассчитать предел обнаружения (ПО) по формуле (IV) и предел количественного определения (ПКО), результаты расчета этих характеристик представлены в таблице 2.

В результате проведенного статистического анализа установили, что наименьшее количество цинка сульфата в пробе позволяет выявить тест-объекты *P. leiognathi* Sh1 и *A. fischeri* F1. ПО составило $5,15 \times 10^{-3}$ мкг/мл для обоих тест-штаммов при $\Delta x = \pm 0,57$ и $\bar{\varepsilon} = 11,12$ для *A. fischeri* F1 и при $\Delta x \pm 0,69$, $\bar{\varepsilon} = 15,33$ для *P. leiognathi* Sh1. В то же время аналитическая область методики для оценки антимикробной активности сульфата цинка с использованием в качестве тест-штамма *A. fischeri* F1 находится в диапазоне от $1,26 \pm 0,57 \times 10^{-3}$ до $35,3 \pm 0,57 \times 10^{-3}$ мкг/мл, а для *P. leiognathi* Sh1 от $0,78 \pm 0,69 \times 10^{-3}$ до $34,6 \pm 0,69 \times 10^{-3}$ мкг/мл.

Экспериментально показано, что для биотестирования цинка сульфата, стандартного ингибитора их свечения, с использованием люминесцентных тест-объектов удалось рассчитать ПО, ПКО, определить линейность и аналитическую область методики при $R^2 > 0,95$, что позволяет предположить, что анализ антимикробной активности с использованием биолюминесцентных природных тест-объектов подлежит валидации и данная методика может быть применена для анализа антимикробной активности фармацевтических субстанций. Исходя из этого, на последующих этапах работы данные тест-объекты использованы для определения антимикробной активности и ее показателей у фармацевтических субстанций различного химического строения.

3.3. Генно-инженерных люминесцентные тест-объекты и их аналитические характеристики

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). На данном этапе работы провели изучение биологических особенностей генно-инженерных *E. coli* MG1655 и оценку их аналитических характеристик, таких как естественный уровень люминесценции тест-штаммов, измеряемый в RLU, изменение свечения бактериальной культуры в присутствии сигнальных молекул и растворителя ДМСО. Изучение данных характеристик необходимо как для подбора оптимальных условий биотестирования веществ, так и для определения стабильного свечения тест-штаммов без увеличения их биомассы с последующей стандартизацией подобранных условий [21]. Как ранее отмечалось в разделе 1.1, необходимо, чтобы контрольные и анализируемые пробы соответствовали друг другу по их физико-химическим свойствам, имели схожие характеристики, анализируемые образцы не содержали загрязняющих веществ, при исследовании использовались правильные эталонные бланки – бактериальный раствор с добавлением точно такой же матрицы для анализа, а также исследования проводились при идентичных температурах и концентрациях кислорода.

Основываясь на вышеизложенном, на данном этапе работы провели оценку зависимости интенсивности люминесценции lux-сенсоров от времени, результаты которой представлены на рисунке 5.

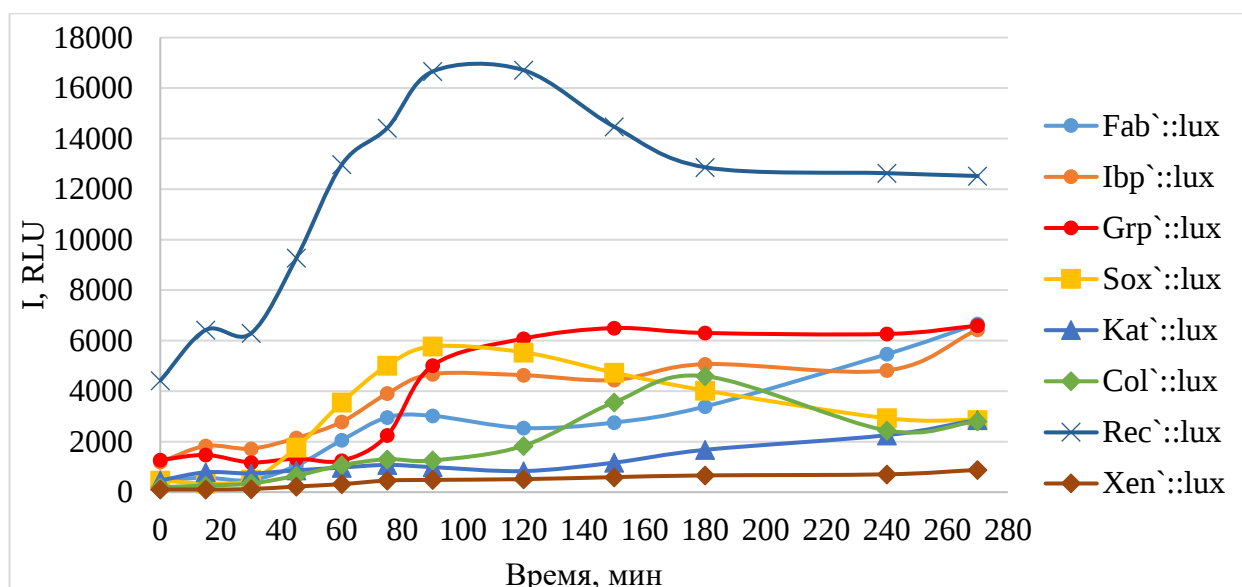


Рисунок 5 – Интенсивность люминесценции lux-сенсоров во времени.

По полученным данным определили, что уровень естественной светимости штаммов различен несмотря на идентичную структуру lux-оперона в рекомбинантной плазмиде. Так, наибольшей интенсивностью люминесценции, 13000 ± 2000 RLU, характеризовался штамм *E. coli* (Rec`::lux), а наименьшей  $I = 550 \pm 30$  RLU штамм *E. coli* (Xen`::lux). В то же время достижение стационарной фазы люминесценции (постоянного свечения) независимо от штамма составило 120 ± 30 минут.

На следующем этапе работы провели оценку индукции БЛИ тест-систем в присутствии индукторов первого типа (ИПТ) при различных концентрациях, а также изменения уровня свечения в зависимости от времени инкубации тест-штамма.

По результатам проведенных исследований, представленных на рисунке 6, определили, что для lux-биосенсоров с плазмидами Col`::lux и Rec`::lux увеличение величины БЛИ происходит только при наличии в пробе диоксидина, для Sox`::lux и Kat`::lux – пероксида водорода, Ibp`::lux и Grp`::lux – спирта этилового, а Fab`::lux – фенола. Такие результаты свидетельствуют о том, что каждый светящийся генно-инженерный штамм *E. coli* MG1655 чувствителен к своему ИПТ, что характеризуется увеличением БЛИ только при наличии соответствующей сигнальной молекулы в пробе.

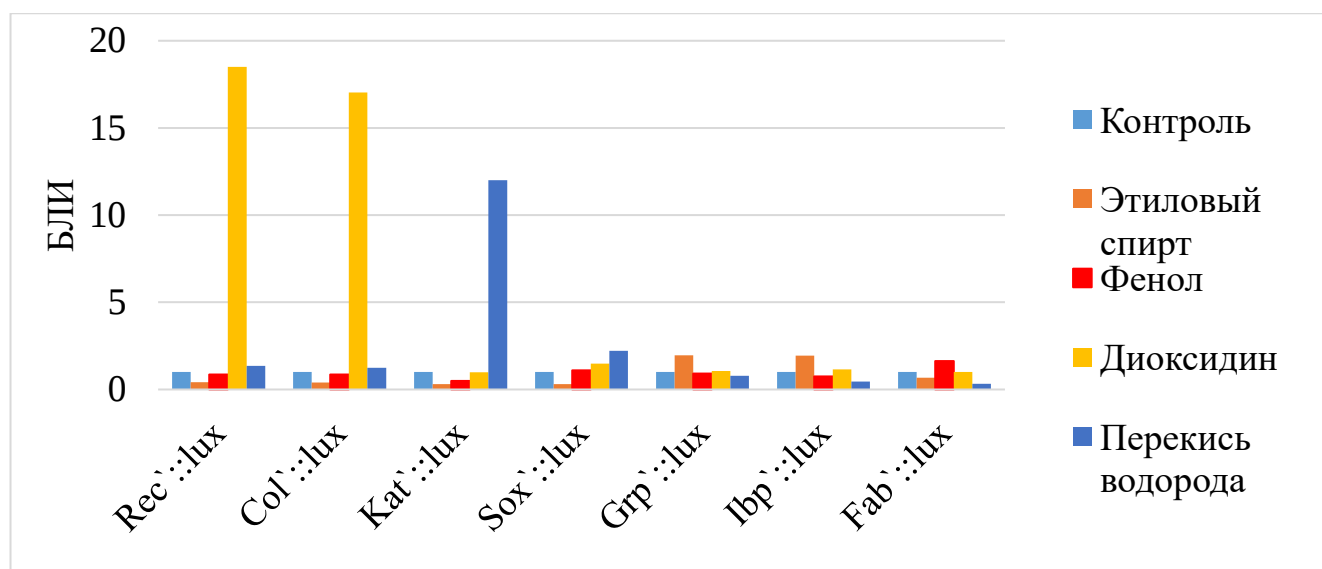
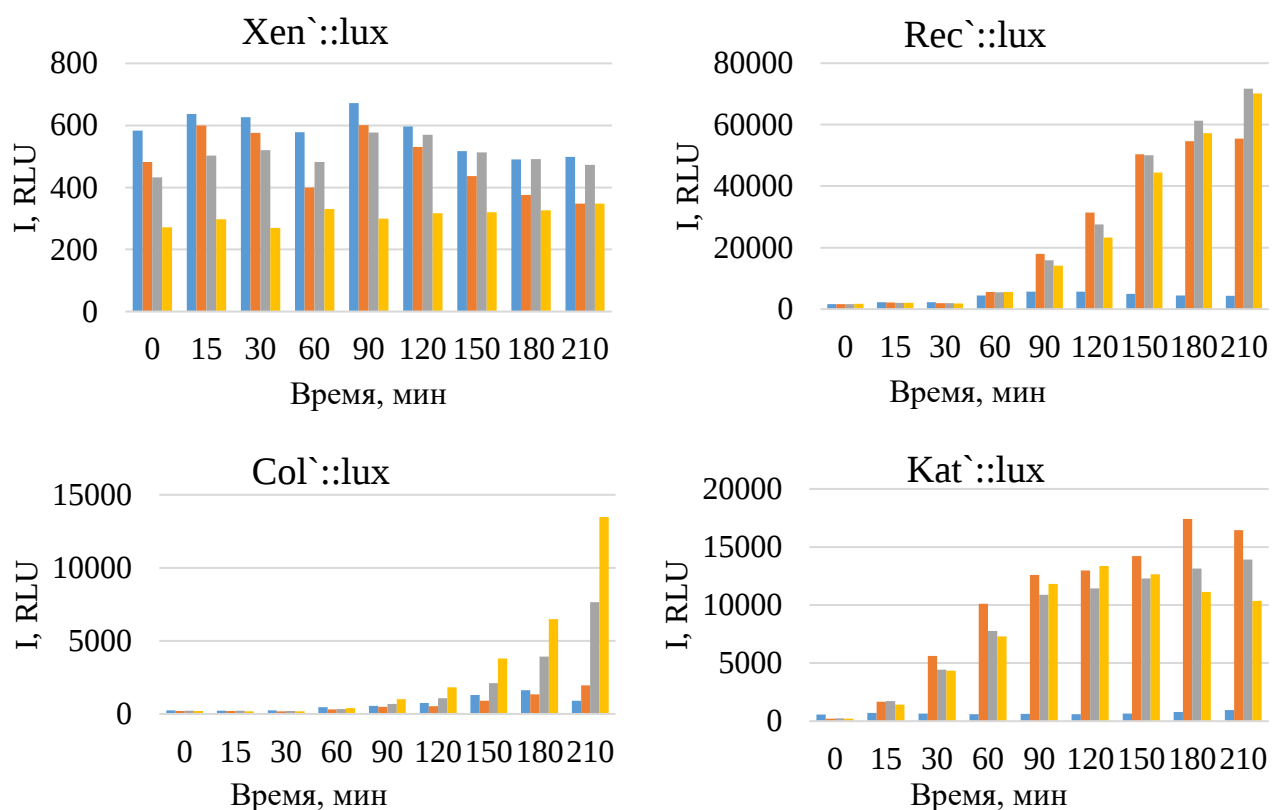


Рисунок 6 – Влияние индуктора первого типа на интенсивность свечения рекомбинантных штаммов *E. coli* MG1655.

В то же время при изучении влияния ИПТ в различных концентрациях при различном течении времени наблюдалась индукция *I* для тест-штаммов на основе *E. coli* в промежутке от 15 до 90 минут, а интенсивность свечения зависела от концентрации ИПТ.



Продолжение рисунка 7

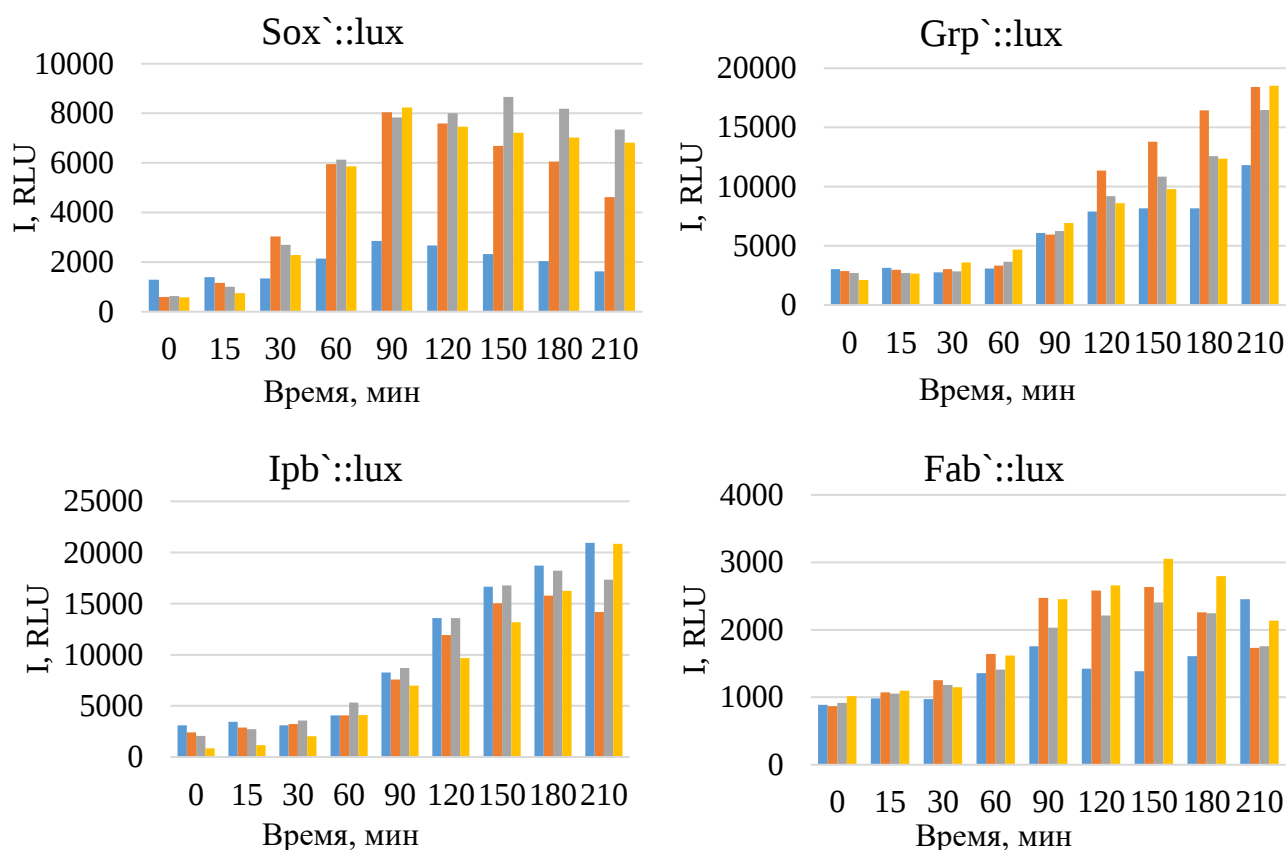


Рисунок 7 – Зависимость уровня индукции I от концентрации сигнальной молекулы во времени, где ■, ■, ■, ■ – разведение индуктора первого типа в 0, 50, 25 и 12,5 раз, соответственно.

По полученным экспериментальным данным установлено максимальное значение увеличения интенсивности люминесценции для каждого тест-штамма, величина которых находились в диапазоне от 1,5 до 37 раз. Поскольку для каждого штамма различна интенсивность свечения и время ее достижения было принято решение оценивать дальнейшие результаты по формуле, представленной в разделе 2.2.2., что позволит стандартизовать данные параметры и корректно оценивать нормальное функционирование lux-сенсоров.

После компьютерной обработки данных и их последующего анализа установили оптимальную концентрацию сигнального вещества, время начала индукции БЛИ, время достижения максимального значения БЛИ, а также величину максимального БЛИ для каждого из исследованных lux-биосенсоров (табл. 3).

Таблица 3 – Основные аналитические характеристики lux-биосенсоров

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

В ходе проведенных исследований установлены индивидуальные особенности функционирования рекомбинантных lux-биосенсоров их аналитические характеристики. Кроме того, предложена процедура биотестирования веществ на наличие антимикробной активности с выявлением вероятных ее механизмов с учетом полученных результатов. Оптимальными условиями, с учетом описанных в разделе 2.2.3., для данной методики с применением индуцибельных lux-биосенсоров является внесение в пробу ИПТ, в концентрациях указанных ранее, с временем регистрации интенсивности люминесценции и ее изменения как в негативных и положительных контрольных пробах, так и в опытных от 120 до 180 минут от начала инкубации.

По материалам главы опубликованы работы [33, 34, 35, 37, 41].

Выводы по главе 3

1. Впервые изучены биологические характеристики 5 стабильных природных изолятов светящихся бактерий, для которых установлена принадлежность к видам *P. leiognathi*, *A. fischeri* и *V. harveyi*.

2. По результатам оценки аналитических характеристик люминесцентных бактерий к действию цинка сульфата установили, что наибольшей чувствительностью обладает тест-штамм *P. leiognathi* Sh1, ЭК₅₀ для цинка сульфата составила $4,51 \pm 0,69$ мкг/мл. Оценке некоторых валидационных характеристик методики биотестирования с применением тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 показала минимальные значения ПО = 0,029 мкг/мл и ПКО = 0,086 мкг/мл и линейность с $R^2 = 0,999$. Аналитическая область методики находится в диапазоне концентрации от 0,029 мкг/мл до 350 мкг/мл.

3. Показано, что увеличение интенсивности I генно-инженерных lux-биосенсоров на основе *E. coli* происходит при наличии специфического ИПТ и не наблюдается индукция БЛИ в присутствии других ИПТ, а повышение величины БЛИ для каждого репортерного штамма *E. coli* характеризуется различным временем начала от 15 ± 1 минут для бактерий с плазмидами Fab`::lux и Kat`::lux до 120 ± 5 минут с плазмидой Grp`::lux. Достижение максимальных значений БЛИ для репортерных штамма *E. coli* варьируется от 135 ± 15 до 195 ± 15 минут при наличии в пробе оптимальной концентрации индивидуального ИПТ.

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ

Как было показано в Главе 1, рост бактерий и их метаболизм может быть нарушен как физическим воздействием, так и при помощи биологических и химических агентов, в частности, ФС и их препаратов. Анализ публикаций, посвященных изучению побочных эффектов лекарственных препаратов, связывает их с токсическими свойствами ФС, рассматриваемых как проявления неспецифической активности в фармакологии обозначенные как побочные эффекты ФС. Например, побочные эффекты ФС вызывающие проблемы пищеварения, связанные с нарушением микробиоты организма человека и ее нормальным функционированием. Такие эффекты могут вызывать не только антибиотики, но и ФС, не имеющие априорного противомикробного действия, что следует учитывать при проведении исследований ФС и их препаратов [194].

В свою очередь, светящиеся бактерии широко используются в качестве тестов для оценки экотоксических свойств ксенобиотиков благодаря таким свойствам, как быстрая реакция на метаболические изменения, высокая чувствительность и возможность непрерывного сбора данных [8, 29, 74, 75, 240]. На данном этапе исследования задачами диссертационной работы стало изучение применимости природных морских биолюминесцентных бактерий для биолюминесцентного анализа фармацевтических субстанций на наличие антимикробной активности, выявление зависимости «химическая структура – физико-химические свойства – активность» изучаемого ФС и определение валидационных характеристик биолюминесцентного метода анализа антимикробной активности ФС различного химического строения.

4.1. Изучение антимикробной активности антибиотиков с использованием природных биолюминесцентных тест-бактерий

Учитывая вышеизложенное и ранее полученные результаты в разделе 3.2. проведен поиск наиболее оптимального тест-штамма среди наиболее ярких морских светящихся бактерий, отнесенных к различным видам: *P. leiognathi* Sh1, *A. fischeri* F1 и *V. harveyi* Ms3, для которых неспецифическая антимикробная и/или антибактериальная активность. Интенсивность биолюминесценции суспензий фотобактерий исследована в зависимости от концентрации антибиотика широкого спектра действия – гентамицина сульфата (рисунок 8). Для этого готовили раствор гентамицина сульфата на дистиллированной воде в концентрации 20 мг/мл. Затем готовили пробы, как описано в разделе 2.2.2. с добавлением в пробу 50 мкл натрий-фосфатного буфера с $\text{pH} = 7,2 \pm 0,1$ для нивелирования влияния кислотности полученного раствора на биолюминесценцию тест-штаммов [15]. Относительная погрешность результатов определения БЛИ не превышала 5 %.

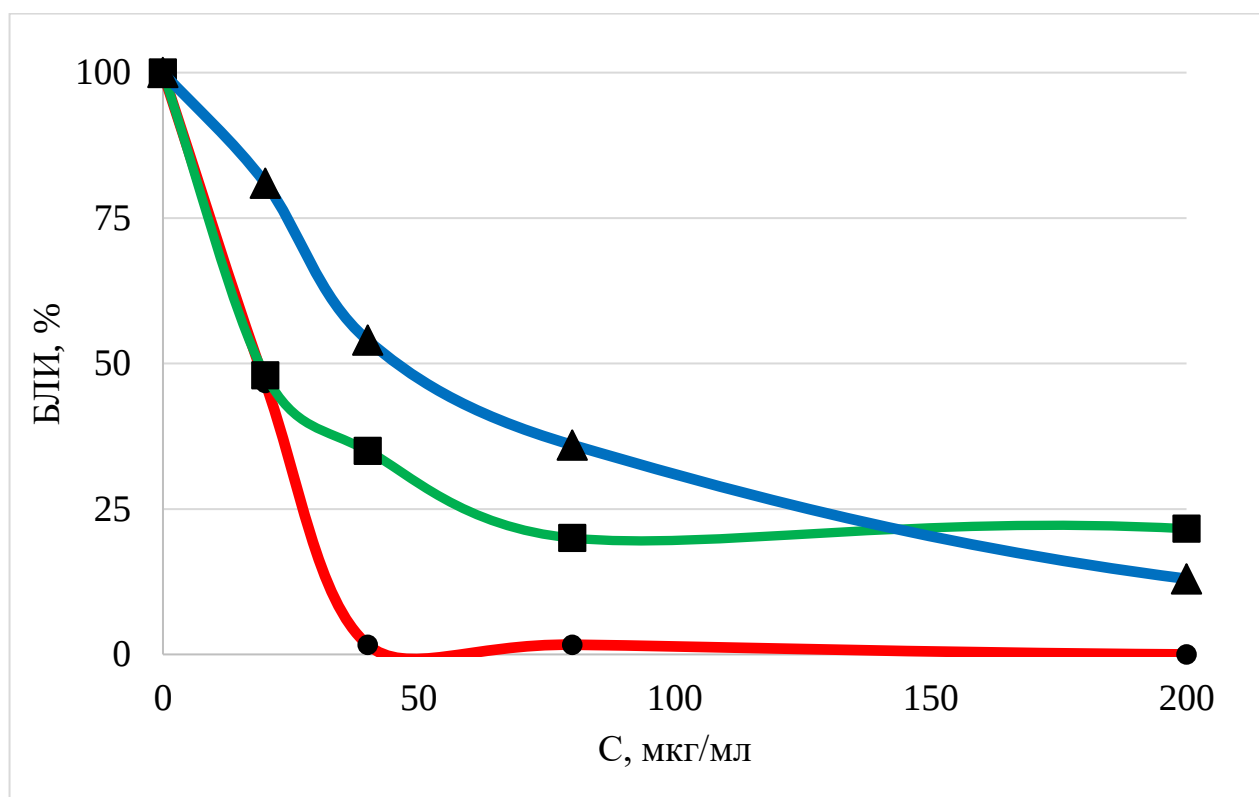


Рисунок 8 – Влияние гентамицина сульфата на биолюминесценцию

● *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. ЭК₅₀ антибиотика, действующие на 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 при $p = 0,01$. Таким образом, из трех изучаемых тест-объектов наиболее чувствительными к гентамицину сульфату оказались бактерии вида *P. leiognathi* Sh1.

Для подтверждения пригодности природных светящихся бактерий штамма *P. leiognathi* Sh1 в качестве тест-объекта, для изучения антимикробной активности веществ, провели биотестирование антибиотиков различных фармакологических групп и поколений, имеющих различный механизм антибактериального действия и являющихся производными различных химических веществ. При этом оценивали влияние аминогликозидных антибиотиков – гентамицина сульфата и стрептомицина сульфата, из группы 6-аминопенициллановой кислоты – бензилпенициллина натриевой соли, из группы 7-аминоцефалоспоровой кислоты – цефтриаксона, производного нафтацена – тетрациклина гидрохлорид в отношении выбранного тест-штамма. Для этого готовили растворы антибиотиков на дистиллированной воде в концентрации 10 мг/мл. Затем готовили пробы для оценки антимикробной активности, как описано в разделе 2.2.2., с добавлением в пробу 50 мкл натрий-фосфатного буфера с $pH = 7,2 \pm 0,1$ для нивелирования влияния кислотности полученного раствора на биолюминесценцию тест-штамма [15]. В качестве антибиотика сравнения применяли гентамицина сульфат.

В результате исследования 15-минутного действия растворов антибиотиков на *P. leiognathi* Sh1 установили, что ЭК₅₀ для бензилпенициллина и тетрациклина составили $501,6 \pm 1,6$ мкг/мл и $28,3 \pm 0,17$ мкг/мл соответственно (рисунок 9). В качестве антибиотика сравнения применяли гентамицина сульфат.

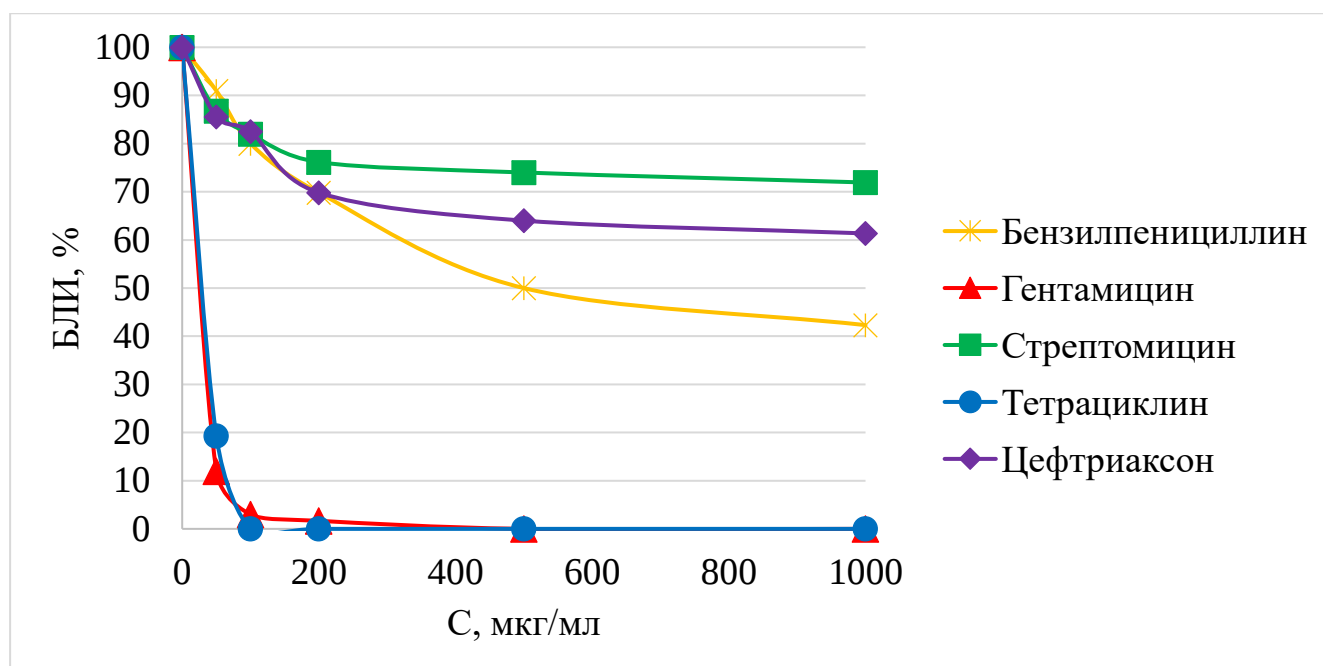


Рисунок 9 – Влияние растворов антибиотиков на тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 через 15 минут инкубации.

Для стрептомицина и цефтриаксона, за данный промежуток времени ЭК₅₀ превышала 1000 мкг/мл, что сопровождается снижением значений БЛИ на 28,08 % и 38,65 % соответственно, что находит свое подтверждение в ранее проведенных исследованиях по оценке их влияния на светящиеся бактерии Lei Jiang и соавторами, 2010 [159].

Полученные результаты связаны с механизмом действия антибиотиков. Бензилпенициллин и цефтриаксон нарушают синтез пептидогликанов клеточной стенки и вызывают лизис микроорганизмов, что проявляется в виде снижения БЛИ не более чем на 57,69 % и 38,65 % соответственно через 15 минут биотестирования [28]. Гентамицин связывается с 30S субъединицей рибосом и нарушает синтез белка, в больших концентрациях нарушает барьерную функцию цитоплазматической мембран, что проявлялось снижением БЛИ на 80,74 % [28]. Уменьшение значений БЛИ на 28,08 % от контрольных значений, для стрептомицина обусловлено тем, что антибиотик проникает внутрь микробной клетки и нарушает образование иницирующего комплекса между матричной РНК и 30S субъединицей рибосомы [28]. Снижение БЛИ на 80,74 % для тетрациклина

может быть связано двумя факторами: 1) он вызывает нарушение образования комплекса между транспортной РНК и рибосомой, что приводит к нарушению синтеза белка; 2) он характеризуется высокой токсичностью [28, 189].

На следующем этапе работы проведена оценка 18-ти часового действия выбранных антибиотиков на тест-штамм, поскольку такой подход, как показано в разделе 1.4.3., характеризуется более высокой чувствительностью к биологическим эффектам исследуемых веществ [8, 12, 60, 75, 100]. Действие растворов антибиотиков на *P. leiognathi* Sh1 снижают значения БЛИ на 100 %, от контрольных значений, через 18 часов установили, данные представлены на рисунке 10.

Учитывая низкие действующие концентрации антибиотиков, описанные в ГФ РФ XIV издания [7], расчет значения ЭК₅₀ проводили по зависимостям БЛИ от концентрации антибиотика в пробе. При сравнении значений ЭК₅₀, для антибактериальных ФС через 18 часов и их ЭК₅₀, через 15 минут наблюдается снижение ЭК₅₀ в 66,9; 33,3; 142,9; 56,6 и 35,1 раз для бензилпенициллина, гентамицина, тетрациклина, стрептомицина и цефтриаксона соответственно.

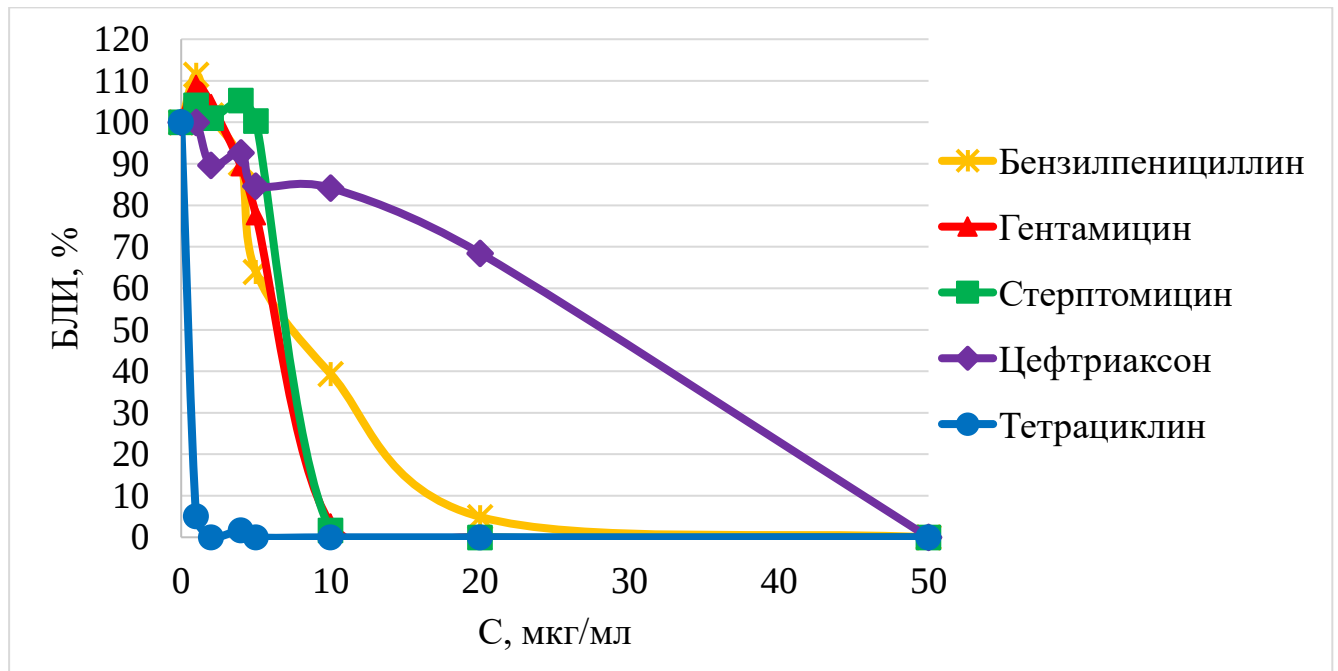


Рисунок 10 – Влияние растворов антибиотиков на тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 через 18 часов инкубации.

Результаты исследований показывают чувствительность штамма *P. leiognathi* Sh1 к антибактериальным веществам, проявляемую в виде снижения БЛИ для тест-штамма при контакте со всеми антибактериальными агентами как при оценке 15-ти минутного, так и 18-ти часового действия. Важно отметить, что если при оценке 15-ти минутного действия не удалось вывить ФС с выраженным ингибирующим действием, то может быть применена оценка 18-ти часового действия, позволяющая с более высокой вероятностью показать проявления антимикробной активности.

4.2. Изучение антимикробной активности фармацевтических субстанций, не антибиотиков, с использованием природных биолюминесцентных тест-бактерий

Как видно из Главы 1, рядом исследований доказано, что кроме общепринятых антибактериальных препаратов, антимикробным действием обладают соединения, не применяющиеся для борьбы с патогенами человека [235]. Такие биологические эффекты связывают с физическими свойствами веществ и особенностями их строения [16, 21, 235]. В свою очередь, такие данные приводят к необходимости установления качественных взаимосвязей в ряду химическая структура-физико-химические свойства-активность при применении и биолюминесцентного анализа на основе природных люминесцентных тест-бактерий.

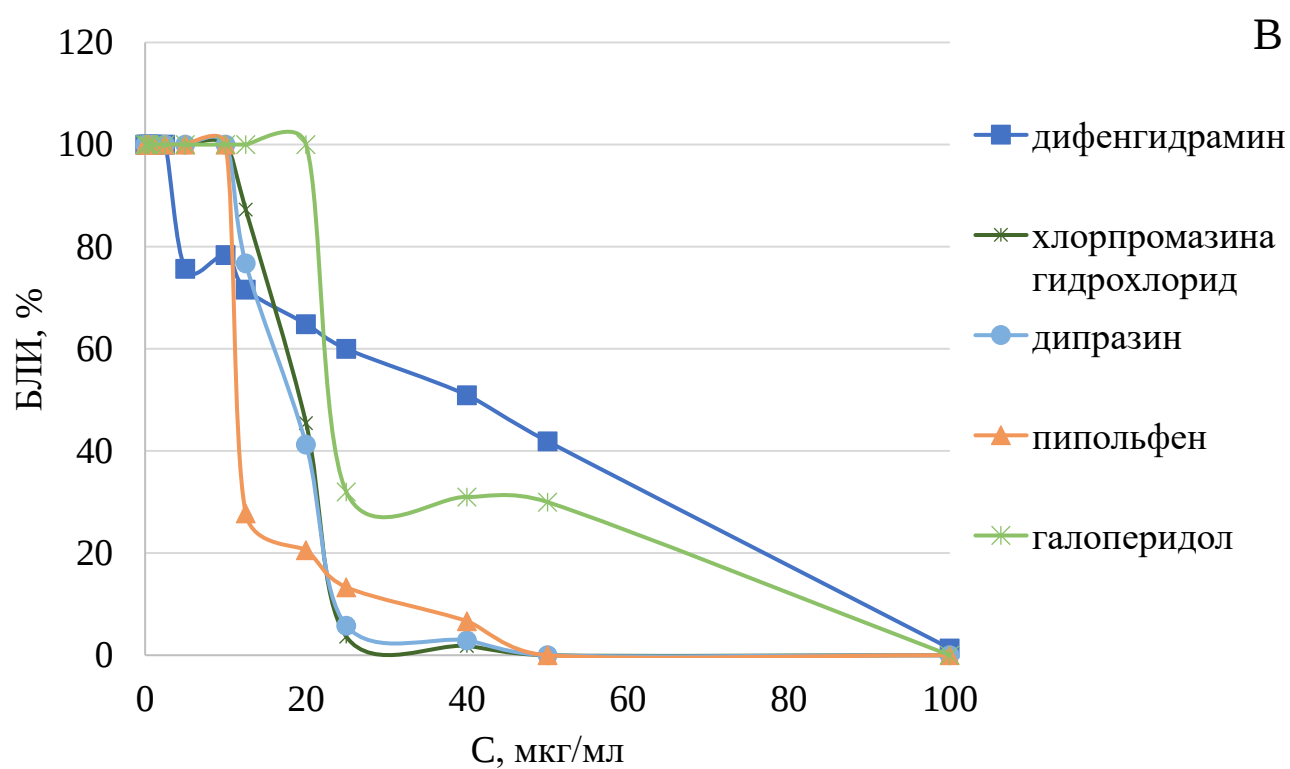
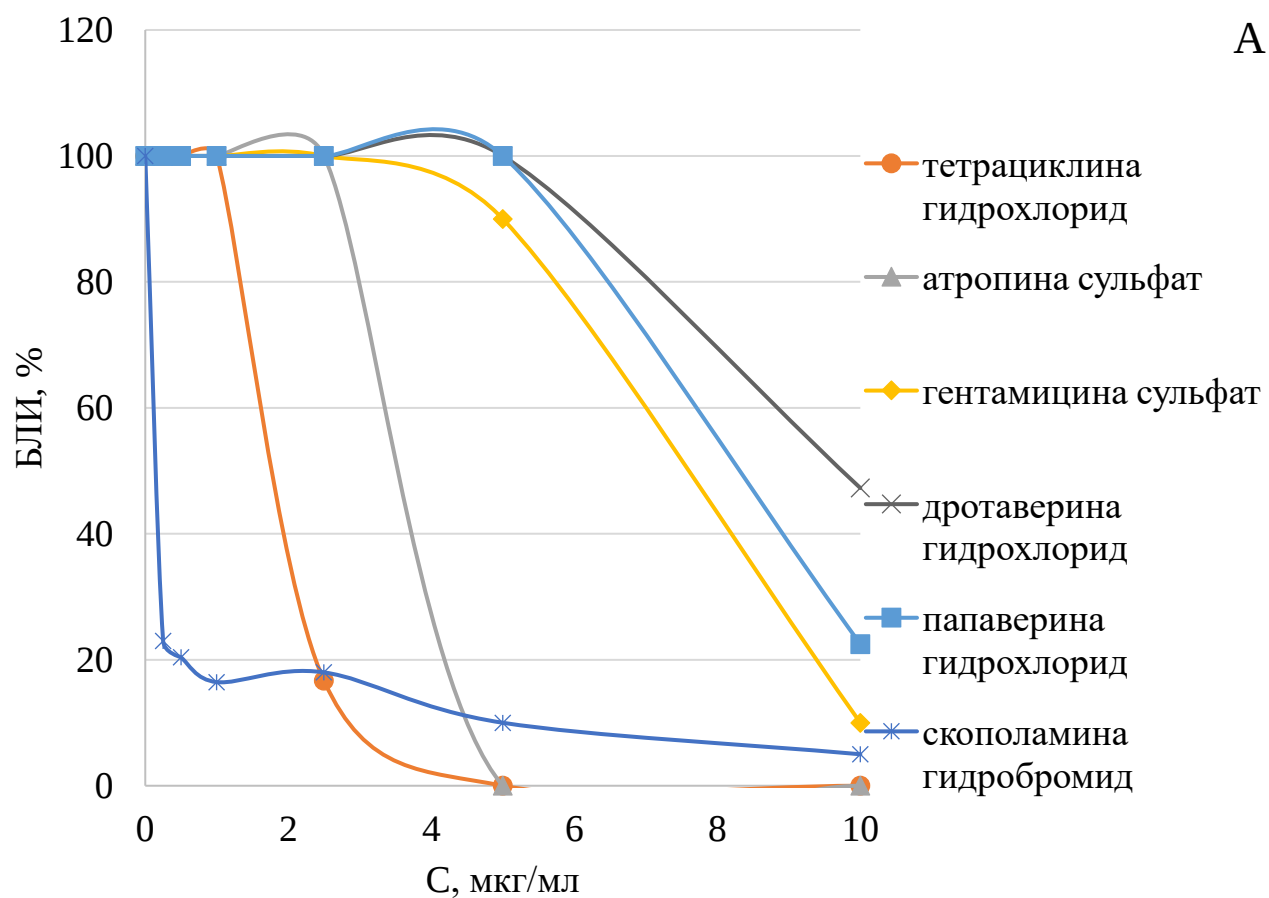
Поскольку разрабатываемая методика предполагает определение антимикробной активности у различных лекарственных веществ, в том числе и вновь разрабатываемых субстанций, на следующем этапе работы изучили влияние известных ФС, не антибиотиков, на люминесценцию бактерий штамма *P. leiognathi* Sh1. На основании результатов, полученных в разделах 3.2. и 4.1., оценку антимикробных свойств ФС проводили с использованием тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, а в качестве метода использовали оценку антимикробного действия с регистрацией аналитического сигнала через 15 минут. Для оценки антимикробного действия ФС готовили их растворы на дистиллированной воде в

концентрации 10 мг/мл. Далее полученный раствор ФС подвергали серии разведений, чтобы получить образцы с концентрации ФС от 1 до 1000 мкг/мл в пробе и провести оценку их влияния на тест-штамм, как описано в разделе 2.2.2. Для нивелирования влияния кислотности полученных растворов на биолюминесценцию тест-штамма в полученные образцы добавляли натрий-фосфатный буфере до стабилизации pH на уровне $7,2 \pm 0,1$ [8, 15].

По результатам проведенных исследований эффекты изучаемых веществ характеризовались четырьмя типами действия по отношению к свечению тест-штамма [42]. Первая группа – сильные ингибиторы, ФС, снижающие биолюминесценцию на 50 % и более в концентрациях, свойственных антибактериальным препаратам. Вторая группа – ингибиторы люминесценции, ФС, 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, ФС, при наличии которых в системе происходит снижение люминесценции на 50 % и более при количествах характерных для большинства веществ, обладающих токсичностью. Четвертая группа – нейтральные ФС, которые не оказывают снижения или повышения свечения люминесцентных бактерий более чем на 20 % от контрольных значений.

В первую группу вошли фармацевтические субстанции: атропин, гентамицина сульфат, папаверина гидрохлорид, дротаверина гидрохлорид и скополамина гидробромид, для которых $ЭК_{50}$ через 15 минут составляла до 10 мкг/мл, рисунок 11А. Вторую группу составили димедрол, аминазин, дипразин, пипольфен и галоперидол, приводящие к ингибированию биолюминесценции более чем на 50 % при концентрациях от 10 до 100 мкг/мл, рисунок 11В. Третья группа содержала ФС: лидокаин, ультракаин, унитиол, прокаина гидрохлорид, сульфокамфокаин и метамизол натрия. $ЭК_{50}$ через 15 минут для них находилась в диапазоне концентраций от 100 до 500 мкг/мл, рисунок 11С. В четвертую группу вошли лобелина гидрохлорид, строфантин, эфедрина гидрохлорид и пирацетам,

для которых, при концентрациях до 1000 мкг/мл не регистрировали снижение люминесценции более чем на 40 % от контрольных значений, рисунок 11D.



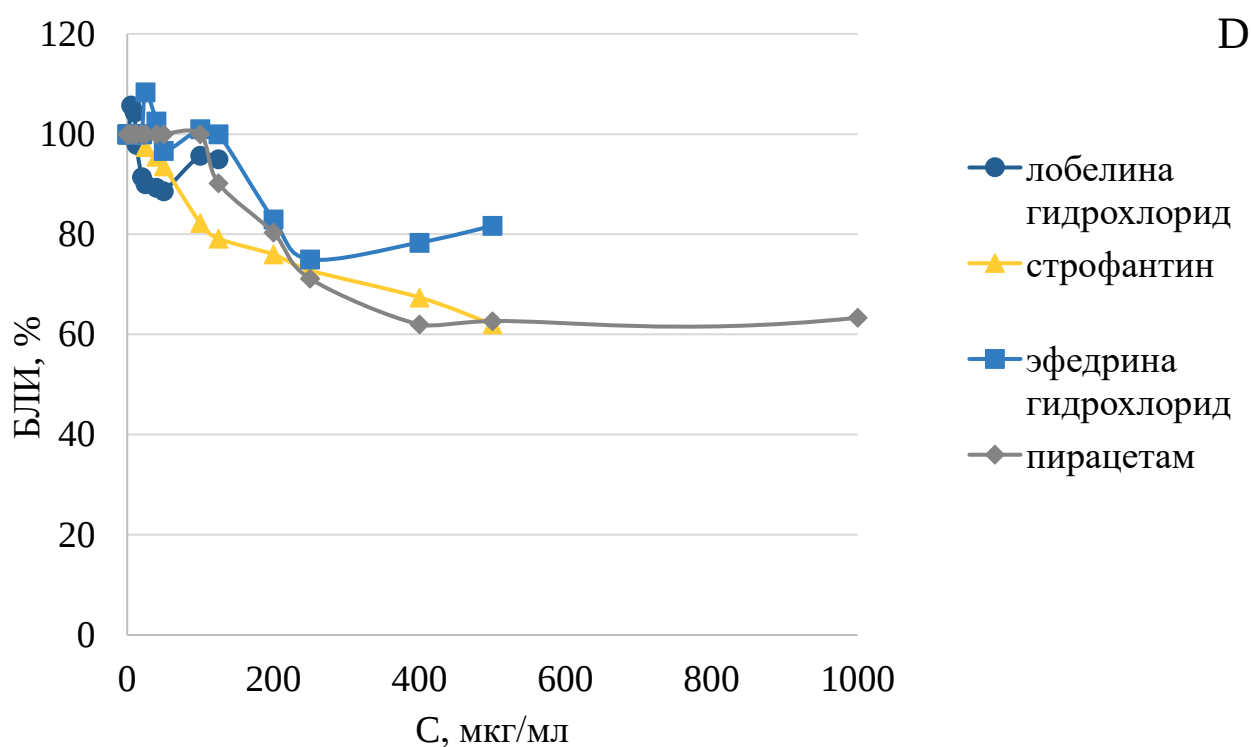
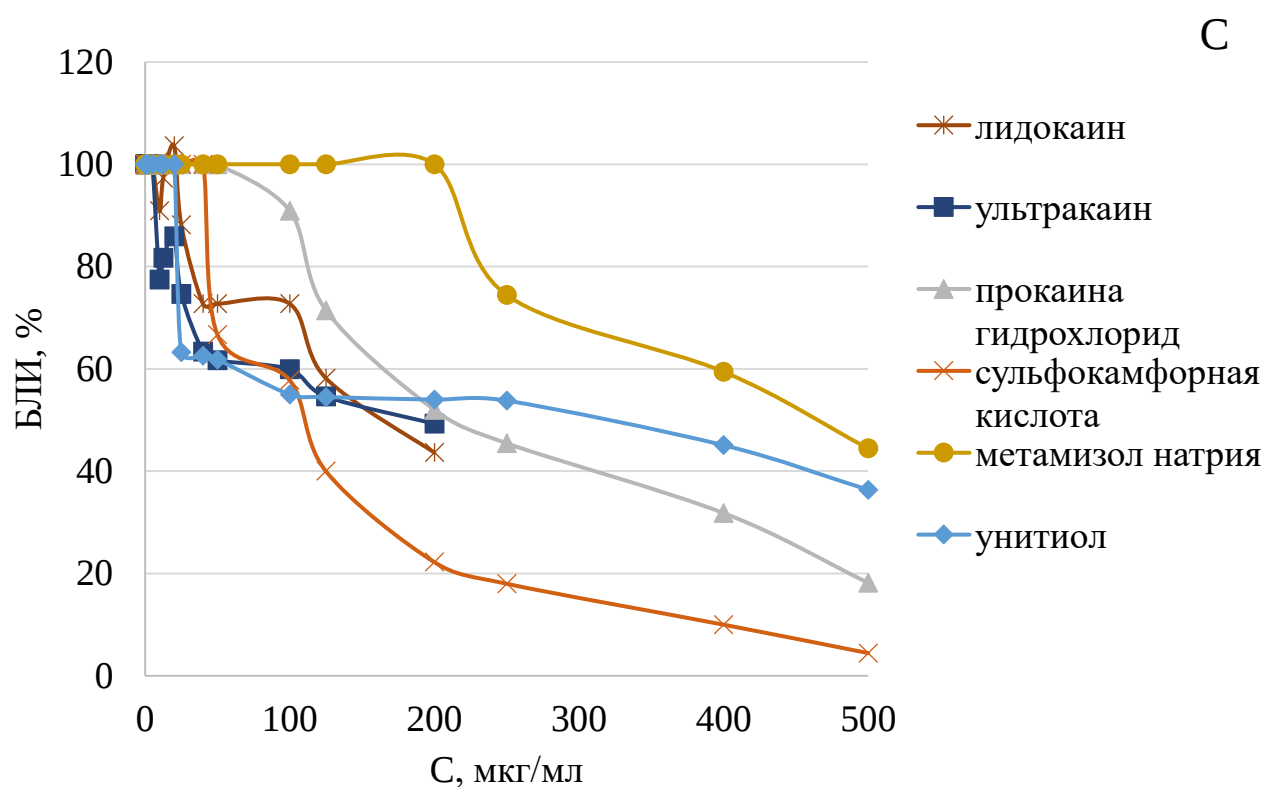
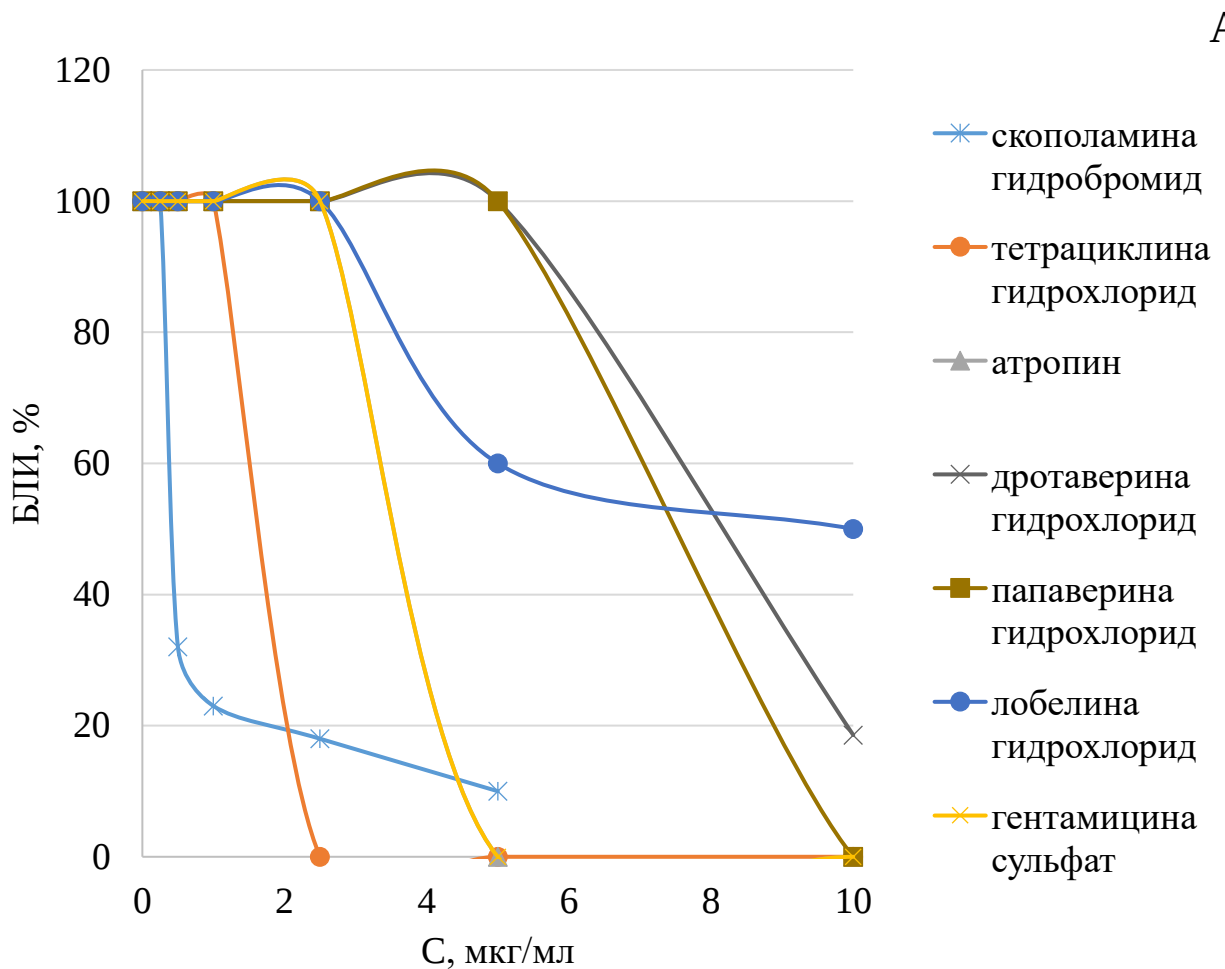
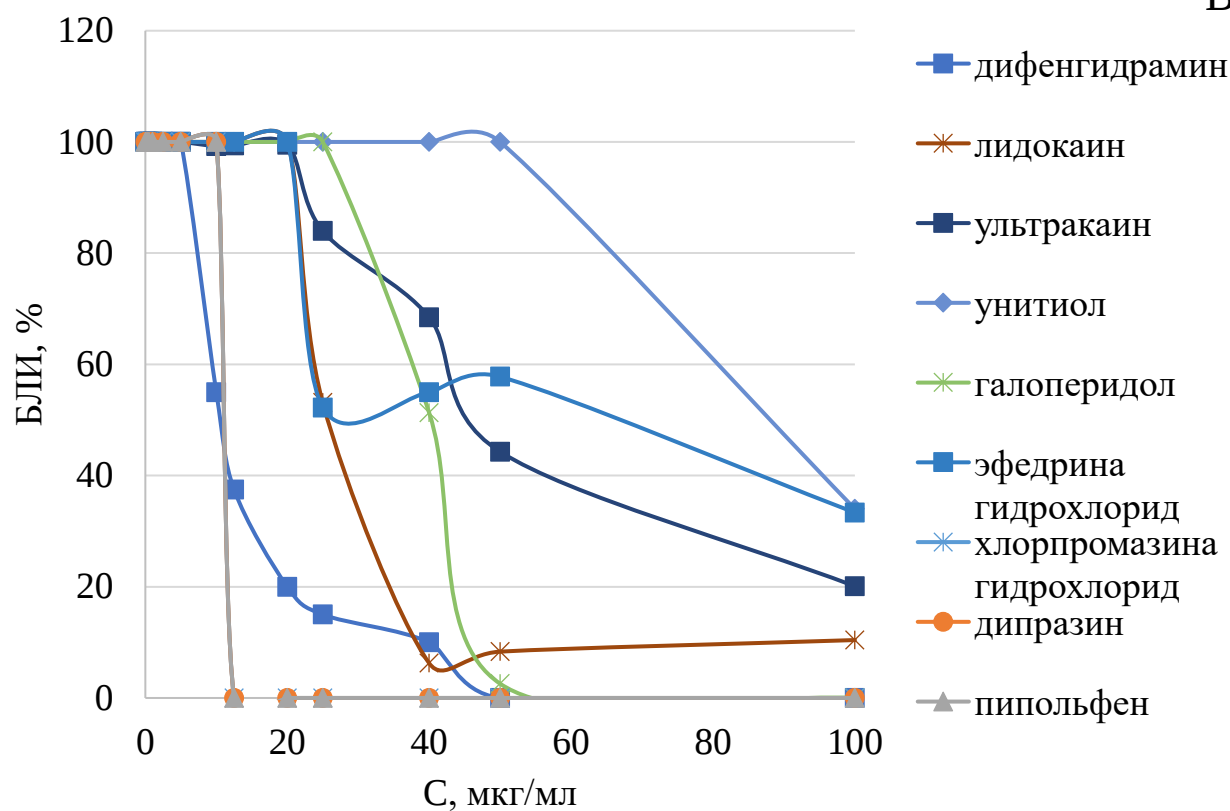


Рисунок 11 – Влиянием ФС на биолуминесцентные бактерии штамма *P. leiognathi* Sh1 через 15 минут инкубации, где А – действие ФС в концентрациях до 10 мкг/мл; В – действие ФС в концентрациях до 100 мкг/мл; С – действие ФС в концентрациях до 500 мкг/мл; D – действие ФС в концентрациях до 1000 мкг/мл.

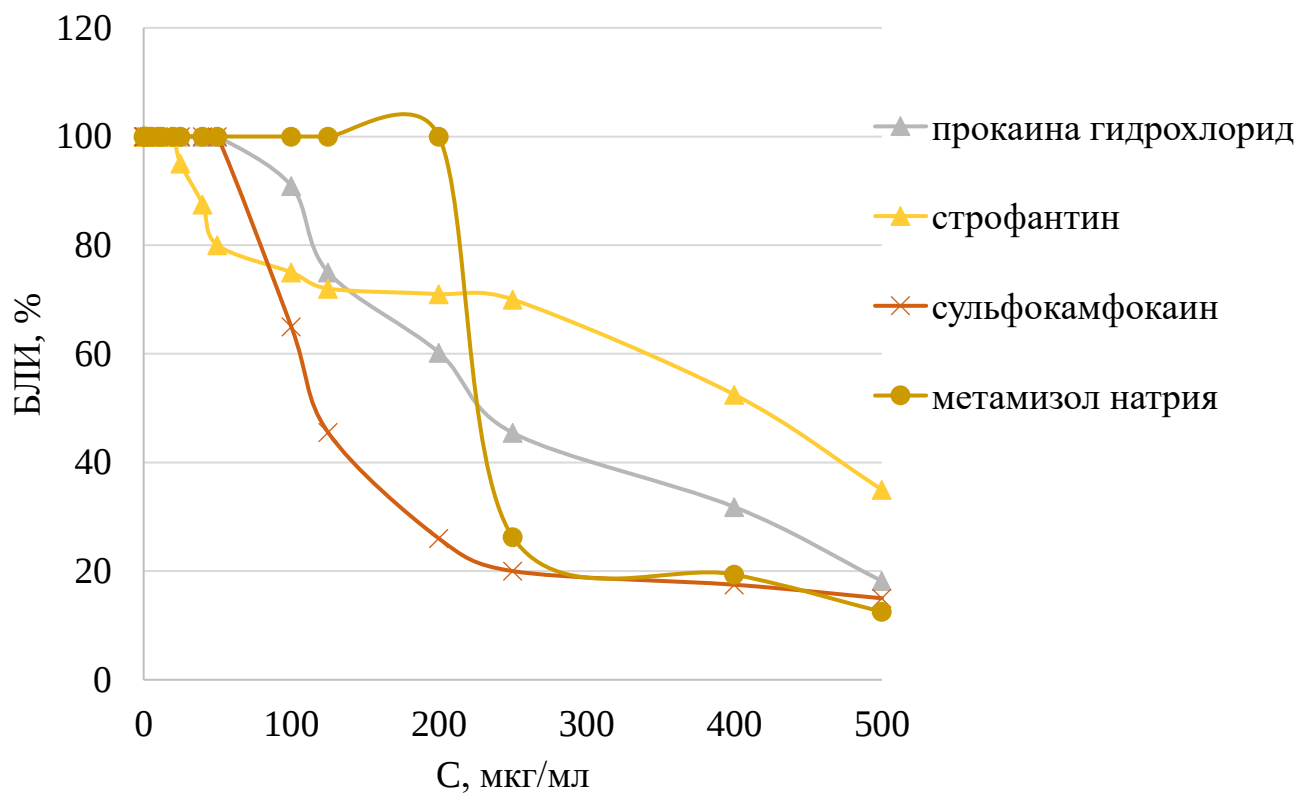
При изучении 18-ти часового действия исследуемых ФС в группу, снижающих люминесценцию более чем на 50 % при концентрации до 10 мкг/мл, вошли скополамина гидробромид, атропин, гентамицина сульфат, дротаверина гидрохлорид, лобелина гидрохлорид и папаверина гидрохлорид (рисунок 12А). Во вторую группу ФС с $ЭК_{50}$ при концентрации до 100 мкг/мл вошли димедрол, лидокаин, ультракаин, унитиол, галоперидол, аминазин, дипразин, пипольфен и эфедрина гидрохлорид (рисунок 12В). Прокаина гидрохлорид, строфантин, сульфокамфокаин и метамизол натрия составили третью группу ФС с $ЭК_{50}$ до 500 мкг/мл (рисунок 12С). Только пирацетам не оказывал влияние на биолюминесценцию бактерий и не снижал ее более чем на 10 % при 18-ти часовом действии (рисунок 12D).



В



С



D

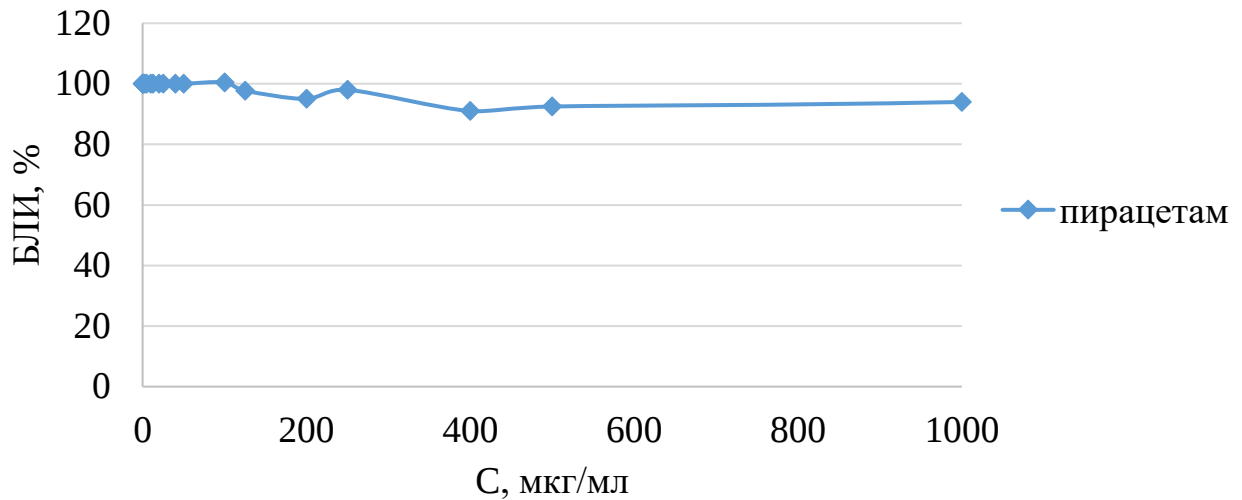


Рисунок 12 – Влияние ФС на билюминесцентные бактерии штамма *P. leiognathi* Sh1, через 18 часов инкубации где, А – действие ФС в концентрациях до 10 мкг/мл; В – действие ФС в концентрациях до 100 мкг/мл; С – действие ФС в концентрациях до 500 мкг/мл; D – действие ФС в концентрациях до 1000 мкг/мл.

Наиболее выраженные различия между 15-ти минутными 18-ти часовым значениями $ЭК_{50}$, наблюдались у лидокаина, лобелина гидрохлорида и эфедрина гидрохлорида. Их $ЭК_{50}$ через 15 минут инкубации составляла 162,0 мкг/мл и более 1000 мкг/мл для ФС содержащих алкалоиды, тогда как значение 18-ти часового действия $ЭК_{50}$ составляло 25,60 мкг/мл, 10,00 мкг/мл и 65,30 мкг/мл соответственно. Умеренные различия, от 2 до 4 раз, между 15-ти минутными 18-ти часовым значениями $ЭК_{50}$ были характерны для метамизола натрия, димедрола, скополамина гидробромид, ультракаин и унитиол. Незначительная разница между 15-ти минутными 18-ти часовым значениями $ЭК_{50}$ наблюдали для аминазина, дипразина и строфантана, в диапазоне от 1,2 (для аминазина) до 1,63 раз (для дипрозина). В целом, значения $ЭК_{50}$ в 18-ти часовом тесте меньше величин 15-ти минутной оценки биологических эффектов, что указывает на более выраженное действие исследованных веществ на бактерии в течении 18 часов.

Анализируя результаты проведенных исследований, описанных в разделах 3.2., 4.1. и 4.2., заключили, что подход для анализа фармацевтических субстанций на наличие антимикробной активности с использованием биолюминесцентных бактерии штамма *P. leiognathi* Sh1 позволяет выявить как антибактериальную активность, характерную для антибиотиков, так и неспецифическое антимикробное действие у ФС, которое может быть связано с токсичностью исследуемых веществ, обусловленной их физико-химическими свойствами и проявляемое в виде побочных эффектов у лекарственных препаратов. В то же время установили, что большинство исследуемых ФС, ингибирующих свечение люминесценции на 50 % и более, проявляют неспецифическую антимикробную активность, поскольку концентрации, используемые в экспериментальных исследованиях, для них были больше, чем у антибиотиков, от 10 до 100 раз, а также с точки зрения их механизма фармакологического действия. Таким образом, для выяснения выявленного антимикробного действия фармацевтических субстанций, в том числе и «не антибиотиков», предприняли попытку по поиску качественных взаимосвязей между структурой исследуемых ФС и их установленной антимикробной активностью.

4.3. Оценка влияния физико-химических свойств и химической структуры фармацевтических субстанций на показатели антибактериальной активности ФС с использованием биолюминесцентных тест-объектов

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 биолюминесцентного анализа от физико-химических характеристик ФС, а именно значений LogP, MW и tPSA, представленными в табл. 4.

Сравнительный анализ 15-ти минутного и 18-ти часового действия ФС на светящиеся бактерии показал некоторые отличия. Биологические проявления исследуемых веществ, кроме метамизола натрия, прокаина гидрохлорида, сульфокамфокаина и пираретама, усиливалось при увеличении времени их

воздействия на тест-штамм. Лидокаин, ультракаин и унитиол (группа 3) при 18-ти часовом действии оказывали эффекты, характерные для второй группы лобелина гидрохлорид, эфедрина гидрохлорид и строфантин, не оказывавших влияние на свечение бактерий в 15-ти минутном тесте, перешли в группу один, два и три соответственно, при оценке 18-ти часового действия.

Таким образом, производные ацетанилида, бензилизохинолина, бутирофенона, гидроксиарилалкиламина, дифенгидрамина, камфорной кислоты, нафтацена, п-аминобензойной кислоты, пергидроциклопентафенантрена, пиперидина, пиразола, пирролидина, пропан-1-сульфоната, тиофекарбоновой кислоты, тропана и фенотиазина при 18-ти часовом действии оказались в первых двух группах.

Наиболее выраженные отличия между 15-ти минутным и 18-ти часовым значениями $ЭК_{50}$, которые представлены в табл. 4, наблюдались у лидокаина, лобелина гидрохлорида и эфедрина гидрохлорида. Их $ЭК_{50}$ в 15-ти минутном варианте составляли 162,0 мкг/мл и более 1000 мкг/мл для ФС, содержащих алкалоиды, тогда как значения $ЭК_{50}$ при оценке 18-ти часового действия составляли 25,60 мкг/мл, 10,00 мкг/мл и 65,30 мкг/мл соответственно.

Различия от 2 до 4 раз между $ЭК_{50}$ при 15-ти минутном и 18-ти часовом действии были характерны для метамизола натрия, димедрола, скополамина гидробромид, ультракаина и унитиола. Незначительная разница между $ЭК_{50}$ при 15-ти минутном и 18-ти часовым действием наблюдалась для аминазина, дипразина и строфантана в диапазоне от 1,2 (для аминазина) до 1,63 раз (для дипрозина). В целом, значения $ЭК_{50}$ при 18-ти часовом тесте меньше величин, 15-ти минутной оценке биологических эффектов, что указывает на усиление неспецифического антибактериального действия субстанций на бактерии в течение 16 - 18 часов.

Поскольку среди ингибиторов люминесценции были не антибиотики, а препараты других фармакологических групп, на следующем этапе была изучена взаимосвязь между ингибированием биолюминесценции ($ЭК_{50}$) и значениями физико-химических характеристик ФС, представленными в табл. 4.

Таблица 4 – Физико-химические дескрипторы и ЭК₅₀ исследуемых ФС

№ П/П	Название ФС	ЭК ₅₀ , мкг/мл, 15 минутное действие	ЭК ₅₀ , мкг/мл, 18 часовое действие	LogP	MW	tPSA
1	2	3	4	5	6	7
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

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7
17	Прокаина гидрохлорид	$211 \pm 21,1$	$226,5 \pm 22,7$	1,32	236,31	55,56
18	Скополамина гидробромид	$0,41 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,1$	0,53	303,35	62,30
19	Строфантин	>1000	$469 \pm 46,9$	2,22	584,65	131,75
20	Сульфокамфорная кислота	$110 \pm 11,0$	$115,3 \pm 11,5$	1,32	232,30	71,44
21	Ультракаин	$177 \pm 17,7$	$46 \pm 4,6$	1,99	284,37	67,43
22	Унитиол	$310 \pm 31,0$	$86,2 \pm 8,6$	-0,22	188,30	54,37
23	Хлорпромазина гидрохлорид	$19,3 \pm 1,9$	$16,1 \pm 1,6$	5,23	318,86	6,48
24	Эфедрина гидрохлорид	>1000	$65,3 \pm 6,5$	0,93	165,24	32,26

Примечание: * – физико-химические свойства и результаты оценки антимикробных свойств указанных препаратов отвечают литературным данным [36, 37, 39, 40, 44].

По результатам сравнения ЭК₅₀ и LogP, MW и tPSA установили определенные взаимосвязи между ЭК₅₀ ФС и их физико-химическими параметрами для представителей одной фармакологической группы.

Только для ФС, содержащих антибиотики, наблюдали повышение значений ЭК₅₀ при увеличении значений LogP и снижение значений tPSA. Представители H₁-антигистаминных средств, которые ингибировали люминесценцию как при 15-ти минутном, так и при 18-ти часовом варианте, что подтверждают данные Moustafa A. El-Nakeeb и соавторы, 2011 [204], также характеризовались взаимосвязью ЭК₅₀ с физико-химическими параметрами. При уменьшении значений LogP и MV в отличие от антибиотиков наблюдали повышение значений ЭК₅₀⁰ и ЭК₅₀^X. А увеличение tPSA приводило к росту ЭК₅₀ как при 15-ти минутном, так и при 18-ти часовом действии.

Вещества из группы местных анестетиков также снижали люминесценцию бактерий в обоих вариантах биотестирования, что подтверждают исследования M. J. Svena и соавторов по наличию антимикробного действия у этой группы веществ [251].

При сопоставлении физико-химических характеристик и биоактивности ФС было выявлено, что увеличение LogP приводило к увеличению значений ЭК₅₀. В то же время не наблюдалось влияния MV, tPSA на значения ЭК₅₀ для данной группы препаратов.

Поскольку наибольшей группой ФС, снижающих биолюминесценцию и не являющихся антибактериальными средствами, выступали алкалоиды, для них были изучены корреляционные зависимости между физико-химическими характеристиками LogP, MV, tPSA и ЭК₅₀ с последующим анализом полученных результатов. По данным биотестирования 15 минутного действия ФС, содержащих алкалоиды, определили, что три из них (атропин, папаверина гидрохлорид и скополамина гидробромид) оказывают сильное ингибирующее действие в концентрациях собственных антибиотикам (рисунок 11А), а остальные (лобелина гидрохлорид и эфедрина гидрохлорид) не оказывали значительного влияния при оценке 15-ти минутного действия (рисунок 11D). В то же время при 18-ти часовом

действии все алкалоиды характеризовались $ЭК_{50}$ менее 100 мкг/мл, рисунок 12А и 12В. При сопоставлении $ЭК_{50}$ и физико-химических параметров действующих веществ ФС выявили достоверные корреляции $ЭК_{50}^O$ и tPSA равной $-0,85 ЭК_{50}^X$ и MW на уровне $-0,91$ и $ЭК_{50}^X$ и tPSA – $-0,81$. Такие значения говорят о том, что снижение значений MW и tPSA для веществ из группы алкалоидов будет приводить к увеличению $ЭК_{50}$, снижающей биолуминесценцию, что в свою очередь будет приводить к повышению концентрации, оказывающей неспецифический антибактериальный эффект исследуемой ФС, содержащей алкалоиды.

Кроме того, отмечено, что различия между значением $ЭК_{50}$ при 15-ти минутном и 18-ти часовом действии варьировали в зависимости от химического строения ФС.

При сравнении значений $ЭК_{50}$, как показателем антимикробной активности ФС, и LogP, MW, tPSA, как их параметрами, ответственными за проявление таких биологически свойств, с высоким уровнем достоверности выявить не удалось. Такие результаты анализа говорят о том, что прогнозирование антимикробной активности по рассчитанным или моделируемым физико-химическим параметрам затруднено и ни один из параметров не является достаточным и не может быть использован в качестве единственного дескриптора [107].

Поэтому на следующем этапе работы проведен сравнительный анализ между химической структуры ФС и антимикробными проявлениями исследованных субстанций не антибиотиков.

При анализе строения изучаемых фармацевтических субстанций были выявлены некоторые структурные компоненты, обладающие антибиотической активностью. Фенотиазин (1, рисунок 13) – основа для синтеза инсектицидов, содержали аминазин, дипразин и пипольфен. Дифенилметан (2, рисунок 13), производные которого служат пестицидами, фунгицидами и бактерицидами является основой димедрола. Диметиламин (8, рисунок 13) и его гомологи, используемые в производстве гербицидов, содержался в димедроле, тетрациклине, лидокаине и прокаина гидрохлориде.

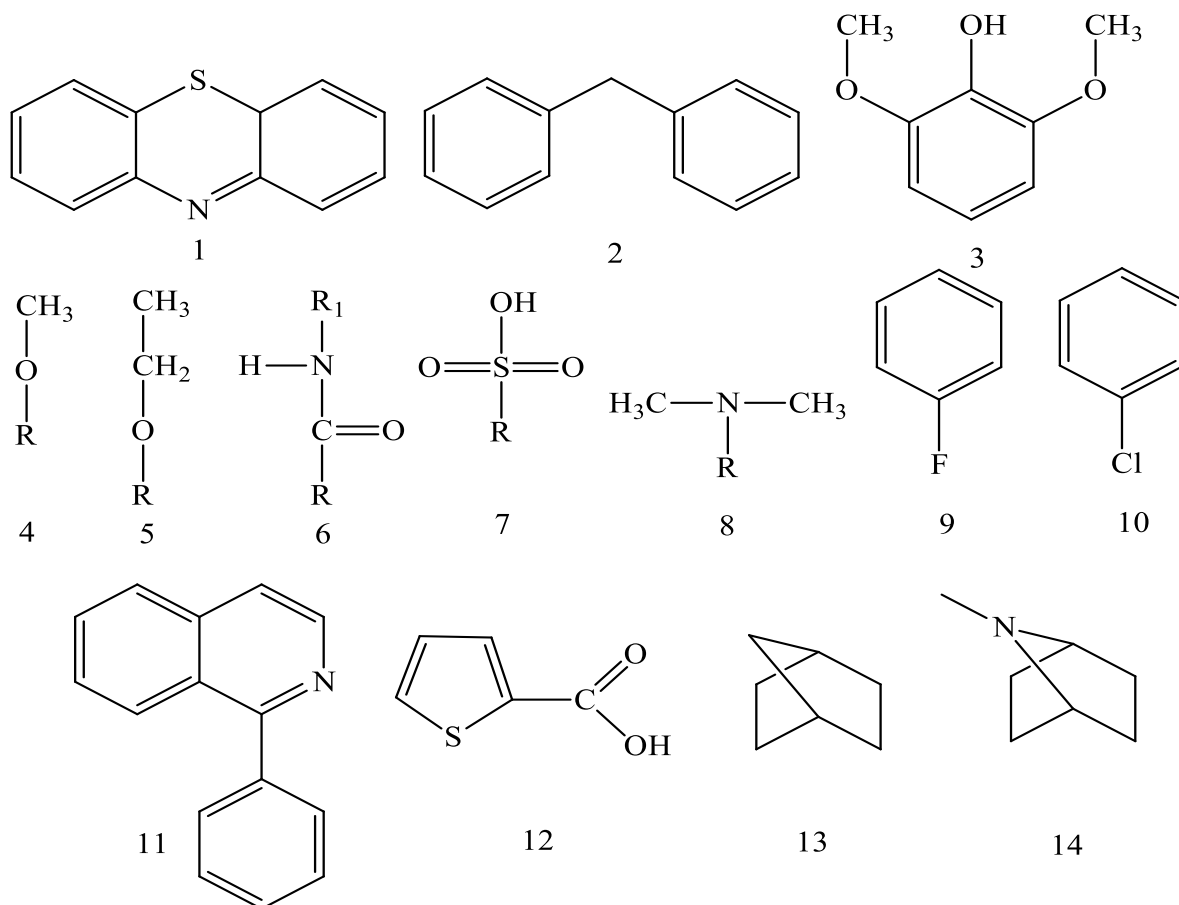


Рисунок 13 – Структурные компоненты исследуемых ФС, обладающие антибиотической активностью, где 1 – фенотиазин, 2 – дифенилметан, 3 – орто-диметоксифенол, 4 – метоксигруппа, 5 – этоксигруппа, 6 – ацетамидный. 7 – сульфогруппа, 8 – диметиламин, 9 – хлорфенил, 10 – фторфенил, 11 – 1-бензилизохинолин, 12 – 2-тиофенкарбоновая кислота.

Анализ структуры спазмолитиков показал, что препарат дротаверина гидрохлорид и папаверина гидрохлорид содержат орто-диметоксифенол (3, рисунок 13), предшественником которого является гваякол, обладающий антисептическими свойствами. А также в структуры входит 1-бензилизохинолин (11, рисунок 13), обладающий антибактериальной активностью [219]. Метокси и/или этокси группа (4, 5, рисунок 13) входила в строение папаверина, ультракаина, строфантина и дротаверина гидрохлорида. Ацетамидный участок (6, рисунок 13), который прикрепляется к ферментам и изменяет их активность содержался в тетрациклине и ультракаине и пирацетаме [135]. Сульфогруппа (7, рисунок 13) присутствовала в метамизоле натрия и унитиоле. Производное 2-

тиофенкарбоновой кислоты (12, рисунок 15), используемой в качестве отбеливателя с 3-пропиламинобутаноновый радикалом, обладающим свойствами гербицида, составляли структуру ультракаина. Галоперидол в своей структуре имеет радикалы: хлорфенил (9, рисунок 13), содержится в структуре пестицидов, и фторфенил (10, рисунок 13), используемый при синтезе противоопухолевых препаратов.

При анализе ФС, содержащих алкалоиды, определили, что атропин и скополамина гидробромид, проявляют высокую антибиотическую активность как в отношении *P. leiognathi* Sh1, так и других бактерий [156]. Предположительно это связано с тем, что действующие вещества ФС являются аналогами холина и имеют в структуре третичный атом азота, у которого в качестве заместителей содержатся метильные группы, что позволяет этим соединениям связываться с LytA амидазой [192]. А также в них содержится аналог бицикло[2.2.1]гептана (13, рисунок 13), обладающий антимикробной активностью – тропан (14, рисунок 13) [42].

Эфедрин обладает 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 [152, 256]. Лобелин обладает 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 [166, 181].

На основании результатов проведенных исследований установили, что вещества с неантибактериальным механизмом действия могут проявлять неспецифическую антимикробную активность по отношению к биолюминесцентным бактериям *P. leiognathi* Sh1, которая зависит от типа функциональных групп, их количества и расположения в структуре соединения. При этом наиболее выраженное действие ФС проявляется, когда такая группа – основа структуры молекулы, и понижается в 5 и более раз, если такой участок является заместителем в строении фармацевтической субстанции. При анализе

зависимости биологического эффекта от физико-химических свойств и строения готовых ФС выявлено, что главную роль играет химическое строение ФС, а физико-химические свойства играют вторичную роль. На основании результатов проведенных исследований установили, что вещества с не антибактериальным механизмом действия могут проявлять неспецифическую антимикробную активность по отношению к биолюминесцентным бактериям *P. leiognathi* Sh1, которая зависит от особенностей их строения и частично физико-химических свойств, в рамках критериев Липински.

4.4. Методика анализа антимикробной активности фармацевтических субстанций с использованием биолюминесцентных тест-объектов

В ходе проведенных исследований и анализа полученных результатов разработана методика оценки антимикробной активности веществ различной природы, в том числе антибиотиков, в условиях лаборатории, с использованием биохемилюминометра БХЛ-06 (Н. Новгород, Россия), в качестве устройства для регистрации свечения природного биолюминесцентного тест-штамма *Photobacterium leiognathi* Sh1. Разработанная методика основана на регистрации интенсивности биолюминесценции бактерий и ее изменение при воздействии антибиотиков или веществ с предполагаемой антимикробной активностью в анализируемой пробе, по сравнению с контролем. Снижение яркости свечения биолюминесцентных бактерий прямо пропорционально антимикробному эффекту исследуемой ФС или вещества.

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 ЭК₅₀ – эффективная концентрация образца, вызывающая снижение свечения тест-штамма на 50 % по сравнению с контролем. Индекс биолюминесценции «БЛИ», равный отношению БЛИ = I_o/I_k (выражается в относительных единицах) или БЛИ = $(I_o/I_k) \times 100 \%$

(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 регистрируемое значение индекса БЛИ более 1 или 100 %. В таком случае индекс БЛИ принимается равным 1 или 100 %.

Оценка антимикробной активности ФС, в том числе антибиотиков и веществ с неустановленной антимикробной активностью проводится при температура окружающей среды от 20 до 25 °С при относительной влажности воздуха не более 80 % и атмосферном давлении 700 - 800 мм рт.ст. (93,3 - 106,7 кПа). Помещение, в котором проводится оценка, не должно содержать токсичных газов и их паров.

Подготовительные работы для оценки антимикробной активности ФС и веществ с неустановленной антимикробной активностью включает в себя подготовку как места в лаборатории для хранения образцов и работы с ними, так и

посуды для проведения анализа. Все процедуры по подготовке к анализу субстанций должны исключить загрязнение проб и образца для анализа.

При проведении оценки антимикробной активности используется чистая посуда и пластик. Для мытья посуды не используют поверхностно активных веществ синтетического происхождения и органические растворители. Посуду сушат в сушильном шкафу при температуре 80 °С в течении не менее одного часа. Хранение чистой посуды и пластика для анализа производится в защищенном от попадания пыли месте.

Кюветы для люминометра перед проведение анализа очищают хромовой смесью. После тщательно промывают под проточной водой и ополаскивают от 5 до 10 раз с использованием дистиллированной воды

Анализ ФС, в том числе антибиотиков, или веществ с неустановленной антимикробной активностью проводят не позже 2-х часов после первого вскрытия емкости для их хранения. Перед оценкой ФС или веществ необходимо измерить pH и температуру полученных растворов.

Пробоподготовка тест-бактерий штамма *Photobacterium leiognathi* Sh1 для проведения анализа осуществляется путем культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде для биOLUMИнесцентных микроорганизмов с 3 % содержанием натрия хлорида за 18 - 24 часа до начала исследования. Все последующие разбавления полученной бактериальной суспензии проводят 3 % раствором натрия хлорида (чистым для анализа). В пробы, содержащие образец для анализа, доводят натрия хлоридом до конечного содержания равного 3 %. Перед началом тестирования необходимо выдержать полученную суспензию тест-бактерий на протяжении 30 минут при постоянном перемешивании перед внесением к образцу для анализа. Также перед внесением тест-бактерий штамма *Photobacterium leiognathi* Sh1 необходимо перемешивание.

Подготовку прибора биохемилюминметра БХЛ-06 (Н. Новгород, Россия) проводят в соответствии с инструкцией к прибору. Перед началом анализа необходимо удостовериться в том, что свечение контрольной пробы, содержащей все компоненты исследуемой пробы за исключением исследуемой ФС или

вещества с неустановленной антимикробной активностью, превышала фоновое значение прибора в 80 - 100 раз, но не превышала верхний предел регистрируемого значения интенсивности люминесценции для прибора.

Процедура оценки антимикробной активности ФС, в том числе антибиотиков и веществ с неустановленной антимикробной активностью состоит из четырех этапов: определение биолюминесцентного индекса; обработка результатов анализа; оценка антимикробной активности пробы, содержащей исследуемый образец и контроль качества методики оценки антимикробной активности веществ различной природы, в том числе антибиотиков.

При определении биолюминесцентного индекса одновременно проводят измерение контрольных (не содержащих анализируемых веществ) и опытных проб, а также использовать минимум по три контрольных и опытных образцах. Для повышения достоверности получаемых данных количество параллельных измерений анализируемой пробы можно увеличить до 10 измерений. Вначале измеряют контрольные пробы и регистрируют полученные значения. Затем измеряют повторности опытной пробы.

Измерение интенсивности биолюминесценции тест-штамма бактерий проводят с использованием биохемилюминометра БХЛ-06 согласно инструкции по эксплуатации прибора.

При проведении стандартного анализа 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 5×10^6 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.

Пригодность рабочей суспензии бактерий тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 составляет не более 8 часов после её приготовления. Хранение её осуществляют при комнатной температуре.

Погрешность методики биотестирования контролируют путем определения чувствительности тест-штамма *Photobacterium leiognathi* Sh1 к цинку сернокислому 7-водному. Для этого готовят раствор соли цинка сернокислого на дистиллированной воде в концентрации 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 водным. При этом значение БЛИ должно быть равным либо меньшим 0,5 или 50 % при концентрации сульфата цинка 7-ми водного 7,0 мкг/мл. Если при данной концентрации БЛИ выше 0,5 или 50 %, то следует проверить качество растворов и их приготовление, условия проведения опытов и исходный материал.

4.5. Определение некоторых валидационных характеристик методики биолюминесцентного анализа антимикробной активности антибиотиков

Подтверждение пригодности разработанной методики биотестирования с использованием тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 проводили путем определения некоторых валидационных характеристик, описанных в разделе 2.2.5. Оценку данных параметров осуществляли для тест-штамма при контакте с аминогликозидным антибиотиком широкого спектра действия – гентамицином сульфатом при 15-ти, 30-ти и 60-ти минутах и 18-ти часах инкубации. Для этого готовили раствор гентамицина сульфата на дистиллированной воде в концентрации 1 мг/мл. Затем готовили пробы, как описано в разделе 2.2.2, с добавлением в пробу 50 мкл натрий-фосфатного буфера с $\text{pH} = 7,2 \pm 0,1$ для нивелирования влияния кислотности полученного раствора на биолюминесценцию тест-штамма [15]. Результаты воздействия гентамицина сульфата на люминесцентный тест-объект представлены на рисунке 14.

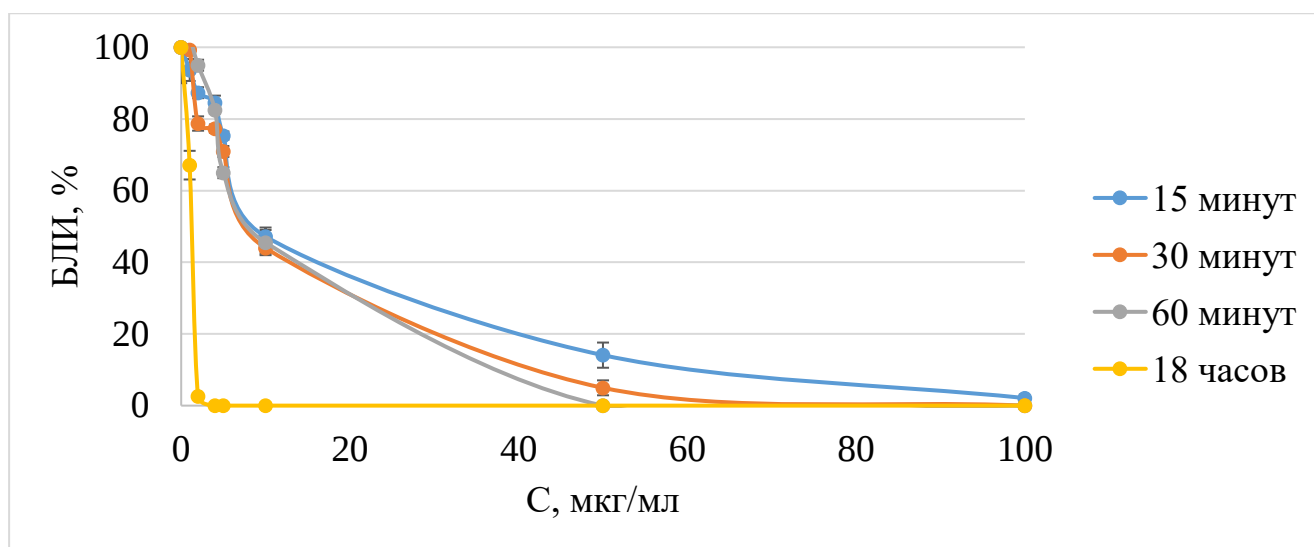


Рисунок 14 – Действие гентамицина сульфата на тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 при различном времени инкубации.

Для определения некоторых валидационных характеристик и статистической обработки экспериментальных данных воспользовались подходами и формулами, описанными в разделах 2.2.5. и 2.2.6. На первом этапе провели логарифмирование полученных экспоненциальных зависимостей БЛИ от концентрации сульфата цинка в пробе для линеаризации полученных моделей в линейную функцию с целью выявления математического выражения, подтверждающего линейность методики. Результаты представлены на рисунке 15.

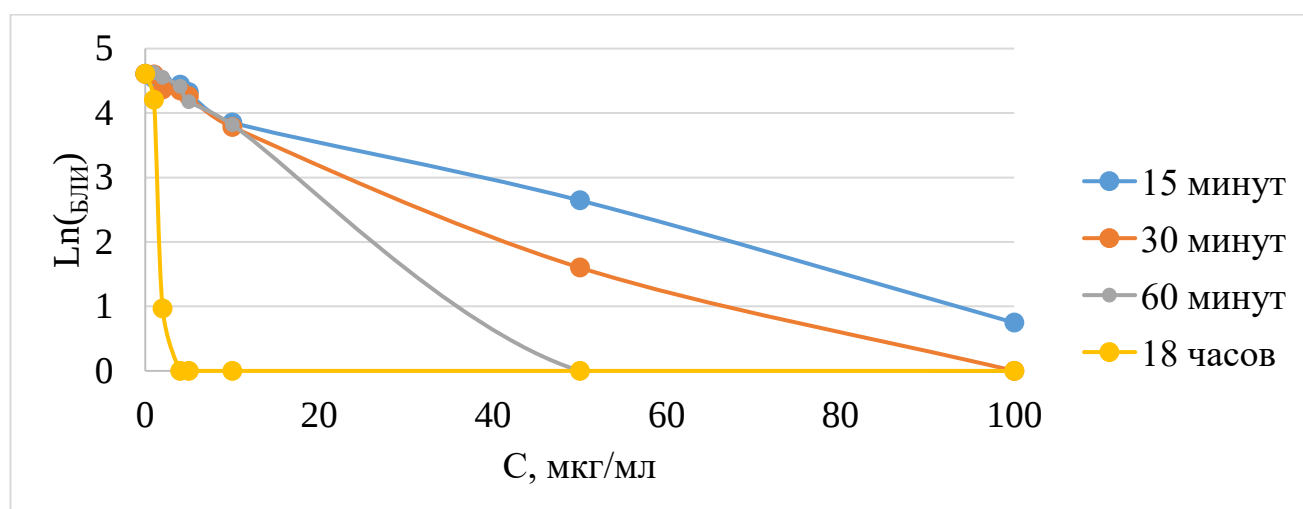


Рисунок 15 – Действие гентамицина сульфата на тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 при различном времени инкубации после линеаризации.

В ходе логарифмирования полученных экспоненциальных зависимостей БЛИ от концентрации гентамицина сульфата получены линейные математические зависимости, а также проведены представленные в таблице 5 статистические расчеты по экспериментальным данным, позволившие определить ПО и ПКО для каждого из методов.

Таблица 5 – 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
1	2	3	4	5
n	24			
S	0,173	0,127	0,029	0,089
b	-0,038	-0,059	-0,094	-1,254
Δx , 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	$y = -0,038 \times x + 4,516$	$y = -0,059 \times x + 4,551$	$y = -0,094 \times x + 4,707$	$y = -1,254 \times x + 4,639$
R ²	0,992	0,993	0,999	0,829

В результате определения аналитической области для методик установили, что для 15-ти минутной инкубации данная область находится в пределах от $15,046 \pm 0,217$ до $119,463 \pm 3,671$ мкг/мл, для 30-ти минут – от $7,088 \pm 0,245$ до $76,354 \pm 1,824$ мкг/мл, для 60-ти минут – от $1,046 \pm 0,037$ до $50,129 \pm 0,693$ мкг/мл и для 18-ти часового интервала времени – от $0,236 \pm 0,146$ до $3,699 \pm 0,259$ мкг/мл.

На основании полученных результатов для характеристики антимикробной активности антибиотиков наиболее рациональным подходом является оценка

воздействия исследуемых веществ с использованием в качестве тест-объекта природного биолюминесцентного штамма бактерии *P. leiognathi* Sh1 с временем инкубации 15 минут. Поскольку данный подход обладает самой широкой аналитической областью и наименьшим временем получения результатов. Значения ПО и ПКО, получаемые с использованием данного метода, от 2 до 4 раз меньше в сравнении 30 и 60 минутным тестом, и коэффициент детерминации равен 0,99. Однако значения ПО для 15 минутного тестирования превосходят в 15 раз значения минимальной определяемой концентрации большинства антибиотиков, описанных в ОФС 1.2.4.0010.18 [7].

По результатам проведенных исследований показано, что морские природные биолюминесцентные бактерии штамма *P. leiognathi* Sh1 чувствительны к действию антибактериальных препаратов и могут быть использованы в качестве тест-объекта для выявления некоторых видов биологической активности фармацевтических субстанций, в частности специфической антибактериальной активности.

4.6. Технологическая схема анализа антимикробной активности фармацевтических субстанций с использованием биолюминесцентных тест-объектов

Представленные в разделе 4 результаты исследований и разработанная методика оценки антимикробной активности антибиотиков в разделе 4.4. позволяют предложить технологическую схему использования биолюминесцентных тест-объектов для скрининга веществ на наличие у них антимикробной активности, рисунок 16.

На первом этапе анализа веществ на наличие антимикробного действия необходимо провести оценку таких ключевых характеристик исследуемого вещества, как растворимость в растворителях, значение рН и концентрацию солей в растворе, а также провести расчет физико-химических дескрипторов и определить фармакофорные группы для вещества. Далее внести корректировки в методику биотестирования веществ с учетом полученных данных из предыдущего

анализа таким образом, чтобы исключить влияние всех факторов, кроме биологического действия анализируемого вещества, на свечение тест-штамма люминесцентных бактерий. Параллельно проводится выбор оптимального штамма люминесцентных бактерий для оценки как специфического антибактериального, так и неспецифического антимикробного действия путем сравнения влияния анализируемых 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 вещества, снижающего свечение бактерий более чем на 80 % от контрольных значений.

После подбора условий для проведения биотестирования и выбора тест-штамма проводится скрининг антибиотических проявлений анализируемых веществ, по результатам которого проводится ранжирование веществ по ЭК₅₀. Такое ранжирование позволяет отобрать вещества, для которых эффективная концентрация, снижающая свечение, характерна для известных антибактериальных веществ (контрольных антибиотиков) или превосходит ее.

На следующем этапе проводится сопоставление ранее определенных физико-химических дескрипторов и фармакофорных групп анализируемых веществ с результатами скрининга антибиотической активности веществ – ЭК₅₀. После определяют вещества, которые зарекомендовали себя как наиболее вероятные субстанции с антимикробной активностью.

Основываясь на результатах проведенных исследований, описанных главах 1, 3 и 4, данная технологическая схема и методика анализа антимикробной активности фармацевтических субстанций с использованием биолюминесцентных тест-объектов с учетом химической структуры и физико-химических свойств исследуемых веществ, а также условия их биотестирования, может найти применение для скрининговых исследований вновь синтезируемых веществ на антимикробную активность.

По материалам главы опубликованы работы [12, 17, 25, 31, 36, 37, 38, 44, 247].

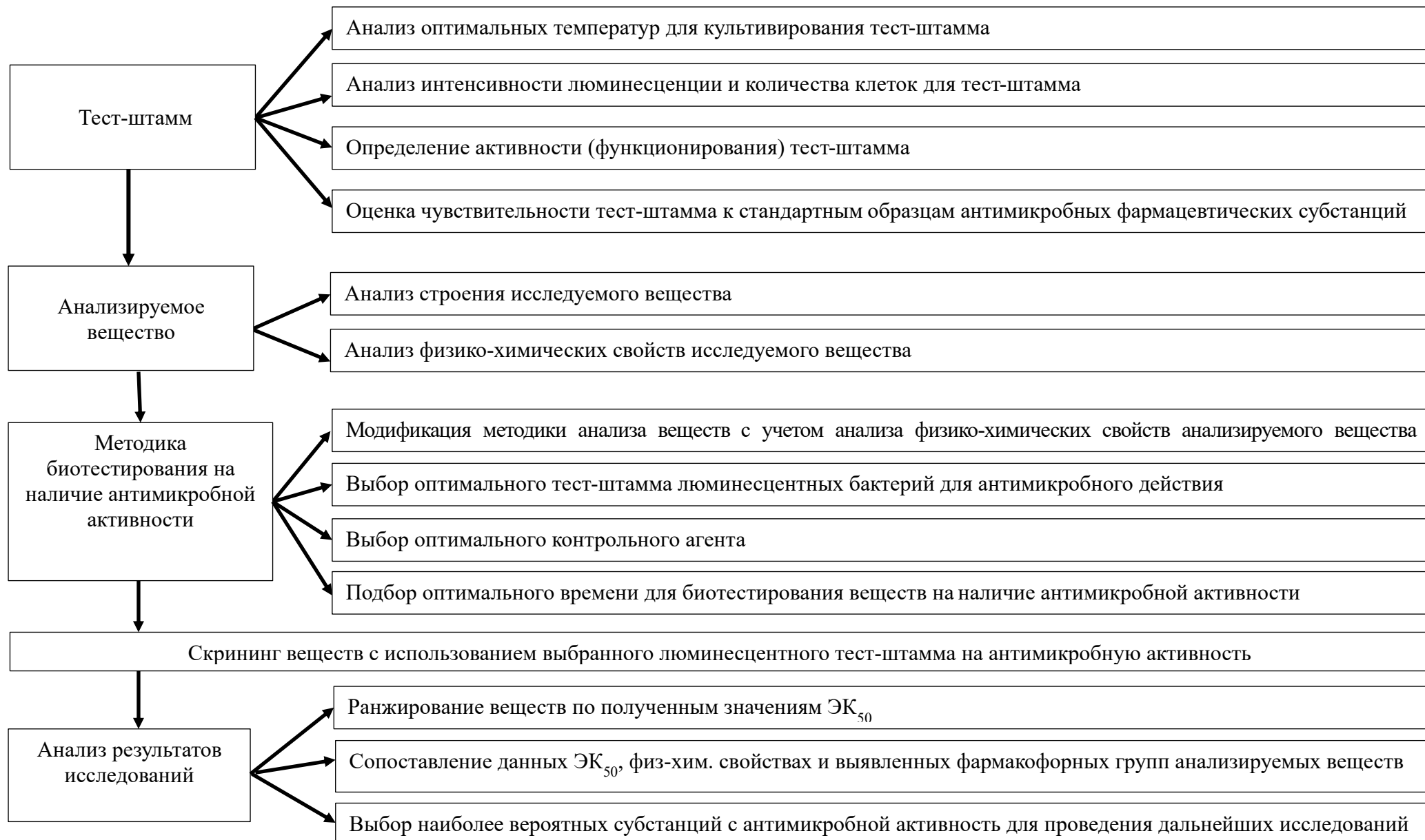


Рисунок 16 – Алгоритм анализа веществ на наличие антимикробной активности с использованием биолюминесцентных тест-объектов

Выводы по Главе 4

1. Проведена валидация методики оценки антимикробной активности гентамицина сульфата с использованием в качестве тест-объекта природного биолюминесцентного штамма бактерии *P. leiognathi* Sh1, в результате которой установлено, что оценка биологического действия с временем регистрации аналитического сигнала 15-ти минут является оптимальной, поскольку данный интервал времени обладает наибольшим диапазоном аналитической области, наименьшим временем получения результатов и имеет линейную зависимость с коэффициентом детерминации 0,99.

2. Получены данные об антимикробной активности как антибиотиков, так и ФС с неантимикробным механизмом действия в отношении природного люминесцентного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, которые позволяют выявить как антимикробную, так и неспецифическую антибактериальную активности.

3. Среди исследованных ФС выявлены сильные ингибиторы БЛИ с ЭК₅₀ до 10 мкг/мл, характерные для антибактериальных препаратов. Группа веществ, снижающих БЛИ с диапазоном ЭК₅₀ от 10 до 100 мкг/мл, которые характерны для веществ, обладающих высоким уровнем токсичности. ФС— умеренные ингибиторы БЛИ с ЭК₅₀, характерной для большинства веществ, обладающих токсичностью, которая составила от 100 до 500 мкг/мл, и нейтральные ФС по влиянию на БЛИ с ЭК₅₀ свыше 500 мкг/мл.

4. Установлено, что ФС с неантибактериальным механизмом действия могут проявлять неспецифическую антимикробную активность по отношению к биолюминесцентным бактериям *P. leiognathi* Sh1, которая зависит от типа фармакофорных групп, их количества и расположения в структуре соединения.

5. На основании полученных результатов проведенных исследований разработана методика анализа веществ, в том числе антибиотиков, на наличие антимикробной активности с использованием биолюминесцентного тест-объекта *P. leiognathi* Sh1.

ГЛАВА 5. 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-С]ХИНАЗОЛИН-6-ИЛ)- ТИО]УКСУСНЫХ КИСЛОТ (NKV) НА НАЛИЧИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ

На следующем этапе работы стояла задача провести испытания разработанной методики, описанной в разделе 4.4., к анализу антимикробной активности направленно синтезированных веществ с использованием биолюминесцентных тест-объектов. В качестве тестовой группы веществ использованы направленно синтезированные производные 2-[(3-R-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)-тио]уксусных кислот (NKV), сведения о биологической активности которых показывают, что эти вещества обладают антибактериальной, противогрибковой и другими видами активности [67, 68, 108, 110, 111, 210].

Для подтверждения выдвигаемой гипотезы о возможности скрининга веществ на наличие антимикробной активности с использованием биолюминесцентных тест-объектов провели оценку результатов биолюминесцентного скрининга NKV и их производных с использованием природного люминесцентного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, панели генно-инженерных lux-биосенсоров на основе *E. coli*, а также сравнили полученные результаты с биологической активностью NKV и их производных на эталонных тест-культурах микроорганизмов.

5.1. Описание, растворимость и физико-химические свойства 3-R-6-тио- 6,7-дигидро-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-2-онов и их галогенсодержащих аналогов

Исследования, направленные на формирование [1,2,4]триазино[с]хиназолиновых систем с использованием известных и новых нуклеофилов и их функциональных производных, оправдано, а установление

строения, физико-химических и биологических свойств новых [1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолинов является актуальной задачей современной органической, медицинской и фармацевтической химии [67, 68, 108, 110, 111, 210]. Исходные вещества для синтеза 2-[(3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио]уксусных кислот и их производных, такие как производные пиримидина, 2,3-дигидроимидазо[1,2-с]хиназолина, пирано[4',3':4,5]фуоро[3,2-а]-[1,2,4]триазоло-(тетразоло)[4,3-а]пиримидинов и 3-R-6-тио-6,7-дигидро-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-2-онов обладают различной биологической активностью, в частности, противораковой, противовирусной, радиопротекторной, ангиопротекторной, антигипертензивной и др. видами активности. Анализ публикаций, которые посвящены влиянию галогенов на биологическую активность органических веществ, показал, что наибольшее внимание исследователей посвящено атому фтора [73, 139]. Это связано с революцией в синтетических подходах, которые позволяют вводить данные атомы в состав органических молекул, а также о межмолекулярных фтор-протеиновых взаимодействиях за счет влияния на липофильность, константу диссоциации и конформацию молекулы [153, 169, 205]. Следует отметить, что в последнее время появляются публикации, посвященные влиянию хлора, брома и йода на биологическую активность органических соединений, что может говорить о перспективности данного подхода [73, 139, 148, 153, 169, 205].

Для синтеза производных NKV была применена методика [67, 68, 69] направленного синтеза N-арил-(бензил-, фенитил-)-2-[(3-R-9-R₁-10-R₂-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]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 (рисунок 17).

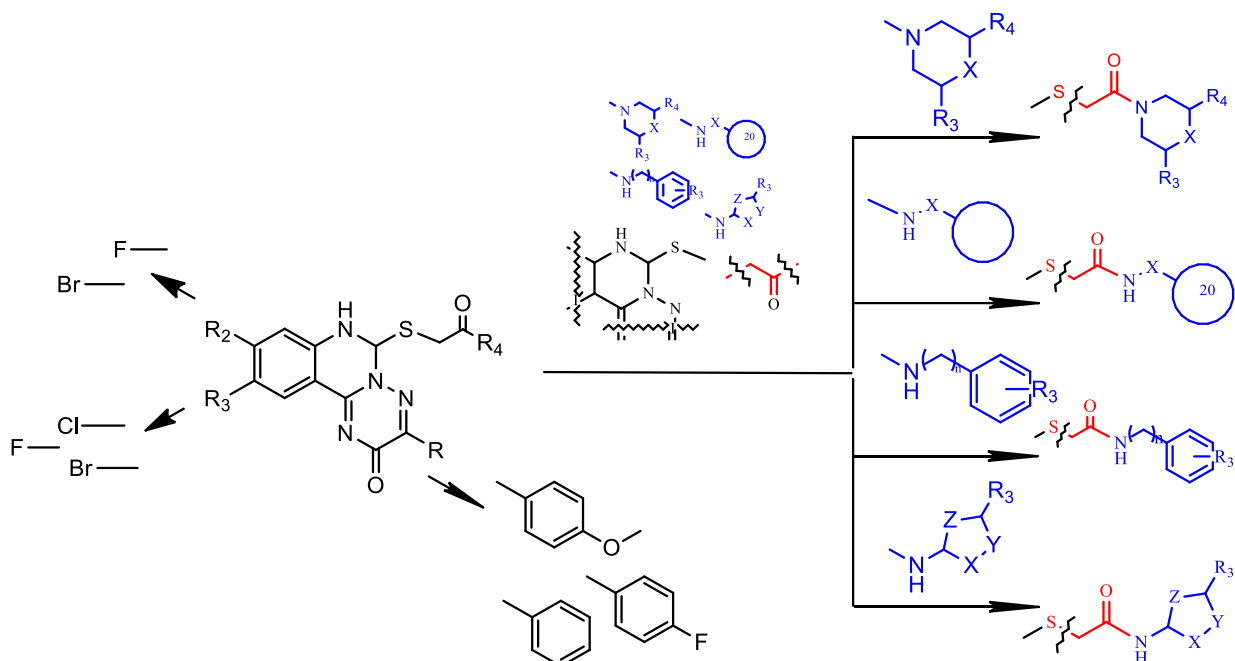


Рисунок 17 – Схема подходов к синтезу 3-R-9-R₂-10-R₃-6-тиоксо-6,7-дигидро-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-2-онов

Одним из ключевых фрагментов при конструировании новых лекарственных препаратов является карбоксильная группа, с которой связана многогранность влияния на биологическую активность веществ [62]. Указанная функциональная группа является фармакофорной, ее введение в молекулу предоставляет широкие возможности для дальнейшей коррекции фармакокинетических параметров потенциального биологически активного агента из-за получения его солей (повышение гидрофильности) или эфиров (повышение липофильности). Высокая реакционная способность карбоновых кислот и широкий выбор современных методов ее химической модификации позволяет вводить в молекулы дополнительные фармакофорные группы в составе амидного, гидразидного, эфирного или гидразонного фрагмента. Интересно взаимное влияние карбоксильной и других функциональных групп на спектральные характеристики, физико-химические и биологические свойства веществ. Было решено осуществить синтез ряда галогенсодержащих 2-[(3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио]уксусной кислот, исследовать их физико-химические свойства.

Исходные 3-R-8-R₁-9-R₂-10-R₃-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-тиолаты были синтезированы на кафедре органической и биоорганической химии Запорожского государственного медицинского университета под руководством заведующего кафедрой Коваленко Сергея Ивановича, профессора, доктора фармацевтических наук [208]. Их физико-химические свойства и реакционная способность описаны в работах [1, 67].

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 соединения NKV 42-54, 67 очищены переосаждением.

Известно, что в последнее время в медицинской и фармацевтической химии применяется комбинирование фармакофорных фрагментов в одной молекуле, что может привести к значительным изменениям в проявлении биологического действия синтезированных соединений. Комбинация данного подхода с такими современными методами, как высокоэффективный биологический скрининг, молекулярный докинг и QSAR-исследования позволяет разрабатывать эффективные направления структурной модификации, направленной на создание новых биологически активных агентов [4, 27, 72, 175]. Комбинация нескольких фармакофоров в одной молекуле предусматривает создание соответствующих «скаффолдов» и «линкерных» групп, позволяет эффективно формировать массивные комбинаторные библиотеки. Амидный фрагмент занимает особое место среди известных фармакофор вследствие его сродства к пептидной связи. Именно пептидная связь является объектом активности ряда ферментов, в частности, гидролаз, побуждает исследователей, работающих в области фармацевтической химии, проводить активный поиск потенциальных биологически активных агентов именно среди амидов [84]. Также на активизацию исследований, направленных на поиск новых потенциальных лекарственных препаратов, значительно повлиял существенный прогресс в подходах к формированию и химической модификации амидной связи [222]. Большинство методов разрабатывались для формирования

именно пептидной связи, но также они могут быть использованы для синтеза амидов любого строения. Учитывая высокую потенциальную биологическую активность амидов, а также широкий выбор синтетических инструментов для их получения, осуществлен синтез ряда 2-[(3-R-8-R₁-9-R₂-10-R₃-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)-тио]ацетамид и их N-замещенных. Тем более, что отобранные амины и их производные уже являются «фармакофорами» и непосредственно проявляют противовирусную, противотуберкулезную, противоопухолевую и антибактериальную активности [72, 85, 162, 175, 176, 257].

Синтезированные соединения (29, 32, 34, 58, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71) – желтые кристаллические вещества, растворимые в ДМФА, мало растворимые в диоксане и спиртах, практически не растворимые в воде. Для анализа очищенные кристаллизацией из смеси ДМФА-вода. 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.

Синтезированные соединения 30, 31, 33, 35, 55, 56 и 57 – желтые кристаллические вещества, растворимые в ДМФА, мало растворимые в диоксане и спиртах, практически не растворимые в воде. Для анализа очищенные кристаллизацией из смеси ДМФА-вода.

Синтезированные соединения (36, 37, 39, 40 и 60) – желтые кристаллические вещества, растворимые ДМФА, мало растворимые в диоксане и спиртах, практически не растворимые в воде. Для анализа данные вещества были очищены кристаллизацией из смеси ДМФА-вода.

Физико-химические особенности, хроматомасс-спектры, ИК-спектры и ¹Н-ЯМР-спектры синтезированных NKV и их производных, служащие доказательством их чистоты, приведены в публикациях [208, 209, 210, 211, 245].

5.2. Изучение возможности использования растворов NKV и их производных в диметилсульфоксиде (ДМСО) для биотестирования с применением биолюминесцентных тест-объектов

Оценку биологической активности NKV и их производных проводили после изучения их способности образовывать прозрачные жидкости (ПЖ) в анализируемой пробе, поскольку измерения интегрального светового потока проводятся в жидкой фазе [45, 50]. Вначале исследовали возможность порошков NKV с ДМСО образовать ПЖ согласно ОФС 1.2.10007.15 Прозрачность и степень мутности жидкостей [7]. Оценка растворимости производных при нормальных условиях ($25 \pm 0,1$ °C, $101,3 \pm 0,1$ кПа) показала следующее: 12 субстанций были растворимы в ДМСО с образованием ПЖ, 30 соединений образовывали суспензии. Для повышения растворимости образующих суспензии 30-и соединений, производили их нагрев до $60 \pm 0,1$ °C в течение 60 мин [6]. В результате истечения одного часа выдержки суспензий при $60 \pm 0,1$ °C были получены устойчивые растворы еще шести соединений. Результаты оценки растворимости производных представлены в табл. 6.

Таблица 6 – Физические свойства и растворимость NKV и их производных

Название вещества		номер NKV						
		29, 55, 57, 60, 63, 65	30, 32, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 53, 61	31, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 49, 51, 52, 54, 56, 58, 67, 69, 70	34, 40, 68, 71	46, 62	64	66
Свойства								
Окраска раствора		Прозрачный, соломенно-желтый, светло-желтым, желто-коричневый, оранжевый						
Растворимость	при $25 \pm 0,1$ °C	-	+	-	-	-	-	-
	при нагревании и до $60 \pm 0,1$ °C в течении:	15 мин	-	+	+	-	-	-
		30 мин	-	+	+	-	+	-
		45 мин	-	+	+	+	+	+
		60 мин	-	+	+	+	+	+
	при охлаждении до $25 \pm 0,1$ °C после нагревания	-	+	+	+	+	-	+

Примечание: «+» – производное образует ПЖ с ДМСО при указанных условиях, «-» – производное не образует ПЖ с ДМСО при указанных условиях.

Поскольку биотестирование с использованием природных люминесцентных тест-штаммов проводится в основном в водно-солевых растворах с концентрацией натрия хлорида 2,5 – 3 % (масса/объем), необходимые условия для поддержания оптимальной жизнедеятельности тест-штамма бактерий [75]. Дополнительно проводили оценку способности растворов NKV и их производных в ДМСО сохранять устойчивость и не давать опалесценцию при растворении в водно-солевых растворах.

В результате проведенных исследований установили, что при внесении в 1000 мкл 2,5 % водного раствора натрия хлорида 5 мкл раствора NKV 25 производных выпадали в осадок. При внесении 25 мкл растворов NKV и их производных в ДМСО в водно-солевые растворы прозрачными жидкостями остались только три раствора, а при внесении 50 мкл только растворы веществ NKV-35 и NKV-40 не помутнели. В результате для достижения наиболее сопоставимых условий с методикой тестирования на *P. leiognathi* Sh1 [50] при исследовании NKV и их производных вводили дополнительный фактор перемешивания в методологию как 15-ти минутного, так и 18-ти часового подхода к биотестированию.

5.3. Скрининг антимикробной активности направленно синтезированных NKV и их производных с использованием природного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 и рекомбинантного lux-биосенсора *E. coli* MG1655 с плазмидой Xen⁺::lux с последующей оценкой ее взаимосвязи со строением NKV и их производных

Основываясь на описанных в главах 2, 3, 4, и разделах 5.1 и 5.2 результатах, для биотестирования и оценки взаимосвязи строения и результатов биологического действия NKV и их производных, использовали следующие условия:

- Анализ NKV и их производных на наличие антимикробной активности с использованием биолюминесцентных тест-объектов проводили поэтапно согласно методике, описанной в разделе 4.4., где в качестве тест-объекта

использовали биолюминесцентный тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, а в качестве метода использовали оценку 15 минутного действия.

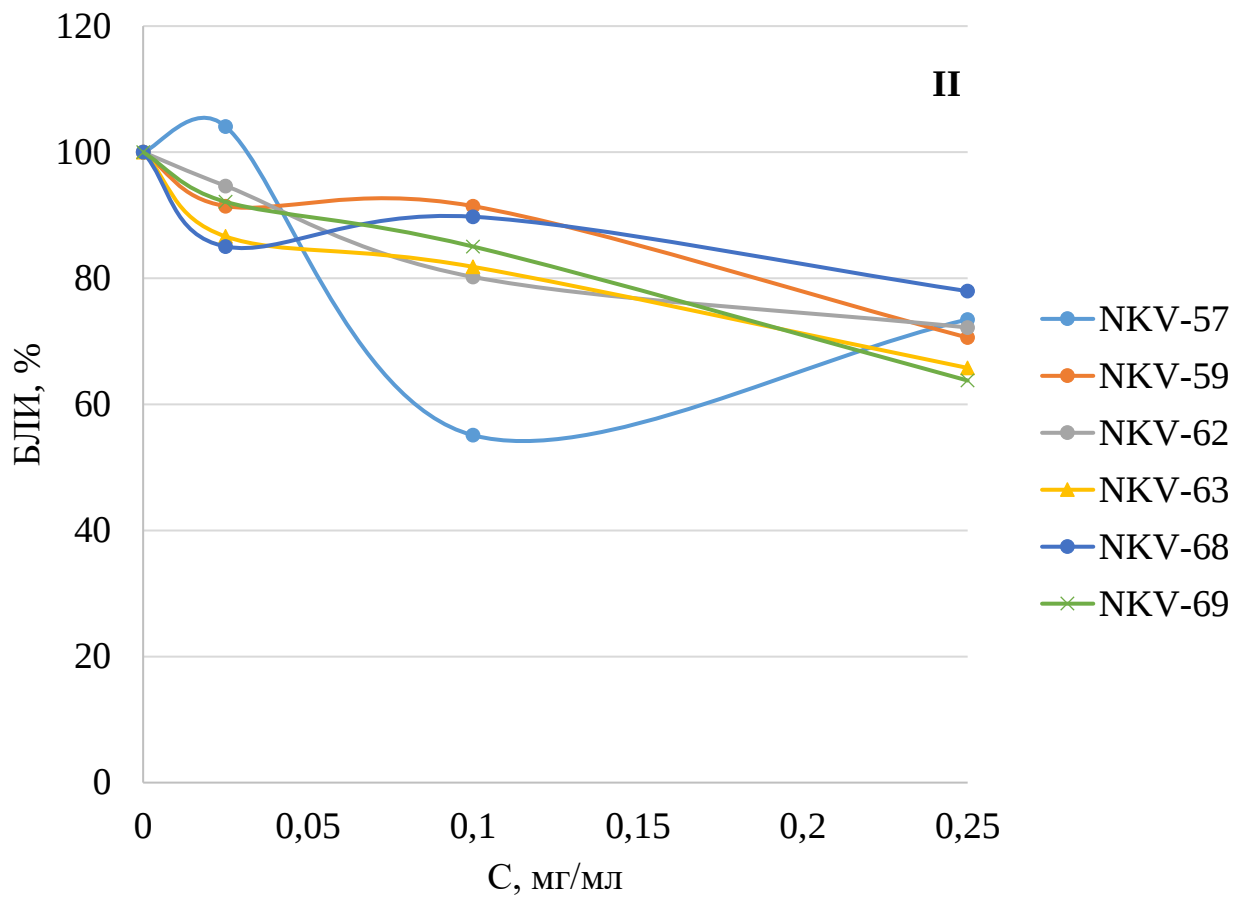
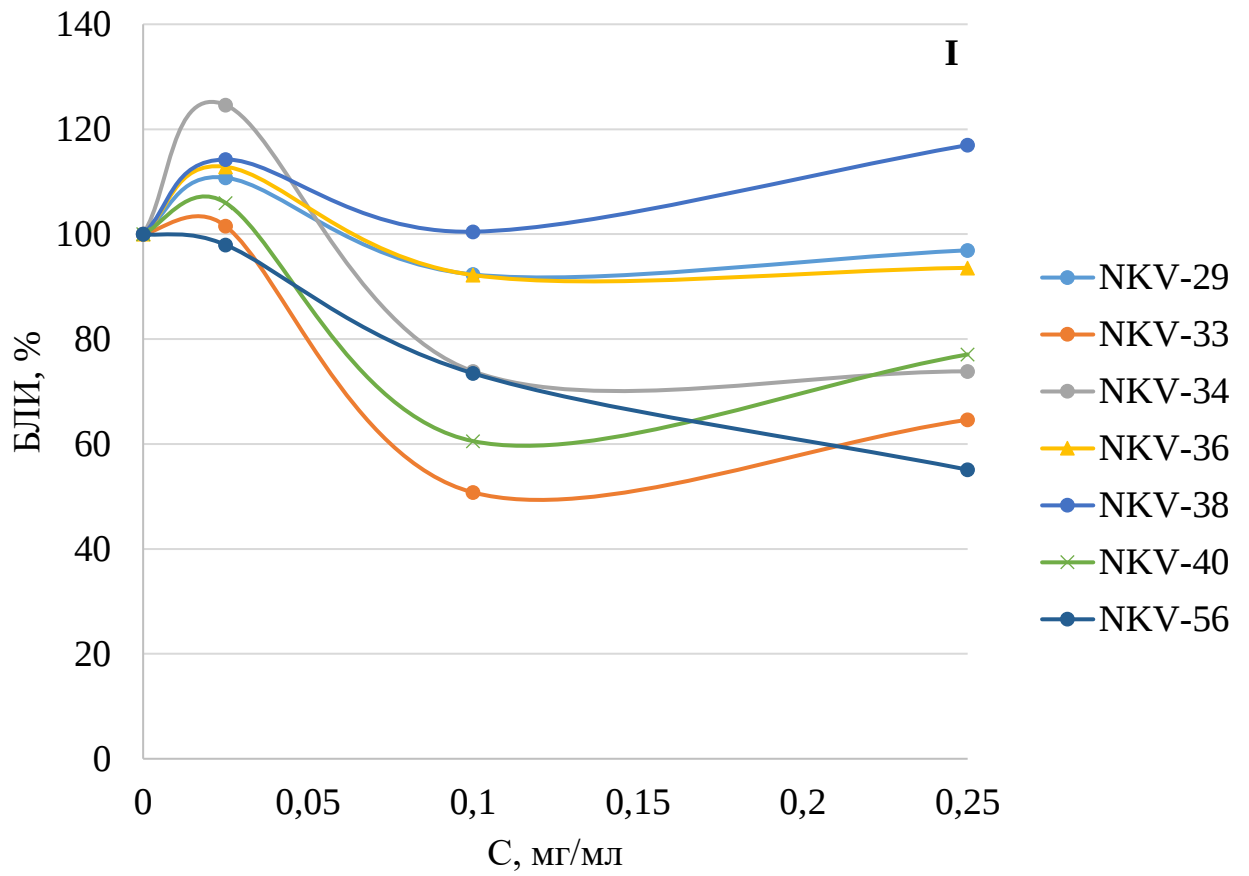
- Оценку биологической активности направленно синтезированных NKV и их производных с использованием биолюминесцентных тест-объектов на основе природного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 и рекомбинантного lux-биосенсора *E. coli* MG1655 с плазмидой Xep⁺::lux проводили согласно методикам описанных в разделах 2.2.4 и 2.2.5, соответственно;

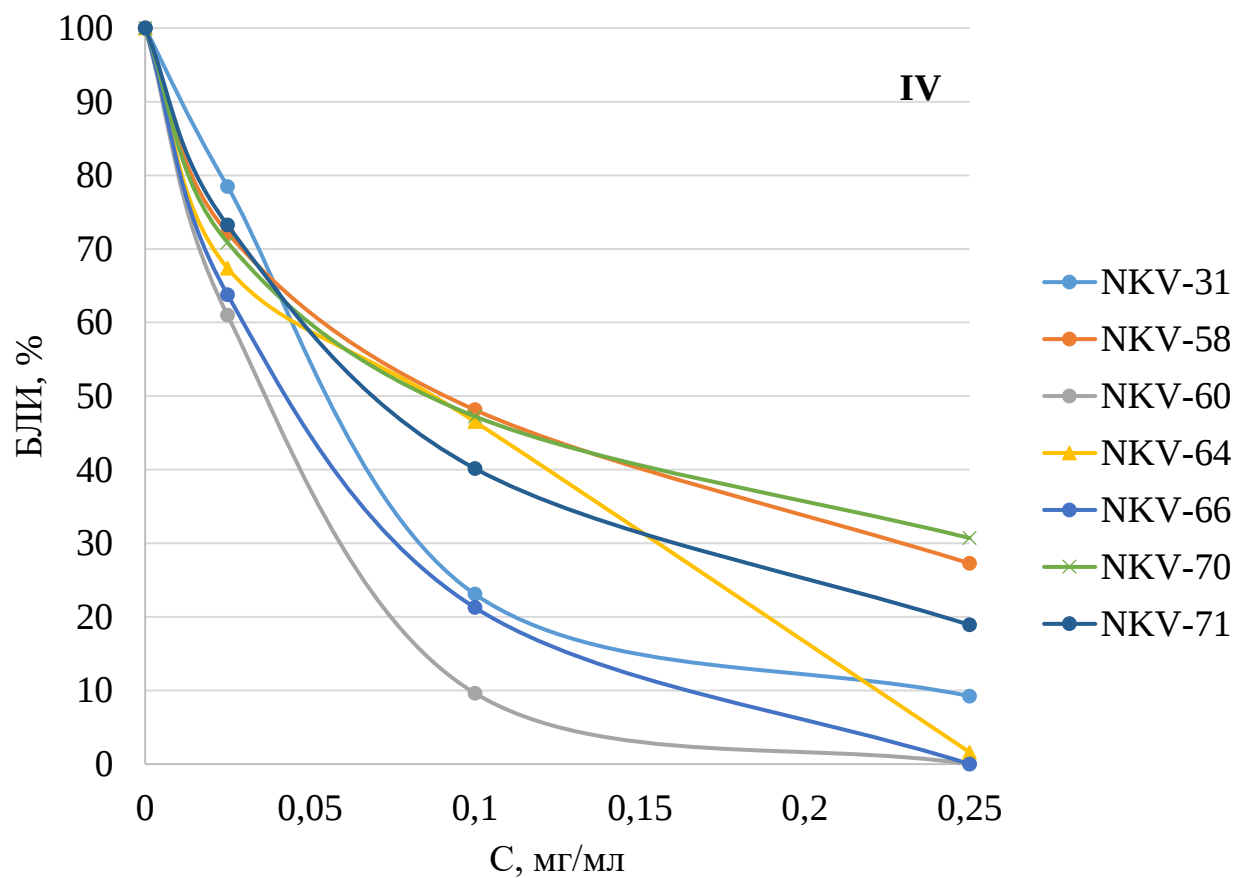
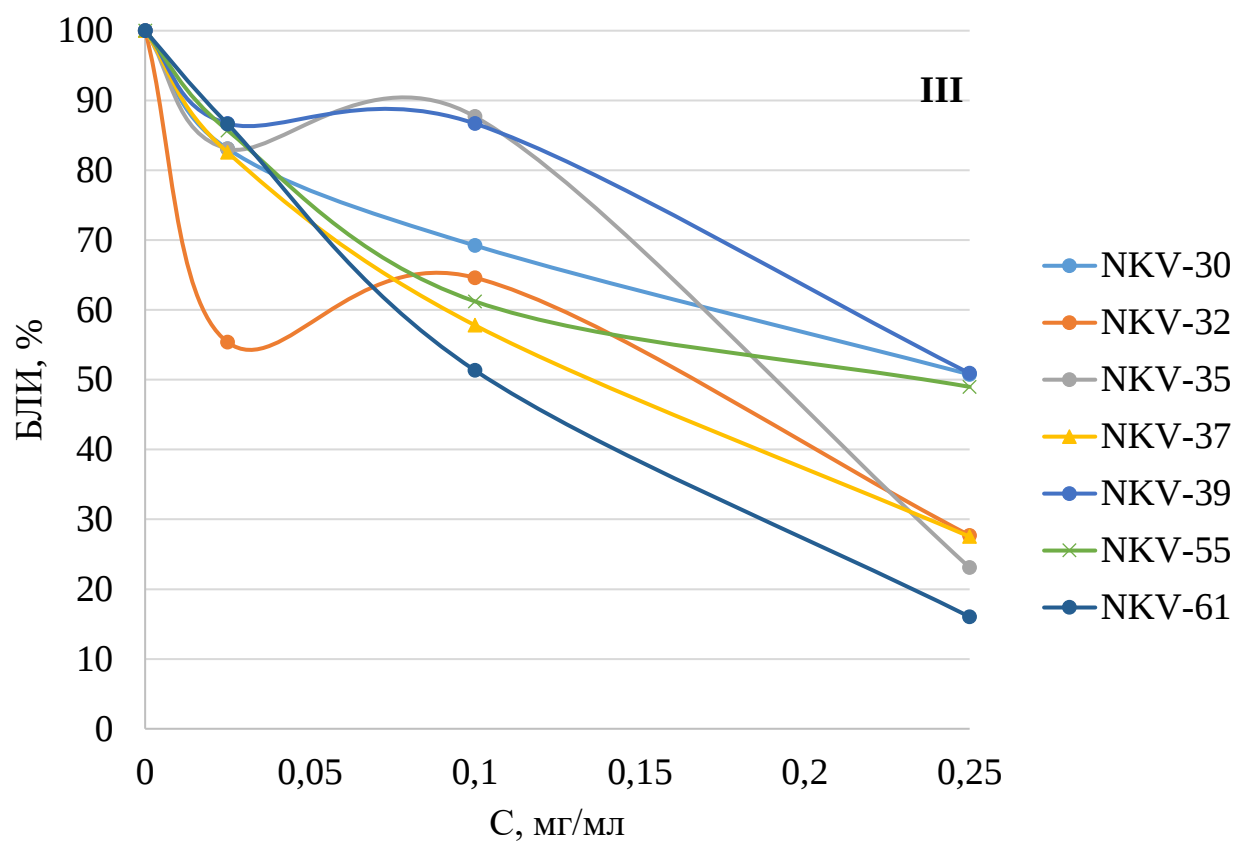
- Оценку интегрального светового потока тест-систем проводили согласно разделу 2.2.2 с учетом результатов раздела 5.2. Дополнительно все исследуемые системы содержали натрий-фосфатного буфера с $\text{pH} = 7,2 \pm 0,1$ с конечной концентрацией в пробе равной 0,1 М;

- Для оценки взаимосвязи строения и специфической активности NKV и их производных в качестве основной цепи соединения выбрали гетероцикл 6-((2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)ацетамид;

- В качестве фармакофорных групп выбрали циклические радикалы (адамантан, азапен, бицикло[2.2.1]гептан (норборан)), ароматические радикалы (анизол, трифлюоробензен) гетероциклические радикалы (1-метилпирроллидон, 3-метилпиперидин, триметилморфолин), галоген-радикалы (бром, йод, фтор, хлор,) и карбоксильную группу, которые содержали фармакофорные группы или их комбинации с циклическими, ароматическими или гетероциклическими фрагментами.

При исследовании антимикробной активности фармацевтических субстанций, описанных в разделе 4.2, NKV и их производные проявляли четыре типа воздействия на биолюминесценцию тест-штамма. Результаты скрининга антимикробной активности с использованием биолюминесцентного метода анализа с применением природного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, представлены на рисунке 18.





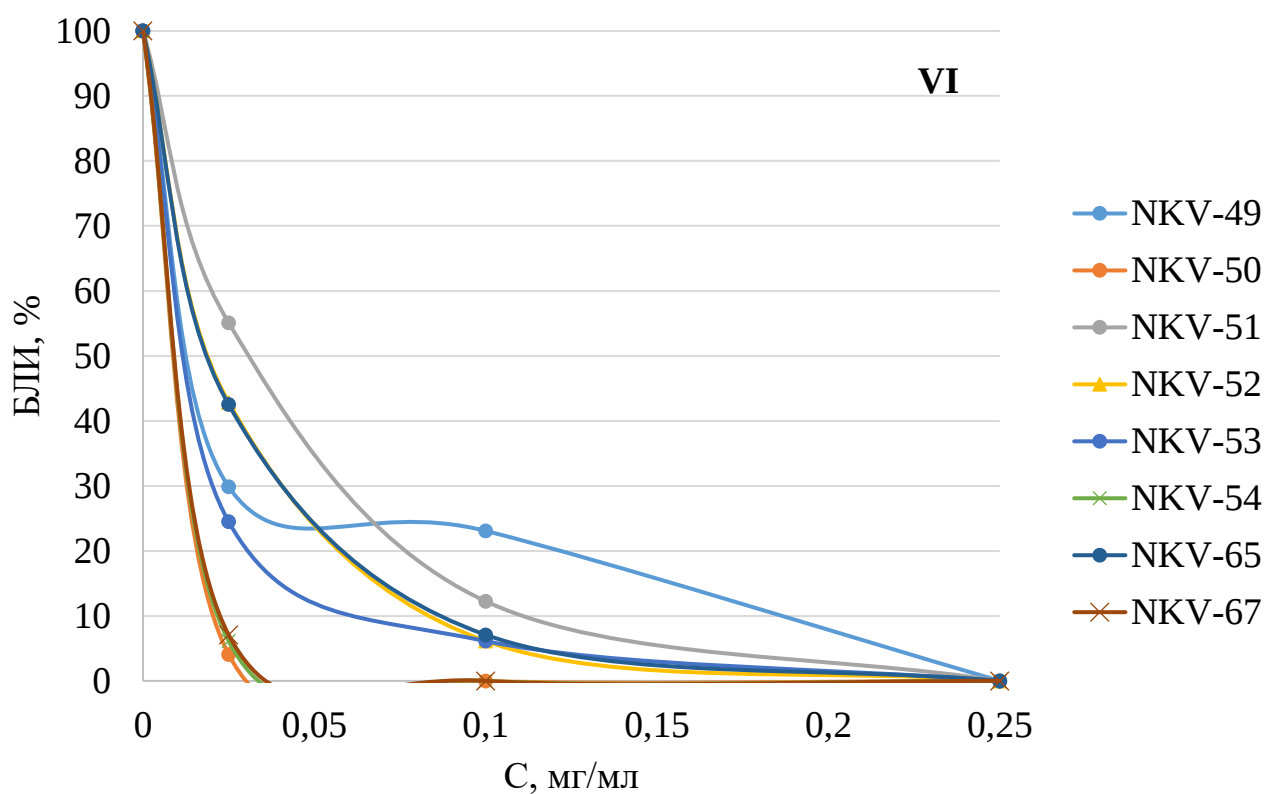
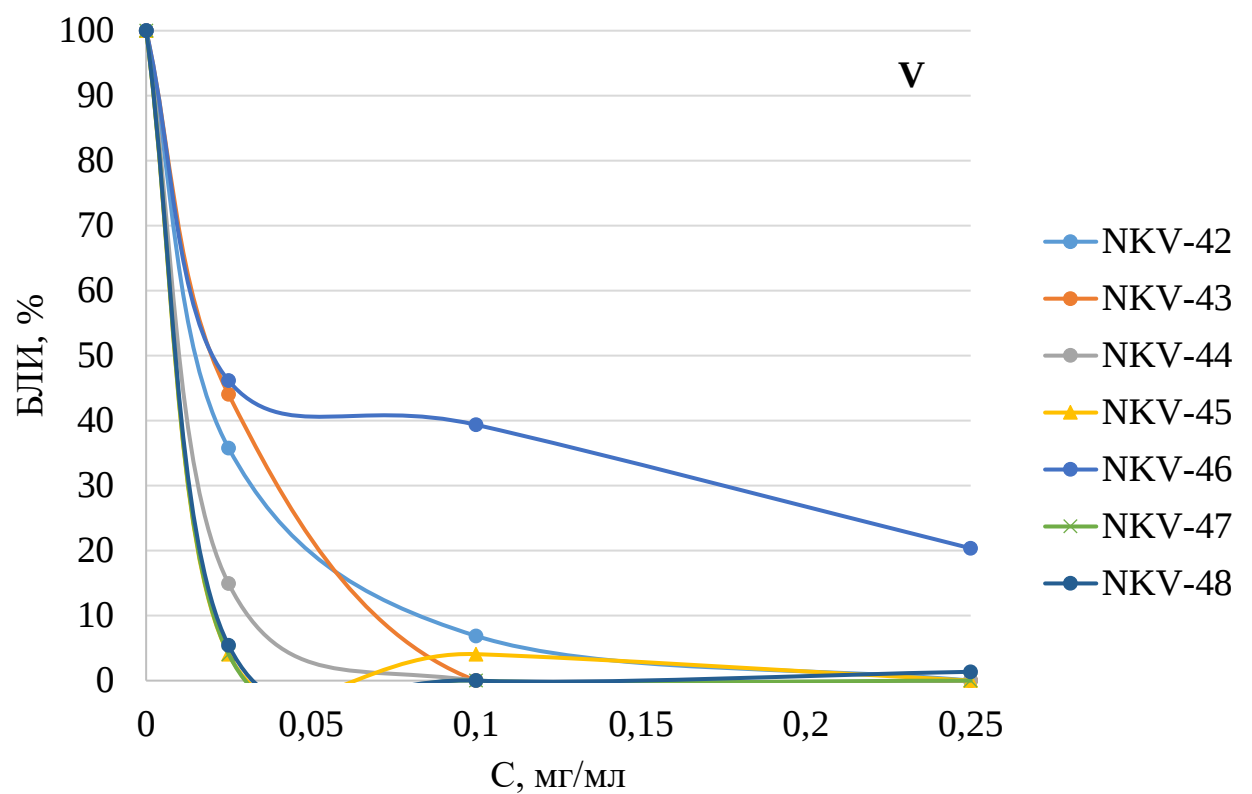


Рисунок 18 – Интенсивности люминесценции от концентрации производного NKV в пробе, где I, II – «нейтральные вещества»; III – «слабые ингибиторы»; IV – «умеренные ингибиторы»; V, VI – «сильные ингибиторы».

В первую группу «нейтральные вещества», ЭК₅₀ свыше 0,25 мг/мл, вошли представители NKV № 29, 33, 34, 36, 38, 40, 56, 57, 62, 63, 68, 69. Вторая группа, «слабые ингибиторы» (ЭК₅₀ от 0,1 мг/мл до 0,25 мг/мл), состоит из NKV № 30, 32, 35, 37, 39, 55, 61. Третья группа, «умеренные ингибиторы» (ЭК₅₀ от 0,05 мг/мл до 0,1 мг/мл), состоит из NKV № 31, 58, 60, 64, 65, 66, 70, 71. 4-я группа, «сильные ингибиторы» (ЭК₅₀ меньше 0,025 мг/мл), состоит из NKV № 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 67, смотри табл. 20. Производные NKV № 42-47, 50-54 характеризовались ЭК₅₀ меньше 0,025 мг/мл при оценке их влияния на свечение тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 через 18 часов инкубации.

По данным [8, 13, 239], как ингибирование биолюминесценции, так и ее активирование более чем на 50 %, связано с проявлением антибиотического действия. Из 42 исследуемых NKV и их производных наиболее выраженным ингибированием люминесценции тест-штамма как в 15-ти минутном тесте, так и в 18 часовом, обладали кислоты (NKV № 42-54 и 67) (табл. 7) и характеризовались наименьшими значениями ЭК₅₀, что свидетельствует о наличии у данных веществ антибиотического действия. Относительная ошибка результата среднего определения аналитического сигнала ($\bar{\varepsilon}$) не превышала 10 %.

Таблица 7 – Интенсивность БЛИ тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 при наличии в пробе различных концентраций NKV и их производных

№ NKV	Контроль	15 минутное действие, мг/мл			18 часовое действие, мг/мл		
		0,025	0,1	0,25	0,025	0,1	0,25
1	2	3	4	5	6	7	8
NKV-29	100	110,77	92,31	96,92	202,70	648,65	372,97
NKV-30	100	83,08	69,23	50,77	227,03	616,22	178,38
NKV-31	100	78,46	23,08	9,23	405,41	1200,00	567,57
NKV-32	100	55,38	64,62	27,69	14,59	1,62	1,62
NKV-33	100	101,54	50,77	64,62	3243,24	1410,81	227,03

1	2	3	4	5	6	7	8
NKV-34	100	124,62	73,85	73,85	316,22	97,30	891,89
NKV-35	100	83,08	87,69	23,08	194,59	908,11	243,24
NKV-36	100	112,84	92,20	93,58	118,81	522,77	172,28
NKV-37	100	82,57	57,80	27,52	294,06	11,88	0,00
NKV-38	100	114,22	100,46	116,97	103,96	594,06	127,72
NKV-39	100	86,70	86,70	50,92	169,31	816,83	50,50
NKV-40	100	105,96	60,55	77,06	106,93	742,57	683,17
NKV-42	100	35,78	6,88	0,00	17,82	0,00	0,00
NKV-43	100	44,04	0,00	0,00	5,94	0,00	0,00
NKV-44	100	14,93	0,00	0,00	5,17	3,10	0,00
NKV-45	100	4,07	4,07	0,00	10,34	0,00	0,00
NKV-46	100	46,15	39,37	20,36	17,24	41,38	13,45
NKV-47	100	4,07	0,00	0,00	68,97	0,43	0,00
NKV-48	100	5,43	0,00	1,36	124,14	0,00	0,00
NKV-49	100	29,86	23,08	0,00	163,79	0,17	0,00
NKV-50	100	4,07	0,00	0,00	7,67	0,26	0,00
NKV-51	100	55,10	12,24	0,00	45,69	0,06	0,00
NKV-52	100	42,86	6,12	0,00	7,33	5,56	6,72
NKV-53	100	24,49	6,12	0,00	0,00	0,00	0,00
NKV-54	100	6,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NKV-55	100	85,71	61,22	48,98	0,32	0,00	0,00
NKV-56	100	97,96	73,47	55,10	225,00	258,62	103,45
NKV-57	100	104,08	55,10	73,47	152,59	510,78	349,14
NKV-58	100	72,19	48,13	27,27	126,58	158,23	39,24
NKV-59	100	91,44	91,44	70,59	82,28	158,23	25,95
NKV-60	100	60,96	9,63	0,00	83,54	5,00	0,25
NKV-61	100	86,63	51,34	16,04	120,25	101,27	61,39

1	2	3	4	5	6	7	8
NKV-62	100	94,65	80,21	72,19	164,56	139,24	36,71
NKV-63	100	86,63	81,82	65,78	115,19	155,06	18,35
NKV-64	100	67,38	46,52	1,60	142,41	87,34	3,16
NKV-65	100	42,52	7,09	0,00	1664,52	241,94	454,84
NKV-66	100	63,78	21,26	0,00	483,87	687,10	735,48
NKV-67	100	7,09	0,00	0,00	193,55	5,81	0,00
NKV-68	100	85,04	89,76	77,95	319,35	667,74	193,55
NKV-69	100	92,13	85,04	63,78	377,42	1490,32	203,23
NKV-70	100	70,87	47,24	30,71	416,13	174,19	106,45
NKV-71	100	73,23	40,16	18,90	396,77	1741,94	522,58

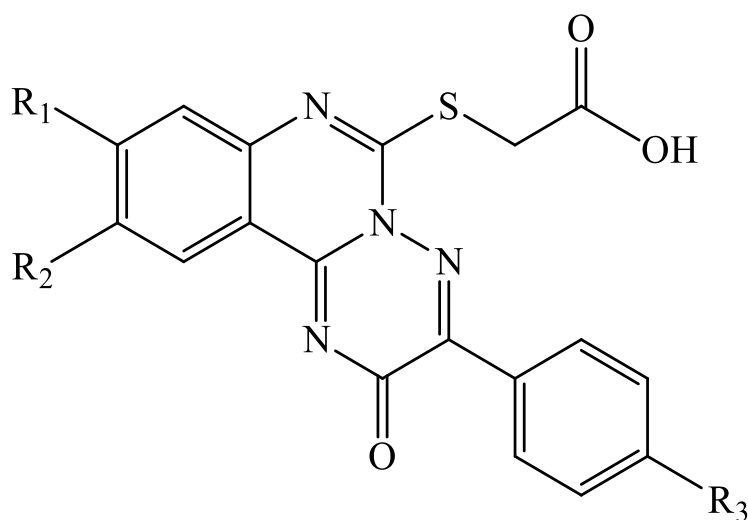
Введение в положение 3 4-флуорофенильного заместителя значительно усиливает билюминесценцию в 18-ти часовом тесте в концентрации 0,025 мг/мл, что выражалось в снижении БЛИ на 100 % в концентрациях свыше 0,1 мг/мл для NKV № 48, 49 и 67 (табл. 7). Важно отметить, что соединения NKV № 42-47 и 50-54 подавляют билюминесценцию во всем исследованном диапазоне концентрации от 0,025 мг/мл до 0,25 мг/мл.

Оценка взаимосвязи строения и результатов изучения биологического действия направленно синтезированных NKV и их производных на *P. leiognathi* Sh1 выявила ряд взаимосвязей, сопоставимых с ранее выявленными у ФС в разделе 4.3, влияющих на силу ингибирующего эффекта свечения соединения в отношении тест-штамма *P. leiognathi* Sh1. Увеличение антимикробного действия 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. Сила ингибирования свечения производного NKV, содержащего в своей структуре два атома фтора, меньше, чем аналогичный эффект, оказываемый NKV, содержащим один атом хлора. Замещение атома водорода на галоген в 9 положении относительно основной гетероциклической

цепи 6-((2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)уксусной кислоты характеризуется более сильным снижением люминесценции, чем в 10. Удлинение углеродной цепи в радикалах на одну метильную или метокси группу приводит к снижению воздействия NKV. Определили, что производные 6-((2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)уксусной кислоты являются более сильными ингибиторами бактериальной люминесценции, чем тиацетамиды 1,2,4-триазино[2,3-с]хиназолина. Среди 6-((2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)ацетамидов сила такого воздействия увеличивается, если в ацетамидном участке производили замещение водорода на фармакофорные группы или их комбинации с циклическими, ароматическими или гетероциклическими фрагментами. Проводя параллель между результатами анализа биологической активности ФС и их строения с данными, полученными после оценки взаимосвязи строения и биологического действия направленно синтезированных NKV и их производных, можно заключить, что наличие фармакофорных групп приводит к более выраженному снижению БЛИ. Установлено, что наиболее сильным антибиотическим действием обладают вещества, у которых фармакофорные группы подобны известным антибактериальным субстанциям. По результатам проведенных исследований определен общий вид структуры среди тестируемых NKV и их производных с наиболее выраженной способностью к ингибированию люминесценции штамма *P. leiognathi* Sh1 – 2-((9- R_1 -10- R_2 -3-(4- R_3 -фенил)-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)уксусные кислоты, структурная формула которых представлена на рисунке 19. Независимо от заместителей R_1 , R_2 , R_3 сила антибиотического действия составила $80 \pm 10 \%$ от контрольных значений люминесценции штамма *P. leiognathi* Sh1 для NKV и их производных.

Основываясь на результатах собственных исследований по оценке антибиотических эффектов производных 2-((9- R_1 -10- R_2 -3-(4- R_3 -фенил)-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)уксусные кислоты (раздел 5.3), приходим к выводу, что возникает необходимость как в подтверждении антимикробных свойств изучаемых направленно синтезированных субстанций, так

и в оценке механизмов антибактериальной активности в случае ее подтверждения *invitro*.



Радикал	R ₁	R ₂	R ₃
Код производного			
NKV-42	H	Br	CH ₃ -O-
NKV-43	F	H	CH ₃ -O-
NKV-44	F	H	F
NKV-45	F	H	H
NKV-46	H	Cl	CH ₃ -O-
NKV-47	H	I	CH ₃ -O-
NKV-48	H	I	F
NKV-49	H	Cl	F
NKV-50	H	Cl	CH ₃ -
NKV-51	H	Cl	H
NKV-52	H	Br	F
NKV-53	H	Br	H
NKV-54	Br	H	F
NKV-67	H	H	F

Рисунок 19 – 2-((9-R₁-10-R₂-3-(4-R₃-фенил)-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)уксусные кислоты.

Одним из подходов для оценки антибиотических свойств веществ являются рекомбинантные lux-биосенсоры на основе *E. coli*, способные также выявлять механизмы антибактериальной активности [9, 11, 21]. Поэтому на следующем этапе работы нами предпринята попытка подтвердить наличие антибактериальной активности и определить ее механизмы у 14 производных 2-((9-R₁-10-R₂-3-(4-R₃-фенил)-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)уксусной кислоты, представленных на рисунке 19, с использованием рекомбинантных lux-биосенсоров *E. coli* MG1655.

На следующем этапе работы оценивали влияние ДМСО как оптимального растворителя для производных 2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)уксусной кислоты на lux-биосенсоры, рисунок 20 [15, 42].

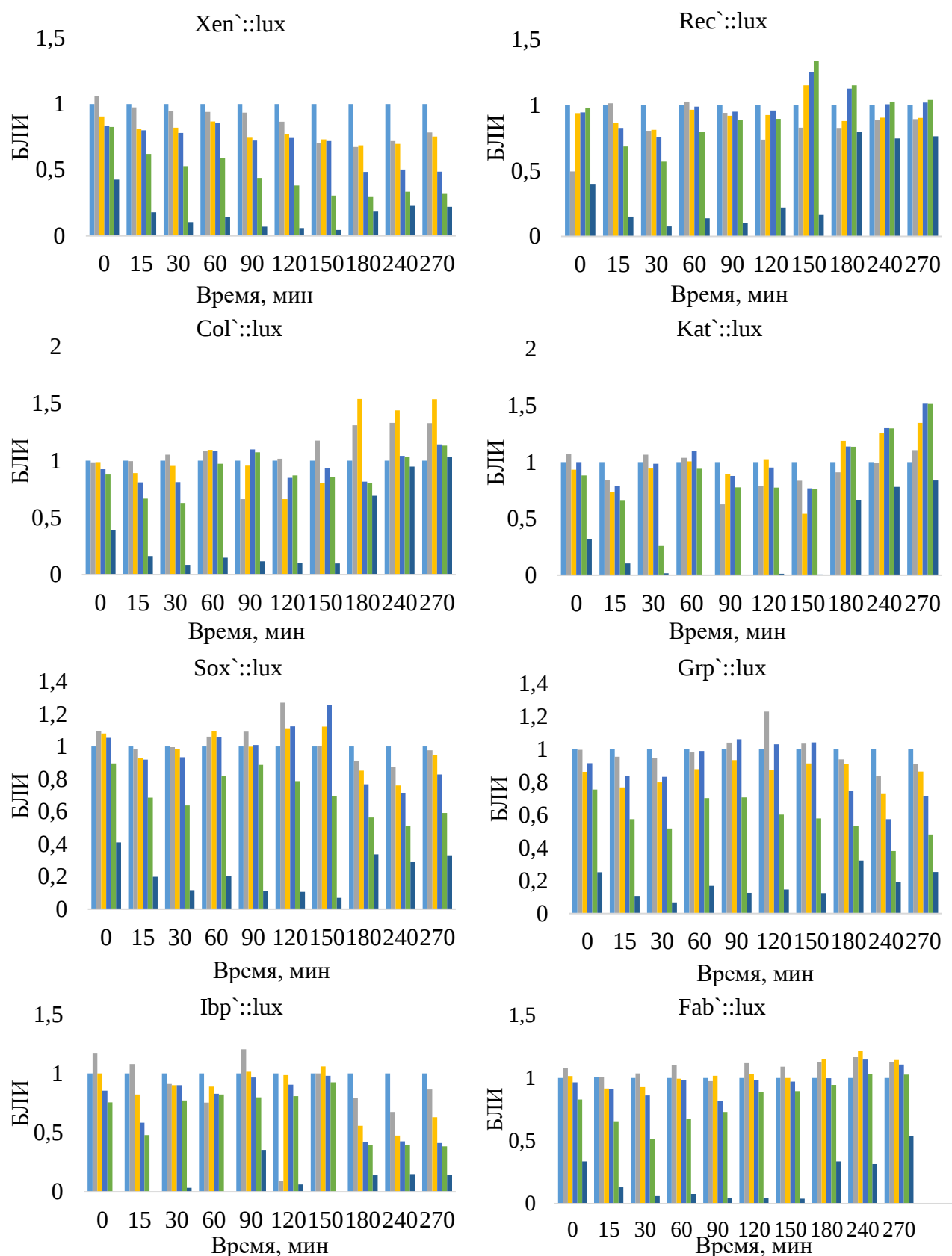
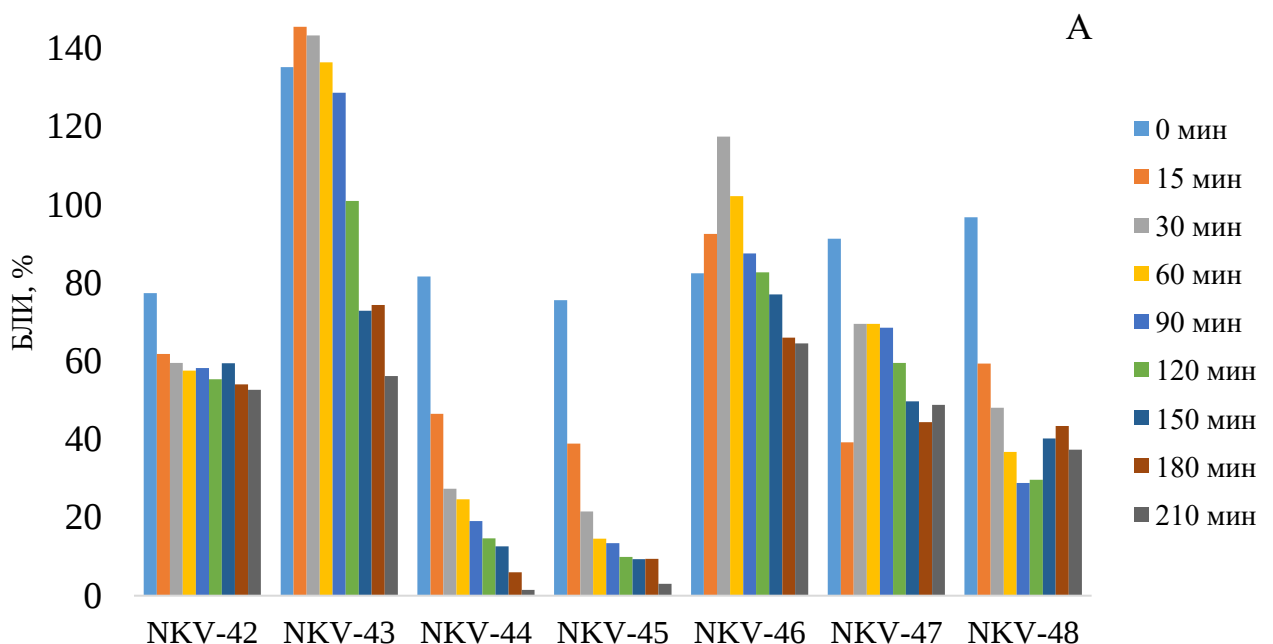


Рисунок 20 – Влияние различных концентрации ДМСО на батарею lux-биосенсоров в зависимости от времени инкубации, где ■ - 0 мг/мл, ■ - 2 мг/мл, ■ - 5 мг/мл, ■ - 10 мг/мл, ■ - 20 мг/мл, ■ - 30 мг/мл контрольного образца ИПТ для каждого штамма соответственно.

По полученным данным установлено, что при концентрации ДМСО от 2 до 10 мг/мл в пробе не происходит значительного изменения БЛИ lux-биосенсоров. В то же время при концентрациях свыше 10 мг/мл для всех тест-объектов происходило снижение БЛИ на 10 - 100 % от контрольных значений. Такие результаты собственных исследований совпадают с данными полученными А. М. Кацевым и соавторами, 2011 по оценке влияния ДМСО на *P. leiognathi* Sh1 [15]. Таким образом, было решено использовать конечную концентрацию ДМСО, не превышающую 10 мг/мл.

На следующем этапе работы оценивали влияния 14 растворов NKV и их производных на генно-инженерный штамм *E. coli* (Xen`::lux), поскольку данные вещества характеризовались наибольшим снижением БЛИ при наименьших значениях ЭК₅₀ при анализе с использованием тест-штамма *P. leiognathi* Sh1. Данную оценку проводили для подтверждения ранее полученных результатов оценки антибиотических свойств NKV № 42-54 и 67 с использованием *P. leiognathi* Sh1.

Результаты проведенных исследований по оценке влияния 14 растворов NKV и их производных на генно-инженерный штамм *E. coli* (Xen`::lux). представлены на рисунке 21А, 21В.



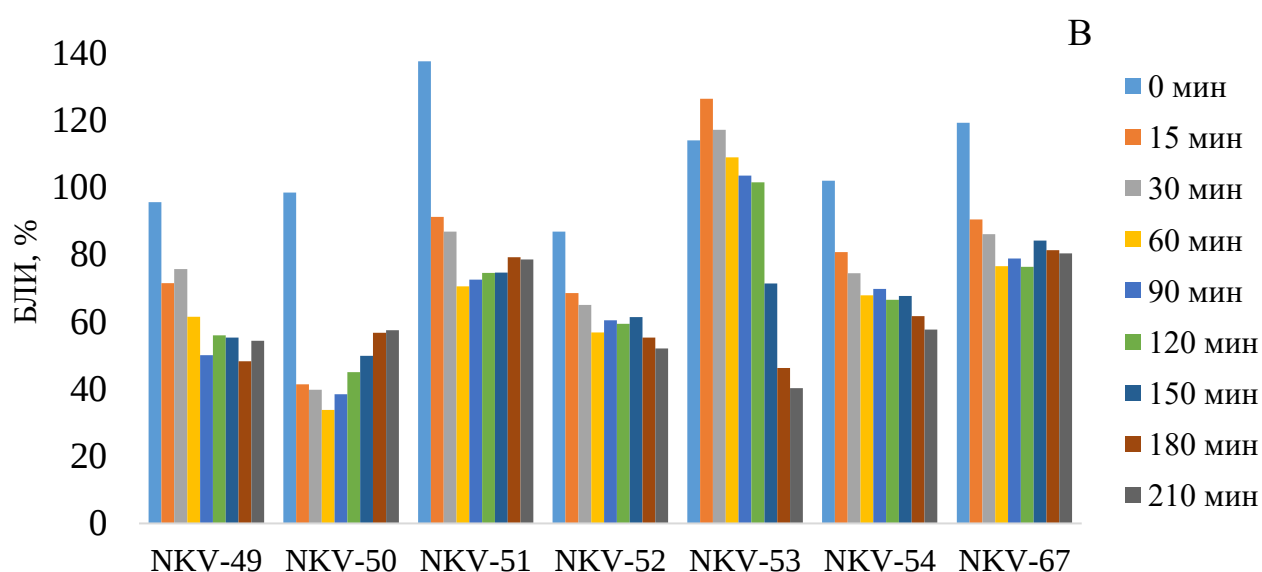


Рисунок 21 – Влияние растворов NKV на рекомбинантный штамм *E. coli* MG1655 (Xen⁺::lux), где А – влияние производных NKV № 42-48 на свечение генно-инженерного штамма *E. coli* (Xen⁺::lux), В – влияние производных NKV № 49-54 и 67 на свечение генно-инженерного штамма *E. coli* (Xen⁺::lux).

В ходе оценки влияния 14 производных NKV на рекомбинантный штамм *E. coli* MG1655 с плазмидой Xen⁺::lux установили, что все они снижают свечение использованного тест-объекта от 20 до 98 %, что подтверждает ранее полученные результаты по исследованию влияния указанных производных на биoluminesценцию природного штамма *P. leiognathi* Sh1. Однако установили, что только NKV-44 и 45 снижали БЛИ у рекомбинантного штамма *E. coli* MG1655 (Xen⁺::lux) на сходную величину как и у природного штамма *P. leiognathi* Sh1 при 15 минутном тесте. Также при сравнении величины снижения БЛИ тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 при контакте с растворами NKV № 42, 43, 46-54 и 67 в 15-ти минутном тесте при концентрации 0,025 мг/мл со значениями изменения БЛИ у *E. coli* MG1655 (Xen⁺::lux) для тех же производных в той же концентрации при 210-ти минутной инкубации установили, что величина БЛИ у тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 от 1,2 до 10,8 раз ниже, чем у рекомбинантного штамма *E. coli* MG1655 (Xen⁺::lux) (табл. 8). Такие значения свидетельствуют о большей

чувствительности тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 к данным NKV и их производным, а также подтверждают более высокую чувствительность природных светящихся бактерий к исследуемым веществам [262].

Таблица 8 – Значения ЭК₅₀ для тест-штаммов при взаимодействии с NKV

№ NKV	ЭК ₅₀ , мкг/мл	
	<i>P. leiognathi</i> Sh1	<i>E. coli</i> MG1655 (Xen ⁺ ::lux)
1	2	3
42	15,70 ± 3,94	211,24 ± 23,23
43	20,01 ± 4,84	179,08 ± 19,71
44	10,91 ± 1,64	101,55 ± 11,16
45	9,45 ± 0,45	103,14 ± 11,34
46	20,21 ± 5,08	281,69 ± 30,99
47	9,47 ± 0,45	164,58 ± 18,11
48	9,66 ± 0,59	140,45 ± 15,45
49	13,51 ± 3,29	193,42 ± 21,28
50	9,45 ± 0,45	151,15 ± 16,63
51	31,32 ± 6,06	339,67 ± 37,36
52	29,12 ± 4,71	208,68 ± 22,95
53	12,56 ± 2,69	167,56 ± 18,43
54	9,73 ± 0,67	236,41 ± 26,01
67	9,85 ± 0,78	423,37 ± 46,57

Минимальное снижение люминесценции на 24 % вызывало производное NKV-67 (рисунок 21В). Снижение люминесценции, не превышающее 50 % от контрольных значений, происходило под действием производных NKV-42, 43, 46, 49, 51, 52 и 54 (рисунок 21А и В). В то же время производные NKV-47, 48, 50 и 53 ингибировали люминесценцию рекомбинантного штамма *E. coli* MG1655 (Xen⁺::lux) не более, чем на 80 % через 2,5 часа инкубации (рисунок 21А и В). И только два производных, NKV-44 и NKV-45, за тот же промежуток времени снизили естественный уровень светимости бактерий на 98,48 % и 96,96 % соответственно, рисунок 21А. Основываясь на результатах глав 3, 4 и раздела 5.3 можно предположить, что NKV № 42-54 и 67 обладают антимикробным действием в отношении грамотрицательных бактерий.

5.4. Сравнение результатов оценки антимикробной активности направленно синтезированных NKV и их производных с использованием биолюминесцентных тест-объектов со стандартными эталонными штаммами бактерий

На основании проведенных исследований для оценки антимикробной активности направленно синтезированных NKV и их производных с использованием эталонных тест-штаммов бактерий были отобраны шесть производных NKV, такие как 44, 45, 47, 51, 52, 67. Поскольку с точки зрения проявленной антибактериальной активности в отношении тест-объектов NKV № 44, 45, 47, 51, 52 являются сильными ингибиторами люминесценции штамма *P. leiognathi* Sh1 с ЭК₅₀ менее 0,025 мг/мл как в 15-ти минутном, так и в 18-ти часовом тесте, а NKV-67 характеризовалось такими значениями ЭК₅₀ только для 15 минутного теста (см. раздел 5.3). В отношении рекомбинантного штамма *E. coli* MG1655 (Xen⁺::lux) NKV-44 и 45 выражено снижали свечение тест-объекта. Производное NKV-47 ингибировало люминесценцию lux-биосенсора с плазмидой pXen7-lux не более, чем на 80 %. Снижение люминесценции данного тест-объекта, не превышающее 50 % от контрольных значений, характеризовало производные NKV-51, 52. Минимальное снижение люминесценции на 24 % показало производное NKV-67 (см. раздел 5.3.).

С точки зрения влияния производных NKV на остальные lux-биосенсоры производные NKV-44 и 45 оказывали влияние *E. coli* MG1655 (Rec⁺::lux и Col⁺::lux). Также четыре производных NKV (44, 45, 51, 52) характеризовались проявлением окислительного стресса, из которых NKV-44 и 45 влияли на *E. coli* MG1655 (Sox⁺::lux), а NKV-51 и 52 на *E. coli* MG1655 (Kat⁺::lux). Повреждающим действием на белки характеризовались NKV-47 и 51. А производное NKV-67 не оказывало влияние на использованные lux-биосенсоры

В строении NKV-44, 45 содержат атом галогена в девятом положении главной гетероциклической цепи и отличаются наличием атома галогена в четвертом положении фенильного радикала. Два производных (NKV-51 и 52) содержат атом галогена в десятом положении главной гетероциклической цепи и

также отличаются наличием атома фтора в четвёртом положении фенильного радикала. Производное NKV-47 содержит в себе наиболее электроотрицательные атом галогена в комбинации с метокси группой в пара-положении фенильного радикала и NKV-67, не содержащее ни в девятом и десятом положении атомов галогенов в комбинации с атомами фтора в четвёртом положении фенильного радикала.

По результатам оценки антибактериальной и противогрибковой активности шести производных NKV установили, что NKV-47 и 52 эффективно ингибируют (МИК, мкг/мл) и подавляют (МБК, мкг/мл) рост штамма *St. aureus* (таблица 9).

Производные NKV-44, 45, 47, 51 эффективно ингибируют (МИК, мкг/мл) рост штамма *C. albicans*. Производное NKV-67 также обладало противомикробной активностью в отношении эталонных тест штаммов, но при более высоких концентрациях. Данные проведенных исследований представлены в табл. 9. Также следует отметить, что исследованные производные мало эффективны против стандартных эталонных штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa*.

Проводя оценку взаимосвязи строения NKV-44, 45, 47, 51, 52, 67 с данными об их антибактериальной и противогрибковой активностях в отношении стандартных эталонных штаммов бактерий установили, что производные NKV, содержащие атом галогена в девятом положении, преимущественно действуют на штамм *C. albicans*, таким образом проявляя антимикробную активность. Вещества, содержащие атом галогена в десятом положении, оказывают влияние на *St. aureus*.

Также наличие в структуре NKV-47 наиболее отрицательного атома галогена – йода и метокси группы в пара-положении фенильного радикала приводит к выраженным антибактериальным и противогрибковым эффектами при более низких концентрациях, а наличие «критических фармакоформных» заместителей и в данном случае способствует высокой антибактериальной активности у исследованных соединений.

Таблица 9 – Антибактериальная и противогрибковая активность 2-[(3-R-8-R₁-9-R₂-10-R₃-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио]уксусных кислот

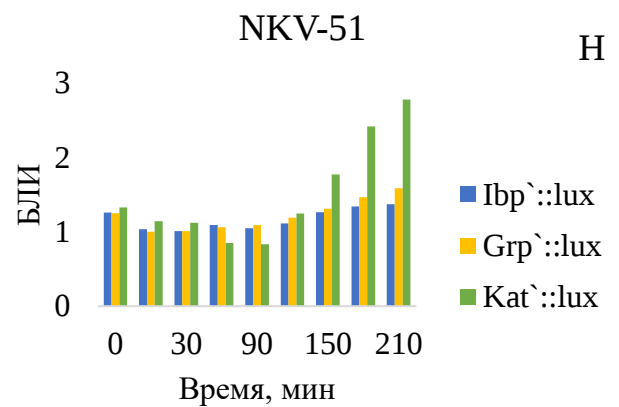
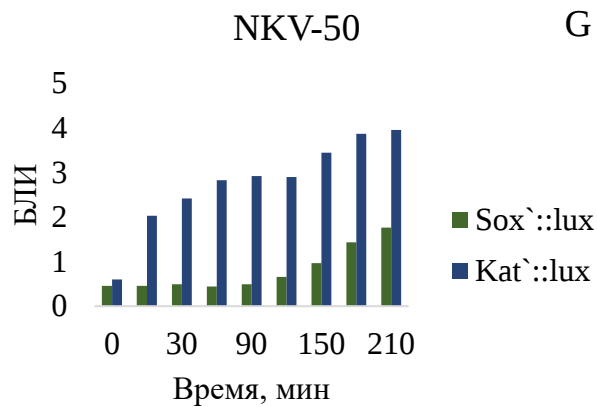
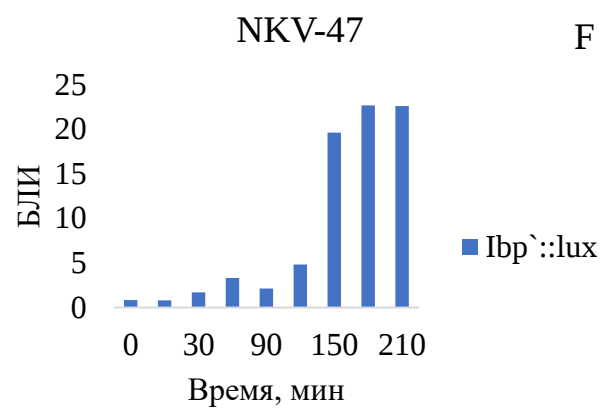
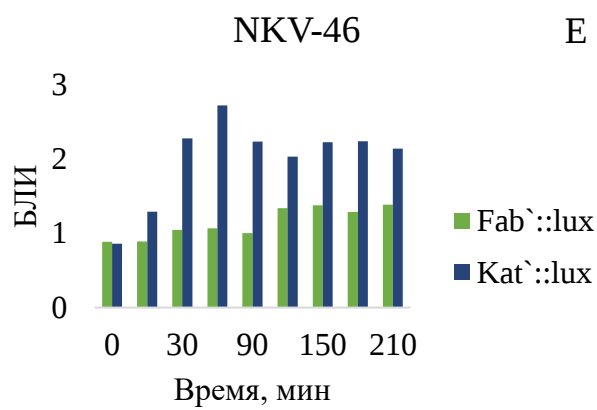
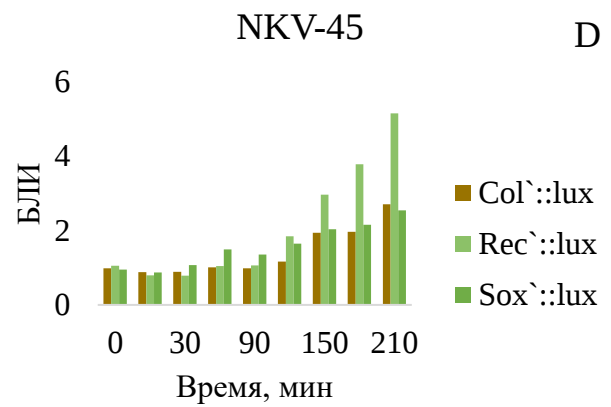
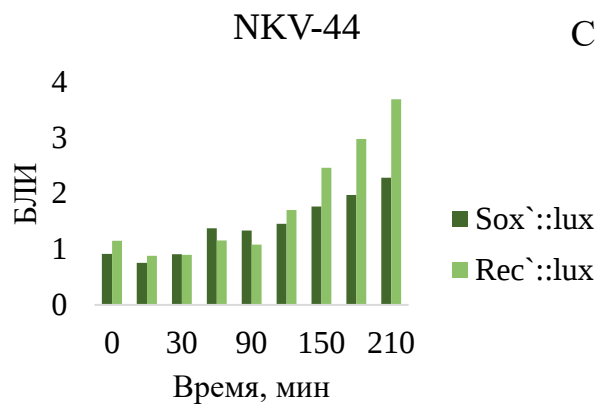
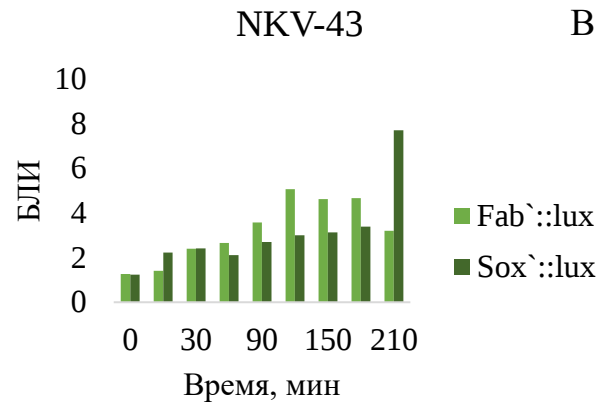
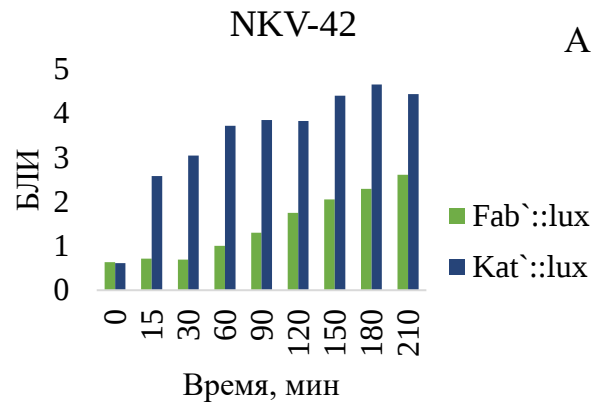
№ NKV	<i>P. leiognathi</i> Sh1	<i>E. coli</i> MG1655 (Хен`::lux)	<i>E. coli</i>		<i>St. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	
	ЭК ₅₀ , мкг/мл	ЭК ₅₀ , мкг/мл	МИК, мкг/мл	МБК, мкг/мл	МИК, мкг/мл	МБК, мкг/мл	МИК, мкг/мл	МБК, мкг/мл	МИК, мкг/мл	МФК, мкг/мл
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
44	10,91 ± 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

5.5. Изучение антимикробной активности направленно синтезированных NKV и их производных с использованием рекомбинантных lux-биосенсоров

В настоящее время разрабатываются различные биOLUMИнесцентные тесты на основе рекомбинантных штаммов бактерий (lux-биосенсоры), в которых в качестве репортеров используются гены бактериальных люцифераз [221]. Они обладают такими преимуществами, как широкий диапазон рабочих температур, стабильность свечения, возможность анализа растворов близких по концентрации натрия хлорида к физиологическим [182].

Благодаря универсальности данной аналитической методики исследования с использованием lux-биосенсоров имеют междисциплинарный характер и нашли отражение в ряде работ в области медицины, экологии, биологии, химии и физики. В настоящее время подобные биосенсоры находят широкое применение при исследовании механизмов действия на клетку различных веществ, таких как органические загрязнители, тяжелые металлы, пестициды антибиотики [9, 11, 19, 133, 134]. Такие уникальные особенности рекомбинантных люминесцентных штаммов бактерий, как высокая чувствительность и способность к прогнозированию механизмов биологических эффектов, оправдывают интерес к их использованию при изучении и разработке лекарственных средств [91, 221].

На следующем этапе работы провели оценку влияния производных NKV на остальные lux-биосенсоры для получения данных о механизмах выявленных биологических эффектов, в частности, антибактериальном действии. При исследовании установили, что действие производных NKV на lux-биосенсоры характеризовались различными значениями индукции люминесценции и действовали на разные тест-объекты (рисунок 22).



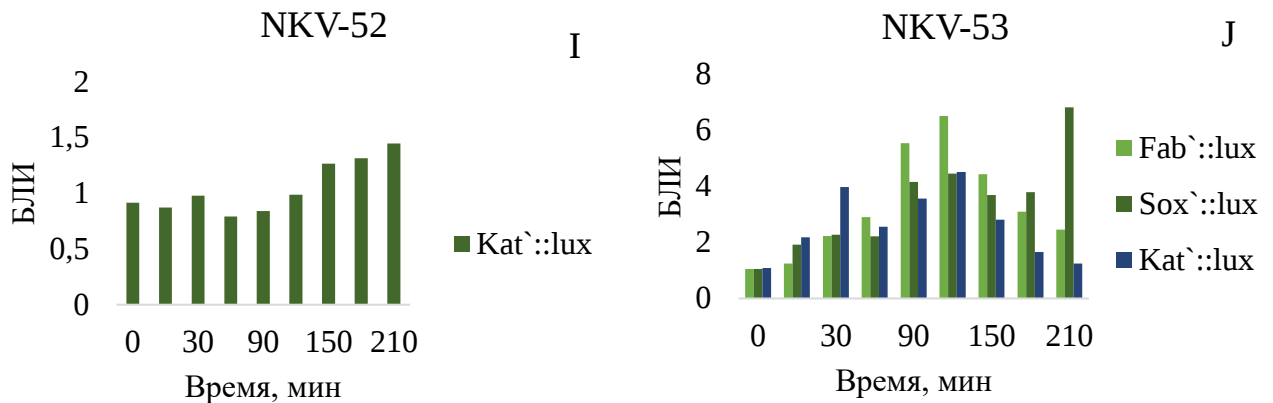


Рисунок 22 – Влияние растворов NKV на lux-биосенсоры, где, А, В, С, D, Е, F, G, Н, I, J – выявленное увеличение БЛИ у генно-инженерных штаммов *E. coli* с указанными плазмидами при взаимодействии с растворами производных NKV.

Четыре производные NKV-48, 49, 54 и 67 не оказывали значительного влияния на lux-биосенсоры с индуцибельным типом люминесценции. БЛИ = 3,69 и 5,15 наблюдали через 210 минут у штамма *E. coli* MG1655 (Rec`::lux) при наличии в пробе вещества NKV-44 и 45 соответственно, рисунки 22 С и 22 D. Производное NKV-45 вызывало выраженное повышение свечения у *E. coli* MG1655 с плазмидой Col`::lux на 2,71 через 210 минут, рисунок 22 D. Максимальный БЛИ равный 7,71, 3,69, 2,54, 1,76, и 6,82 через 210 минут инкубации системы характеризовал вещества NKV-43, 44, 45, 50 и 53 соответственно при контакте с lux-биосенсором содержащим pSoxS-lux (рисунок 22 В, С, D, G, J). Наибольшее количество производных NKV, такие как 42, 46, 50, 51, 52 и 53 обладали БЛИ = 4,65, 2,72, 3,95, 2,78, 1,44 и 4,52 соответственно при тестировании с использованием lux-биосенсора, содержащего pKatG-lux через от 60 до 210 минут (рисунок 22 А, Е, G, Н, I и J). *E. coli* MG1655 с плазмидой Grp`::lux реагировал увеличением свечения в 1,59 раз на содержание в пробе NKV-51 также через 210 минут (рисунок 22 Н). Производное NKV-47 характеризовалось БЛИ 22,65 через 180 мин (рисунок 22 F), а NKV-51 показало БЛИ = 1,37 через 210 минут (рисунок 22 Н) при контакте с lux-биосенсором, содержащим pIbpA-lux. БЛИ = 2,61, 5,07, 1,38 и 6,52, которые были

достигнуты после 60 минут тестирования с *E. coli* MG1655 с плазмидой Fab⁺::lux, показали NKV-42, 43, 46 и 53 соответственно, показаны на рисунке 22 (А, В, Е и J).

Поскольку производные NKV-48, 49, 54 и 67 не значительно изменяли БЛИ у lux-биосенсоров со специфическими промотерными участками, вероятнее всего, их механизмы антибактериального действия не обладают влиянием на ДНК, белки, мембраны клеток и способностью продуцировать свободные радикалы, вызывающие окислительный стресс клеток. В то же время установили, что антибактериальный эффект для производных NKV связан с ДНК-тропным действием (44, 45), окислительным стрессом (42, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 53), повреждением белков (47, 51) и мембран клеток (42, 43, 46, 53), рисунок 22.

Анализ взаимосвязи молекулярной структуры 14 производных NKV и их биологического действия на lux-сенсоры установил, 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⁺::lux) оказывали влияние производные, содержащие атом галогена в 10 положении главной гетероциклической цепи, а на *E. coli* MG1655 (Sox⁺::lux) в 9 положении. Усиление окислительного стресса регистрировали, если у производных NKV в пара-положении фенильного радикала появлялась метокси группа. В то же время появление метильной группы приводило к снижению влияния на указанные плазмиды. Наличие фтора в 4-м положении, относительно главной гетероциклической цепи, фенильного радикала приводит к снижению всех видов биологических эффектов. Наличие атома галогена в девятом положении главной гетероциклической цепи способствует проявлению у производных NKV-44 и 45 ДНК-тропных эффектов, а в десятом – мембранотропного действия. Однако появления наиболее электроотрицательного атома галогена – йода в десятом положении главной гетероциклической цепи приводит к выраженному увеличению БЛИ до 22,65 у lux-биосенсора с pIbpA-lux.

5.6. Методические подходы к изучению антимикробной активности веществ с использованием природных и генно-инженерных биолюминесцентных тест-бактерий

Представленные в главах 3, 4 и разделах 5.1. - 5.5. результаты собственных исследований позволяют предложить следующие подходы к изучению антимикробной активности лекарственных веществ с использованием природных и генно-инженерных биолюминесцентных тест-бактерий.

Для выявления антимикробной активности у веществ, в частности, органической природы, в том числе ФС, на первом этапе их анализа необходимо провести оценку таких ключевых характеристик исследуемых соединений, как растворимость в растворителях, значение pH и концентрацию солей, а также провести анализ (расчет для вновь выделенных или синтезированных) физико-химических параметров и выявить фармакофорные группы. Параллельно необходимо провести выбор оптимального тест-штамма люминесцентных бактерий для оценки как специфического антибактериального, так и не специфического антимикробного действия. Для этого провести определение оптимальной температуры тестирования образцов, при которой будет сохраняться стабильное свечение культуры светящихся бактерий и не будут изменяться физико-химические характеристики исследуемых веществ. Оценить влияние на интенсивность люминесценции тест-штамма выбранных растворителей, применяемых для растворения анализируемых веществ. Выбрать «эталонное» вещество для сравнения исследуемых соединений с его активностью и временем ее проявления и которое будет предоставлять информацию об активности (функционировании) тест-штамма. Данные исследования также позволят установить соответствие контрольных и анализируемых проб по их физико-химическим свойствам и создать систему – эталонный образец с добавлением идентичного к исследуемым образцам состава пробы для анализа, который имеет те же характеристики, но не содержит исследуемых веществ.

После подбора условий для проведения биотестирования и выбора тест-штамма проводится скрининг антибиотических проявления анализируемых

веществ с учетом полученных данных из предыдущего анализа таким образом, чтобы исключить влияние всех факторов, кроме биологического действия анализируемого вещества, на свечение тест-штамма люминесцентных бактерий. По результатам проведенных испытаний проводится ранжирование веществ по ЭК₅₀, позволяющей отобрать вещества, для которых эффективная концентрация, снижающая свечение, характерна для «эталонного» вещества (известных антибактериальных веществ, контрольных 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 – ЭК₅₀. 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 тест-культур микроорганизмов. После чего для наиболее активных (проявляющих выраженную антимикробную активность в отношении всех применённых в предыдущих исследованиях микроорганизмов) веществ проводится определение механизмов их антибактериального действия с использованием бактерии lux-сенсоров.

Основываясь на результатах проведенных исследований, описанных главах 1, 3, 4 и 5, представленные алгоритм анализа антимикробной активности лекарственных субстанций с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов (рисунок 23) и методика анализа антимикробной активности фармацевтических субстанций с использованием биолюминесцентных тест-объектов с учетом химической структуры и физико-химических свойств исследуемых веществ, а также условия их биотестирования могут найти применение для скрининговых исследований как у уже известных ФС, так и у вновь синтезируемых веществ на выявление у них антимикробной активности.

По материалам главы опубликованы работы [24, 26, 30, 31, 34, 40, 42, 209, 210, 211].



Рисунок 23 – Технологическая схема анализа веществ на наличие антимикробной активности с использованием биолуминесцентных тест-объектов

Выводы по главе 5

1. Впервые применены разработанные методические подходы к изучению антимикробной активности веществ для скрининга антимикробной активности у направленно синтезированных NKV и их производных. В ходе апробации методики установлено, что 2-[(3-R-9-R₂-10-R₃-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио]уксусных кислоты являются наиболее сильными ингибиторами люминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1.

2. Установлено, что 2-[(3-R-9-R₂-10-R₃-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио]уксусных кислоты, а именно NKV – 44, 47, 52, которые выраженно ингибируют люминесценцию тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, проявляют высокую противомикробную активность в отношении *St. aureus* и *C. albicans*.

3. Выявлены наиболее вероятные механизмы антимикробной активности производных 2-[(3-R-8-R₁-9-R₂-10-R₃-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио]уксусных кислот с использованием генно-инженерных тест-штаммов на основе *E. coli*, такие как 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)

4. Экспериментально установлено, что наличие тиацетатной функциональной группы и метокси группы в 4 положении фенильного радикала приводит к усилению окислительного стресса. В свою очередь появление фтора в 4 положении фенильного радикала приводит к снижению всех видов изученных эффектов. Наличие атома галогена в 9 положении основной цепи способствует проявлению у производных ДНК-тропных эффектов, а в десятом – мембранотропного действия. Наличие атома йода в десятом положении приводит к выраженному увеличению БЛИ lux-биосенсора с pIbrA-lux, что означает, что наличие «фармакоформных» заместителей в определенных положениях будет способствовать высокой антибактериальной активности у соединений.

5. Проведена модификация методики, направленной на изучение антимикробной активности веществ с использованием природных биолюминесцентных тест-бактерий путем введения в алгоритм анализа

антимикробной активности веществ этапов сопоставления полученных данных о антимикробной активности исследованных веществ с эталонными тест-культурами микроорганизмов с последующим изучением механизмов их антибактериального действия с использованием lux-сенсоров.

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 ЭК₅₀, 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 0,992 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-2Н-[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 (ЭК₅₀ от 0,1 до 0,25 мг/мл), проявляют высокую противомикробную активность в отношении рекомбинантных бактерий *E. coli* MG1655 (Xen⁺::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 ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

EC₂₀ и EC₅₀ - эффективный объем образца, вызывающий тушение свечения биосенсора на 20 % или 50 % по сравнению с контролем.

FtsZ-белок – белок, играющий ключевую роль в делении клеток бактерий, кодируемый геном *ftsZ*.

H₁-антигистаминные средства – лекарственные препараты, вступающие во взаимодействие с H₁-гистаминовым рецептором (мембранный белок), которое сопровождается угнетением эффектов гистамина.

LogP – соотношение распределения вещества в системе октанол-вода.

MATRIX – компьютерная программа, позволяющая оценить взаимосвязи электронного строения и специфической активности лекарственных веществ.

MW – Molecular weight – молекулярный вес.

NKV – кодовое название класса производных 1,2,4-триазино[2,3-с]хиназолинтиоуксусных кислот с родоначальной структурой в виде гетероцикла 2-((2-оксо-3-фенил-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио)уксусная кислота.

PASS – компьютерная программа, позволяющая по структурной формуле "лекарственноподобного" органического соединения (молекулярная масса которого находится в интервале 50-1250 а.е.м.) оценить вероятный профиль его биологической активности.

QSAR – Quantitative Structure-Activity Relationship – количественное отношение «структура – активность» соединения.

SAR – Structure-Activity relationship – взаимосвязь «структура – активность» соединения.

T_{ER} – type of enzymatic kinetics – тип ферментативной кинетики.

tPSA – площадь полярной поверхности молекулы.

АФТ – Аденозинтрифосфат

БЛИ – биOLUMиНесцентный индекс.

ДМСО – диметилсульфоксид.

ДМФА – диметилформамид.

ЗАО – закрытое акционерное общество.

ИПТ – индукторов первого типа.

ИТ – индекс токсичности.

КФУ – Крымский федеральный университет.

ЛП – лекарственный препарат.

ЛС – лекарственное средство.

МБК – Минимальная бактерицидная концентрация.

МИК – Минимальная ингибирующая рост бактерий концентрация.

МФК – Минимальная фунгицидная концентрация.

ОАО – открытое акционерное общество.

ООО – общество с ограниченной ответственностью.

ПЖ – прозрачная жидкость.

ПКО – предел количественного обнаружения используемой аналитической методики.

ПО – предел обнаружения используемой аналитической методики.

ФГАОУ ВО – Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования.

ФМНН₂ – восстановленный флавинмононуклеотид.

ФС – фармацевтическая субстанция

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия.

ЭК₁₀₀ – эффективная концентрация субстанции (препарата), снижающая свечения микроорганизмов на 100%.

ЭК₅₀ – эффективная концентрация субстанции (препарата), снижающая свечения микроорганизмов на 50%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берест, Г. Г. Пошук протимікробних та протигрибкових засобів серед 3-R-6-тіо-6,7-дигідро-2Н-[1,2,4]тріазино[2,3-с]хіназолін-2-онів та їх S-заміщених [Текст] / Г. Г. Берест, І. С. Носуленко, О. Ю. Воскобойнік [та ін.] // Запорожский медицинский журнал. – 2011. – Т. 13, № 3. – С. 76–80.
2. Ведьмина, Е. А. Многотомное руководство по микробиологии и эпидемиологии инфекционных болезней [Текст] / Е. А. Ведьмина, Н. Ф. Фурер. – М.: Медицина, 1964. – Т. 4. – 322 с.
3. Владимиров, Ю. А. Активированная хемилюминесценция и биолуминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях [Текст] / Ю. А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Том 7. №1. – С. 16–23.
4. Габриелян, Л. И. Исследование взаимосвязей между молекулярной структурой и гепатозащитной активностью химических соединений [Текст]: дис. канд. био. наук : 03. 00. 02 : защищена 24. 05. 2005 / Лилит Ильинична Габриелян. – М.: 2005. – 117 с. – Библиогр. : с 11 – 44. – 61:05-3/1004
5. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание / МЗ РФ. – Москва, 2015. – Том 1. – С. 235–269.
6. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание / МЗ РФ. – Москва, 2015. – Том 1. – С. 680–681.
7. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т. 1 / Москва, 2018. – 1832 с. [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://resource.ruscml.ru/feml/pharmacopia/14_4/HTML/index.html (дата обращения 15. 01. 2019).
8. Дерябин, Д. Г. Бактериальная биолуминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты [Текст] / Д. Г. Дерябин. – Новосибирск: Наука, 2009. – 245 с.
9. Завильгельский, Г. Б. Оценка токсического действия наноматериалов на живые организмы [Текст] / Г. Б. Завильгельский, В. Ю. Котова, С. А. Хрульнова, И. В. Манухов / Биотехнология. – 2013. – № 6. – С. 8 – 17.

10. Зверев, В. В. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. / Под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – М. : Геотар–Медиа, 2017. – 360 с.

11. Игонина, Е. В. Lux-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность [Текст] / Е. В. Игонина, М. В. Марсова, С. К. Абилов // Экологическая генетика. – 2016. – Т. 14. №. 4. – С. 52–62.

12. Кацев, А. М. Биолюминесцентный 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.

13. Кацев, А. М. Изучение биологического действия комбинаций ДНК–интеркаляторов с кофеином на люминесцентные бактерии [Текст] / А. М. Кацев, Г. Б. Скамрова, М. П. Евстигнеев // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского, Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27, № 2. – С. 186–195.

14. Кацев, А. М. Новые термофильные люминесцентные бактерии, выделенные из азовского моря [Текст] / А. М. Кацев // Таврический медико–биологический вестник. 2014. – Т. 17, № 2. – С. 59–64.

15. Кацев, А. М. Оптимизация выбора органических растворителей для проведения скринингового биотестирования лекарственных веществ [Текст] / А. М. Кацев, А. С. Шандровская, Э. Р. Абдураманова // Запорожский медицинский журнал. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 83–86.

16. Кацев, А. М. Оценка взаимодействия катионных поверхностно–активных антисептиков с сывороточным альбумином методом бактериальной биолюминесценции [Текст] / А. М. Кацев, В. Ю. Семенов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 4. – С. 39.

17. Кацев, А. М. Оценка применимости биолюминесцентного 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.

18. Кацев, А. М. Ферментативная активность светящихся бактерий Черного и Азовского морей и их антиоксидантная защита [Текст] / А. М. Кацев // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Сер. Биология. Химия. – 2014. – Т. 27, № 3. – С. 184–193.

19. Кирлан, С. А. Моделирование и прогноз свойств биологически активных гетероциклических соединений на основе связи «структура–активность–токсичность» [Текст]: дис. докт. хим. наук: 02. 00. 03: защищена 07. 06. 2011 / Светлана Анатольевна Кирлан. – Уфа, 2011. – 302 с. – Библиогр. : с 247 – 268. – 05201151588

20. Кокунин, В. А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов [Текст] / В. А. Кокунин // Укр. биохим. журн. 1975. – Т. 47. № 6. – С. 776–790.

21. Котова, В. Ю. Индуцируемые специфические lux-биосенсоры для детекции антибиотиков: конструирование и основные характеристики [Текст] / В. Ю. Котова, К. В. Рыженкова, И. В. Манухов, Г. Б. Завильгельский // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50. №. 1. – С. 112 – 117.

22. Кудряшева, Н. С. Физико–химические основы биоллюминесцентного анализа [Текст] : учеб. пособие Краснояр. гос. ун–т. / Н. С. Кудряшева – Красноярск, 2002. – 154 с.

23. Наумова, Н. В. Химический и биоллюминесцентный 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

24. Пат. №111855 Україна, С2 А61К 31/53 (2006. 01) С07D 487/04 (2006. 01) А61Р 31/16 (2006. 01). Застосування N–циклоалкіл– або N–циклоалкаріл–2–[(8–R1–9–R2–10–R3–3–R–2–оксо–2Н–[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

I. С., Берест Г. Г., Кацев А. М., Сафронюк С. Л. (UA) заявитель и патентообладатель // Запорізь. держ. мед. ун-т. – № а 2014 0356524 ; заявл. 07. 04. 2014; опубл. 24. 06. 2016, Бюл. № 12. – 12 с.

25. 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

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

27. Раевский, О. А. Дескрипторы молекулярной структуры в компьютерном дизайне биологически активных веществ [Текст] / О. А. Раевский // Успехи химии – 1999. – Т. 68 (6). – С. 555–575.

28. Регистр лекарственных средств России Энциклопедия лекарств. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.rlsnet.ru/> (дата обращения 10. 10. 2019).

29. Родичева, Э. К. Биolumинесцентные биотесты на основе светящихся бактерий для экологического мониторинга [Текст] / Э. К. Родичева, А. М. Кузнецов, С. Е. Медведева // Вестник ОГУ. – 2009. – Т. 5. – С. 96–100

30. Сафронюк, С. Л. Оценка биологически активных производных 1,2,4–триазинохиназолин–2–онов биolumинесцентным 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.

31. 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.

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

33. 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.

34. 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.

35. 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

36. 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

37. Сафронюк, С. Л. Использование биолюминесцентных 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

38. 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

39. Сафронюк, С. Л. Новые подходы к изучению биологической активности лекарственных веществ с использованием природных и генно-инженерных биолюминесцентных бактерий [Текст] / С. Л. Сафронюк, А. М. Кацев // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2017. – Т. 2. № 1. – С. 502–507.

40. 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.

41. Сафронюк, С. Л. Определение концентрации гентамицина сульфата в плазме крови при проведении фармакокинетических исследований биолюминесцентным методом [Текст] / С. Л. Сафронюк // Материалы 82 международной научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты современной медицины». – 2010. – С. 140

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

43. Сафронюк, С. Л. Применимость рекомбинантных lux-биосенсоров для выявления некоторых механизмов антибактериальной активности направленно синтезированных производных 2-((2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-С]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.

44. 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

45. Свидетельство № 224. 01. 13. 194/2002, выданное Уральским НИИ метрологии, а также согласно КНД 211. 1. 4. 060–97 (Методика визначення токсичності води на бактеріях *Photobacterium phosphoreum* (Cohn) Ford.

46. Селифонова, О. В. Биolumинесцентные сенсоры на ионы ртути : автореферат дис. ... кандидата химических наук : 02.00.10 / О. В. Селифонова / Ин-т биоорганической химии им. М. М. Шемякина. – Москва, 1995.- 15 с.: ил. РГБ ОД, 9 95-1/3672-5

47. Смирнов, И. В. Новые подходы к оценке взаимосвязи электронного строения и специфической активности лекарственных веществ на примере производных сульфонилбензойной кислоты [Текст]: автореф. дис. ... докт. мед. наук : 14. 03. 06 [Текст] / Иван Владимирович Смирнов – Томск, 2011. – 38 с.

48. Соломонов, Б. Н. Метод расчета энергий Гиббса гидрофобного эффекта и специфического взаимодействия неэлектролитов в водных растворах [Текст] / Б. Н. Соломонов, Н. А. Седов // Журнал физической химии. – 2008. – Т. 83 №7. – С. 1259–1263.

49. Тец, В. В. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учеб. пособие для студентов мед. вузов [Текст] / В. В. Тец, Л. Б. Борисов, Б. Н. Козьмин–Соколов и др.; под общ. ред. В. В. Теца. – 2. изд. – М.: Медицина, 2002. – 352 с.

50. Токсикологические методы контроля. Методика определения интегральной токсичности поверхностных, в том числе морских, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных экстрактов почв, отходов, осадков сточных вод по изменению интенсивности бактериальной биolumинесценции тест–системой

ЭКОЛЮМ [Текст]: ПНД Ф Т 14. 1:2:3:4. 11–04. – М.: Министерство природных ресурсов РФ: ЗАО «НПО ИммуноТех», 2004. – 22 с.

51. Adimadhyam, S. Risk of amputations associated with SGLT2 inhibitors compared to DPP-4 inhibitors: A propensity-matched cohort study [Text] / S. Adimadhyam, T. A. Lee, G. S. Calip [et al.] // John Wiley & Sons Ltd. – 2018. – Vol. 20. – P. 2792–2799

52. Agrawal, V. K. QSAR study on narcotic mechanism of action and toxicity: a molecular connectivity approach to *Vibrio fischeri* toxicity testing [Text] / V. K. Agrawal, P. V. Khadikar // Bioorg Med Chem. – 2002. – V. 10(11). – P. 3517–3522.

53. Al-Bakri, A. G. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration [Text] / A. G. Al-Bakri, F. U. Afifi // J. Microbiol. Methods. – 2007. – Vol. 68. – P. 19–25.

54. Altenburger, R. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships [Text] / R. Altenburger, M. Nendza, G. Schuurmann // Environ Toxicol Chem. – 2003. – V. 22(8). – P. 1900–1915

55. Arikan, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods [Text] / S. Arikan // Med. Mycol. – 2007. – Vol. 45. – P. 569–587.

56. Aruoja, V. Toxicity of 58 substituted anilines and phenols to algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and bacteria *Vibrio fischeri*: comparison with published data and QSARs. [Text] / V. Aruoja, M. Sihtmae, H-C. Dubourguier, A. Kahru // Chemosphere. – 2011. – V. 84(10). – P. 1310–1320.

57. Asadollahi-Baboli, M. Exploring QSTR analysis of the toxicity of phenols and thiophenols using machine learning methods [Text] / M. Asadollahi-Baboli // Environmental Toxicol Pharmacol. – 2012. – V. 34(3). – P. 826–831.

58. Ashe, J. Movement parameters and neural activity in motor cortex and area [Text] / J. Ashe, A. P. Georgopoulos // Cerebral Cortex. – 1994. – Vol. 4. – P. 590–600

59. Azimova, M. Comparison of three bacterial toxicity assays for imidazolium-derived ionic liquids [Text] / M. Azimova, S. Morton, P. Frymier // J. Environ. Eng. – 2009. – Vol. 135. – P. 1388–1392.

60. Backhaus, T. Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: a comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay [Text] / T. Backhaus, K. Froehner, R. Altenburger, L. H. Grimme. // Chemosphere. – 1997. – Vol. 35. – P. 2925–2938.
61. Baker, C. N. Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria [Text] / C. N. Baker, Stocker S. A. , Culver D. H. , Thornsberry C. // J. Clin. Microbiol. – 1991. – Vol. 29. – P. 533–538.
62. Ballatore, C. Carboxylic acid (bio) isosteres in drug design [Text] / C. Ballatore, D. M. Huryn, A. B. Smith // Chem Med Chem. – 2013. – Vol. 8(3). – P. 385–395.
63. Balouiri, M. Antifungal activity of *Bacillus* spp. isolated from *Calotropis procera* AIT. *Rhizosphere* against *Candida albicans* [Text] / M. Balouiri, S. Bouhdid, E. Harki, [et al.] // Asian J. Pham. Clin. Res. – 2015. – Vol. 8. – P. 213–217.
64. Balouiri, M. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review [Text] / M. Balouiri, M. Sadiki, S. K. Ibnsouda // Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2016. – Vol. 6, Is. 2. – P. 71–79
65. Beckers, B. Evaluation of a bioluminescence assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria [Text] / B. Beckers, H. R. Lang, D. Schimke, A. Lammers // Eur. J. Clin. Microbiol. – 1985. – Vol. 4. – P. 556–561.
66. Ben-Israel, O. Identification and Quantification of Toxic Chemicals by Use of *Escherichia coli* Carrying lux Genes Fused to Stress Promoters [Text] / O. Ben-Israel, H. Ben-Israel, S. Ulitzur // Appl Environ Microbiol. – 1998. – Vol. 64(11). – P. 4346–4352.
67. Berest, G. G. An efficient synthesis of 3-R-6-thio-6,7-dihydro-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-2-ones and its derivatives, antimicrobial and antifungal activity [Text] / G. G. Berest, A. Yu. Voskoboynic, S. I. Kovalenko [et al.] // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2010. – Т. 8, Вип. 3 (31). – С. 42–52.
68. Berest, G. G. Synthesis and biological activity of novel N-cycloalkyl-(cycloalkylaryl)-2-[(3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-6-

yl)thio]acetamides [Text] / G. G. Berest, O. Yu. Voskoboynik, S. I. Kovalenko [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2011. – Vol. 46. nb. 12. – P. 6066–6074.

69. Berest, G. G. The efficient synthesis of 3-R-6-thio-6,7-dihydro-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-2-ones and its derivatives, antimicrobial and antifungal activity [Text] / G. G. Berest, A. Yu. Voskoboynic, S. I. Kovalenko [et al.] // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2010. – Т. 8(31). – С. 42–52.

70. Berghaus, L. J. Comparison of Etest, disk diffusion, and broth macrodilution for *in vitro* susceptibility testing of *Rhodococcus equi* [Text] / L. J. Berghaus, S. Giguère, K. Guldbech [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2015. – Vol. 53. – P. 314–318.

71. Bisio, C. Nanosized inorganic metal oxides as heterogeneous catalysts for the degradation of chemical warfare agents [Text] / C. Bisio, F. Carniato, L. Marchese, [et al.] // Catalysis Today. – 2016. – Vol. 277. – P. 192–199. ,

72. Bogatcheva, E. Identification of New Diamine Scaffolds with Activity against *Mycobacterium tuberculosis* [Text] / E. Bogatcheva, C. Hanrahan, B. Nikonenko [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2006. – Vol. 49(11). – P. 3045–3048.

73. Böhm, H. – J. Fluorine in Medicinal Chemistry [Text] / H. –J. Böhm, D. Banner, S. Bendels [et al.] // ChemBioChem. – 2004. – Vol. 5. – P. 637–643.

74. Bolelli, L. Bioluminescent bacteria assay of veterinary drugs in excreta of food-producing animals [Text] / L. Bolelli, Z. Bobrovová, E. Ferri // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2006. – Vol. 42. – P. 88–93.

75. Bolelli, L. The management and exploitation of naturally light-emitting bacteria as a flexible analytical tool: A tutorial [Text] / L. Bolelli, E. N. Ferri, Girotti S. // Analytica Chimica Acta. – 2016. – Vol. 934. – P. 22–35

76. Bouhdid, S. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil [Text] / S. Bouhdid, J. Abrini, A. Zhiri, M. J. Espuny, A. Manresa // J. Appl. Microbiol. – 2009. – Vol. 106. – P. 1558–1568.

77. Bozorg, A. Using, Bacterial bioluminescence to evaluate the impact of biofilm on porous media hydraulic properties [Text] / A. Bozorg, I. D. Gates, A. Sen // Microbiol. Methods. – 2015. – Vol. 109. – P. 84–92.

78. Brantner, A. H. Influence of various parameters on the evaluation of anti-bacterial compounds by the bioautographic TLC assay [Text] / A. H. Brantner // *Pharm. Pharmacol.* –1997. – Lett. 7. – P. 152–154.
79. Brodl, E. Molecular mechanisms of bacterial bioluminescence [Text] / E. Brodl, A. Winkler, P. Macheroux. // *Journal of Computational and structural biotechnology.* – 2018. – Vol. 16. – P. 551–564.
80. Bundy, J. Application of bioluminescence-based microbial sensors to the ecotoxicity assessment of organotins [Text] / J. Bundy, J. L. Wardell, C. D. Campbell, K. Killham G. I. Paton // *Letters in Applied Microbiology.* – 2003. – Vol. 25(5). – P. 353 – 358
81. Burlage, R. S. Living biosensors for the management and manipulation of microbial consortia [Text] / R. S. Burlage, C. T. Kuo // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1994. – Vol. 48. – P. 291–309.
82. Sayler, G. S. Molecular Probes and Biosensors in Bioremediation and Site Assessment [Text] / G. S. Sayler, U. Matrubutham, F.-M. Menn, W. H. Johnston, R. D. Stapleton // Edited By S. K. Sikdar, R. L. Irvine. – *Fundamentals and Applications* 1st Edition. – 1998. – 50 p.
83. Cai, J. Use of a luminescent bacterial biosensor for biomonitoring and characterization of arsenic toxicity of chromated copper arsenate (CCA) [Text] / J. Cai, M. S. Du Bow // *Biodegradation.* – 1996. – Vol. 8. – P. 105–111.
84. Caldwell, Ch. G. Fluoropyrrolidine amides as dipeptidyl peptidase IV inhibitors [Text] / Ch. G. Caldwell, P. Chen, J. He [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* – 2004. – Vol. 14. – P. 1265–1268.
85. Caliş, U. Synthesis and antimicrobial activity evaluation of some new adamantane derivatives [Text] / U. Caliş, M. Yarim, M. Köksal, M. Ozalp // *Arzneimittel-Forschung.* – 2002. – Vol. 52(10). – P. 778–781.
86. Caron, F. Antimicrobial susceptibility testing: a four facets tool for the clinician [Text] / F. Caron// *J. Des. Anti-Infect.* – 2012. – Vol. 14. – P. 186–174.
87. Castilho, A. L. Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by Resazurin broth microdilution assay [Text] / A. L. Castilho, K. R.

Caleffi-Ferracioli, P. H. Canezin [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 2015. – Vol. 111. – P. 119–121.

88. Champiat, D. Biochemiluminescence and biomedical applications [Text] / Champiat D., Roux A., Lhomme O., Nosenzo G. // Cell Biol Toxicol. – 1994. – Vol. 10. – P. 345–351

89. Chen, Q. A molecular fragments variable connectivity index for studying the toxicity (*Vibrio fischeri* pT50) of substituted-benzenes [Text] / Q. Chen, Y. W. Kou, Q. Wang, H. Chen, J. Yuan // J Environ Sci Health Part A. – 2009. – V. 44(3). – P. 288–294.

90. Clancy, C. J. Characterizing the Effects of Caspofungin on *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Candida glabrata* Isolates by Simultaneous Time-Kill and Postantifungal-Effect Experiments [Text] / C. J. Clancy, H. Huang, S. Cheng, H. Derendorf, M. H. Nguyen // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – Vol. 50. – P. 2569–2572.

91. Close, D. The Evolution of the Bacterial Luciferase Gene Cassette (*lux*) as a Real-Time Bioreporter / D. Close, T. Xu, A. Smartt, [et. al.] // Sensors (Basel). – 2012. – V. 12. №. 1. – P. 732–752.

92. CLSI, Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline. CLSI document M44-A. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2004.

93. CLSI, Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline, CLSI document M26-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Roadn Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 1998

94. CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012

95. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory

Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

96. Combes, R. Challenges for computational structure-activity modelling for predicting chemical toxicity: future improvements? [Text] / R. Combes // Expert Opin Drug Metabol Toxicol. – 2011. – V. 7(9). – P. 1129–1140.

97. Cronin, M. T. D. Structure-toxicity relationships for aliphatic compounds encompassing a variety of mechanisms of toxic action to *Vibrio fischeri*. [Text] / M. T. D. Cronin, G. S. Bowers, G. D. Sinks, T. W. Schultz // SAR QSAR Environ Res. – 2000. – V. 11(3–4). – P. 301–312.

98. Cronin, M. T. D. Structure-toxicity relationships for three mechanisms of action of toxicity to *Vibrio fischeri*. [Text] / M. T. D. Cronin, T. W. Schultz (1998) // Ecotoxicol Environ Saf. – 1998. – V. 39(1). – P. 65–69.

99. Croucha, S. P. M. The use of ATP Bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity [Text] / S. P. M. Croucha, R. Kozlowskia, K. J. Slaterb, J. Fletcher // J. Immunol. Methods. – 1993. – Vol. 160. – P. 81–88.

100. Dalzell, D. J. B. A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge [Text] / D. J. B. Dalzell // Chemosphere. – 2002. – Vol. 47. – P. 535–545.

101. Das, K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends [Text] / K. Das, R. K. S. Tiwari, D. K. Shrivastava // J. Med. Plants Res. – 2010. – Vol. 4. – P. 104–111.

102. De Billerbeck, V. G. Huiles Essentielles et Bactéries Résistantes aux Antibiotiques [Text] / V. G. De Billerbeck // Phytotherapie. – 2007. – Vol. 5. – P. 249–253.

103. Deeva, A. A. Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylogenetic analysis [Text] / A. A. Deeva, E. A. Temlyakova, A. A. Sorokin, E. V. Nemtseva, V. A. Kratasyuk // Bioinformatics – 2016. – Vol. 32(20). – P. 3053–3057.

104. Denes, E. Synergie et Antagonisme en Antibiotherapie [Text] / E. Denes, N. Hidri // Antibiotiques. – 2009. – Vol. 11. – P. 106–115.

105. Dewanjee, S. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry [Text] / S. Dewanjee, M. Gangopadhyay, N. Bhattacharya, R. Khanra, T. K. Dua // J. Pharm. Anal. – 2015. – Vol. 5. – P. 75–84.
106. Dong, W. Purification, cloning, expression, and biochemical characterization of a monofunctional catalase, KatP, from *Pigmentiphaga* sp. DL–8 [Text] / W. Dong, Y. Hou, S. Li // Protein Expression and Purification. – 2015. – Vol. 108. – P. 54–61.
107. Ebejer, J. –P. Are the physicochemical properties of antibacterial compounds really different from other drugs? [Text] / J. –P. Ebejer, M. H. Charlton, P. W. Finn // Cheminform. – 2016. – Vol. 8(1). – P. 1–9.
108. Eissa, A. M. F. Synthesis and biological evaluation of some new 2–propyl–4(3H)–quinazolinone derivatives as anti–bacteria [Text] / A. M. F. Eissa, A. M. El–metwally, M. A. El–hashash [et al.] // J. Korean Chem. Society. – 2008. – Vol. 52(3). – P. 328–337.
109. Elleuch, L. Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262 [Text] / L. Elleuch, M. Shaaban, S. Smaoui [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2010. – Vol. 162. – P. 579–593.
110. El–Sayed, R. Synthesis of novel heterocycles with antimicrobial and surface activity [Text] / R. El–Sayed, A. A. F. Wasfy, A. A. Aly // J. Heterocyclic Chem. – 2005. – Vol. 42. – P. 125–130.
111. El–Sharief, A. M. Sh. Aminoacids in the synthesis of heterocyclic systems: The synthesis of triazinoquinazolinones, triazepinoquinazolinones and triazocinoquinazolinones of potential biological interest [Text] / A. M. Sh. El–Sharief, Y. A. Ammar, M. A. Zahran [et al.] // Molecules. – 2001. – Vol. 6(3). – P. 267–278.
112. Erbe, J. L. Cyanobacteria carrying ansmt-lux transcriptional fusion as biosensors for the detection of heavy metal cations [Text] / J. L. Erbe, A. C. Adams, K. B. Taylor, L. M. Hall // Journal of Industrial Microbiology. – 1996. – V. 17. – P. 80–83
113. Esimbekova, E. N. Comparative study of immobilized and soluble NADH:FMN–oxidoreductase–luciferase coupled enzyme system [Text] / E. N.

Esimbekova, V. A. Kratasyuk, I. G. Torgashina // Biochemistry. – 2009. – Vol. 74, No. 6. – P. 695–700.

114. Fabricant, J. D. Bioluminescent strains of *E. coli* for the assay of biocides [Text] / J. D. Fabricant, J. H. Chalmers, M. W. Bradbury // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 1995. – Vol. 54. – P. 90–95.

115. Fang, Y. Multilocus sequence analysis, a rapid and accurate tool for taxonomic classification, evolutionary relationship determination, and population biology studies of the genus *Shewanella* [Text] / Y. Fang, Y. Wang, Z. Liu [et al.] // Appl. Environ Microbiol. – 2019. – Vol. 85(11). – P. e03126–18.

116. Farre, M. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis [Text] / M. Farré, D. Barceló, // Trends Anal. Chem. – 2003. – Vol. 22. – P. 299–310.

117. Fedorov, S. N. Anticancer and cancer preventive properties of marine polysaccharides: some results and prospects [Text] / S. N. Fedorov, S. P. Ermakova, T. N. Zvyagintseva, V. A. Stonik // Marine Drugs. – 2013. – Vol. 11(12). – P. 4876–4901

118. Fguira, L. F.-B. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80 [Text] / L. F. -B. Fguira, S. Fotso, R. B. Ameer-Mehdi, L. Mellouli, H. Laatsch // Res. Microbiol. – 2005. – Vol. 156. – P. 341–347.

119. Finger, S. Antimicrobial properties of cyclodextrin–antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay [Text] / S. Finger, C. Wiegand, H. -J. Buschmann, U. -C. Hipler // Int. J. Pharm. – 2012. – Vol. 436. – P. 851–856.

120. Finger, S. Antimicrobial properties of cyclodextrin–antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay [Text] / S. Finger, C. Wiegand, H. -J. Buschmann, U. -C. Hipler // Int. J. Pharm. – 2013. – Vol. 452. – P. 188–193

121. Fischer, R. On the paper chromatographic detection of penicillin preparations [Text] / R. Fischer, H. Lautner // Arch. Pharm. – 1961. – Vol. 294. – P. 1–7

122. Froehner, K. Bioassay with *Vibrio fischeri* for the assessment of delayed toxicity [Text] / K. Froehner, T. Backhaus, L. H. Grimme. // Chemosphere. – 2000. – Vol. 40. – P. 821–828.
123. Galiger, C. Assessment of efficacy of antifungals against *Aspergillus fumigatus*: value of real-time bioluminescence imaging [Text] / C. Galiger, M. Brock, G. Jouvion, A. Savers, M. Parlato et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2013. – Vol. 57. – P. 3046–3059.
124. Galli, R. Evaluation and application of aquatic toxicity tests: use of the Microtox test for the prediction of toxicity based upon concentrations of contaminants in soil [Text] / R. Galli, C. D. Munz, R. Scholtz // Hydrobiol. – 1994. – Vol. 273. – P. 179–189.
125. Garrity, G. M. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Volume Two: *The Proteobacteria*, Part B, *The Gammaproteobacteria* [Text] / G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg [et al.] // US. : Springer. – 2005. – 1203 p.
126. Gehrt, A. Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by Broth micro-dilution method [Text] / A. Gehrt, J. Peter, P. A. Pizzo, T. J. Walsh // J. Clin. Microbiol. – 1995. – Vol. 33. – P. 1302–1307.
127. Gerrard, J. G. Photorhabdus Species: Bioluminescent bacteria as human pathogens? [Text] / J. G. Gerrard, S. McNevin, D. Alfredson, R. Forgan–Smith, N. Fraser // Emerg Infect Dis. – 2003. – Vol. 9(2). – P. 251–254.
128. Girotti, S. Bioremediation of hydrocarbons contaminated water and soils: monitoring by luminescent bacteria test [Text] / S. Girotti, E. Maiolini, L. Bolelli, // Int. J. Environ. Anal. Chem. – 2011. – Vol. 91. – P. 900–909.
129. Gomez-Lopez, A. Analysis of the influence of tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp [Text] / A. Gomez-Lopez, A. Aberkane, E. Petrikkou [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 1251–1255.
130. Goodall, R. R. A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture [Text] / R. R. Goodall, A. A. Levi // Nature. – 1946. – Vol. 158. – P. 675–676

131. Green, L. J. LY303366 exhibits rapid and potent fungicidal activity in flow cytometric assays of yeast viability [Text] / L. J. Green, P. Marder, L. L. Mann, L. -C. Chio, W. L. Current // Antimicrob. Agents Chemother. – 1999. – Vol. 43. – P. 830–835.
132. Green, L. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry [Text] / L. Green, B. Petersen, L. Steimel, P. Haeber, W. Current // J. Clin. Microbiol. – 1994. – Vol. 32. – P. 1088–1091.
133. Gregor, C. Strongly enhanced bacterial bioluminescence with the lux operon for single-cell imaging [Text] / C. Gregor, K. C. Gwosch, S. J. Sahl, S. W. Hell. // PNAS. – 2018. – V. 115. №. 5. – P. 962 – 967.
134. Gui, Q. The application of whole cell-based biosensors for use in environmental analysis and in medical diagnostics [Text] / Q. Gui, T. Lawson, S. Shan, L. Yan, Y. Liu // Sensors (Basel). – 2017. – Vol. 17(7). – P. 1623–1640
135. Gull, Y. Synthesis of N-(6-Arylbenzo[d]thiazole-2-acetamide derivatives and their biological activities: An experimental and computational approach [Text] / Y. Gull, N. Rasool, M. Noreen [et al.] // Molecules. – 2016. – Vol. 21(3). – P. 266–283
136. Gülmez, D. Comparison of different antimicrobial susceptibility testing methods for *Stenotrophomonas maltophilia* and results of synergy testing [Text] / D. Gülmez, A. Cakar, B. Sener, J. Karakaya, G. Hasçelik // J. Infect. Chemother. – 2010. – Vol. 16. – P. 322–328
137. Gupta, P. Comparative evaluation of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution in susceptibility testing of amphotericin B, voriconazole and caspofungin against clinical *Aspergillus* isolates [Text] / P. Gupta, V. Khare, D. Kumar [et al.] // J. Clin. Diagn. Res. – 2015. – Vol. 9. – P. DC04–DC07.
138. Haddock, S. H. D. Case. Bioluminescence in the Sea [Text] / S. H. D. Haddock, M. A. Moline, J. F. Case // Annual Review of Marine Science. – 2010. – Vol. 2. – P. 443–493.
139. Hagmann, W. K. The many roles for fluorine in medicinal chemistry [Text] / W. K. Hagmann // Journal of Medicinal Chemistry. – 2008. – Vol. 51(5). – P. 4359–4369.

140. Hamburger, M. O. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity [Text] / M. O. Hamburger, G. A. Cordell // J. Nat. Prod. – 1987. – Vol. 50. – P. 19–22.
141. Harkey, G. A. Effect of soil contaminant extraction method in determining toxicity using the Microtox assay [Text] / G. A. Harkey, T. M. Joung // Environ. Toxicol. Chem. – 2000. – Vol. 19. – P. 276–282.
142. Hassan, S. H. A. Improved detection of toxic chemicals by *Photobacterium Phosphoreum* using modified Boss medium [Text] / S. H. A. Hassan, S. E. Oh // J. Photochem Photobiol. B: Biology. – 2010. – Vol. 101(1). – P. 16–21
143. Hausdorfer, J. E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* [Text] / J. Hausdorfer, E. Sompek, F. Allerberger, M. P. Dierich, S. Rüscher-Gerdes // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 1998. – Vol. 2. – P. 751–755.
144. Hayashi, S. Extraction and purification of a luminiferous substance from the luminous mushroom *Mycena chlorophos* [Text] / S. Hayashi, R. Fukushima, N. Wada // Biophysics (Nagoya-shi). – 2012. – Vol. 8. – P. 111–114.
145. Heatley, N. G. A method for the assay of penicillin [Text] / N. G. Heatley, // Biochem. J. – 1944. – Vol. 38, № 1. – P. 61–65.
146. Heitzer, A. Optical biosensor for environmental online monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium [Text] / A. Heitzer, K. Malachowsky, J. E. Thonnard [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60. – P. 1487–1494.
147. Hermens, J. Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity of organic chemicals in *Photobacterium phosphoreum*: the microtox test [Text] / J. Hermens, F. Busser, P. Leeuwangh, A. Musch // Ecotoxicol Environ Saf. – 1985. – V. 9(1). – P. 17–25.
148. Hernandez, M. Z. Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: Hints for the drug design [Text] / M. Z. Hernandez, S. M. T. Cavalcanti, D. R. M. Moreira [et al.] // Current Drug Targets. – 2010. – Vol. 11(3). – P. 303–314.
149. Holzman, T. F. Proteolytic inactivation of luciferases from three species of luminous marine bacteria, *Beneckea harveyi*, *Photobacterium fischeri*, and

Photobacterium phosphoreum: evidence of a conserved structural feature [Text] / T. F. Holzman, T. O. Baldwin // Proc Natl Acad Sci USA. – 1980. – Vol. 77(11). – P. 6363–6367.

150. Homans, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances [Text] / A. Homans, A. Fuchs // J. Chromatogr. – 1970. – Vol. A 51. – P. 327–329.

151. Horvath, G. Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography [Text] / G. Horvath, N. Jambor, A. Vegh [et al.] // Flavour Fragr. J. – 2010. – Vol. 25. – P. 178–182.

152. Hyuga, S. The pharmacological actions of ephedrine alkaloids-free *Ephreda* Herb extract and preparation for clinical application [Text] / S. Hyuga // Yakugaku Zasshi. – 2017. – Vol. 137(2). – P. 179–186

153. Isanbor, C. Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents [Text] / C. Isanbor, D. O'Hagan // Journal of Fluorine Chemistry. – 2006. – Vol. 127. – P. 303–319.

154. ISO / TS 20281: 2006. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data [Text]. Введ. 2006–04–01. – Int. Org. Stand. Geneva, Switzerland. – 2006. – 268 p.

155. ISO 11348–3: 2008 + A1: 2018 Water quality determination of the inhibitory effect of water samples on light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) [Text]. Введ. 2008–12–31. – BSI. – 2008. – 30 c.

156. Ittzes, B. Atropine and glycopyrrolate do not support bacterial growth–safety and economic considerations [Text] / B. Ittzes, Z. Weiling, I. Z. Batai, M. Kerenyi, I. Batai // J. Clin. Anesth. – 2016. – Vol. 35. – P. 560–563.

157. Jarque, S. Bioluminescent *Vibrio fischeri* assays in the assessment of seasonal and spatial patterns in toxicity of contaminated river sediments [Text] / S. Jarque, P. Masner, J. Klánová, R. Prokeš, L. Bláha // Front Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 1738.

158. Je, H. J. Bioluminescence assays for monitoring chondrogenic differentiation and cartilage regeneration [Text] / H. J. Je, M. G. Kim, H. J. Kwon // Sensors (Basel). – 2017. – Vol. 17(6). – E1306.

159. Jiang, L. Toxicity prediction of antibiotics on luminescent bacteria, *Photobacterium phosphoreum*, based on their quantitative structure-activity relationship models [Text] / L. Jiang, Z. Lin, X. Hu, D. Yin // Bull Environ Contam Toxicol. – 2010. – V. 85(6). – P. 550–555.

160. Jimenez-Esquilin, A. E. Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude Sagebrush Rhizosphere [Text] / A. E. Jimenez-Esquilin, T. M. Roane // J. Ind. Micro-biol. Biotechnol. – 2005. – Vol. 32. – P. 378–381.

161. Jorgensen, H. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices [Text] / H. Jorgensen, M. J. Ferraro // Clin. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 49. – P. 1749–1755.

162. Kadia, A. A. Synthesis, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of novel 2-(1-adamantyl)-5-substituted-1,3,4-oxadiazoles and 2-(1-adamantylamino)-5-substituted-1,3,4-thiadiazoles [Text] / A. A. Kadia, N. R. El-Brollosya, O. A. Al-Deeba [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2007. – Vol. 42(2). – P. 235–242.

163. Kaiser, K. L. E. Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms [Text] / K. L. E. Kaiser // Environ Health Perspect. – 1998. – Vol. 106(2). – P. 583–591.

164. Kakizaki, E. Bioluminescent bacteria have potential as a marker of drowning in seawater: Two immersed cadavers retrieved near estuaries [Text] / E. Kakizaki, S. Kozawa, M. Sakai, N. Yukawa // Legal Medicine. – 2009. – Vol. 11. – P. 91–96.

165. Katsev, A. M. Study of the influence of some surface-active substances on bioluminescence intensity of luminous bacteria [Text] / A. M. Katsev, N. F. Starodub // Palladin Institute of Biochemistry. – 2003. – Vol. 75, No. 2. – P. 94–98.

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

167. Khadikar, P. V. Study on quantitative structure-toxicity relationships of benzene derivatives acting by narcosis [Text] / P. V. Khadikar, K. C. Mather, S. Singh et al. // *Bioorg Med Chem.* – 2002. – V. 10(6). – P. 1761–1766.
168. Kim, Y. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea [Text] / Y. Kim, K. Choi, J. Jung et al. // *Environ Int.* – 2007. – V. 33(3). – P. 370–375.
169. Kirk, K. L. Fluorine in medicinal chemistry: Recent therapeutic applications of fluorinated small molecules [Text] / K. L. Kirk // *Journal of Fluorine Chemistry.* – 2006. – Vol. 127. – P. 1013–1029.
170. Klepser, M. E. Influence of test conditions on an-tifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods [Text] / M. E. Klepser, E. J. Ernst, R. E. Lewis, M. E. Ernst, M. A. Pfaller // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1998. – Vol. 42. – P. 1207–1212.
171. Klopman, G. Multiple computer-automated structure evaluation study of aquatic toxicity II. *Fathead minnow* [Text] / G. Klopman, R. Saiakhov, H. S. Rosenkranz // *Environ Toxicol Chem.* – 2000. – V. 19(2). – P. 441–447.
172. Klopman, G. Multiple computerautomated structure evaluation program study of aquatic toxicity 1: *Guppy* [Text] / G. Klopman, R. Saiakhov, H. S. Rosenkranz, J. L. M. Hermens // *Environ Toxicol Chem.* – 1999. – V. 18(11). – P. 2497–2505.
173. Klopman, G. Multiple computer-automated structure evaluation study of aquatic toxicity. III. *Vibrio fischeri* [Text] / G. Klopman, S. E. Stuart // *Environ Toxicol Chem.* – 2003. – V. 22(3). – P. 466–472.
174. Kobatake, E. Biosensing of benzene derivatives in the environment by luminescent *Escherichia coli* [Text] / E. Kobatake, T. Niimi, T. Haruyama, Y. Ikariyama, M. Aizawa // *Biosens. Bioelectron* – 1995. – Vol. 10. – P. 601–605.
175. Kolocouris, N. Synthesis and antiviral activity evaluation of some aminoadamantane derivatives [Text] / N. Kolocouris, G. B. Foscolos, A. Kolocouris [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 1994. – Vol. 37(18). – P. 2896–2902.

176. Kolocouris, N. Synthesis and antiviral activity evaluation of some new aminoadamantane derivatives [Text] / N. Kolocouris, A. Kolocouris, G. B. Foscolos [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 1996. – Vol. 39(17). – P. 3307–3318.

177. Konate, K. Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistants *Staphylococcus aureus*: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination [Text] / K. Konate, J. F. Mavoungou, A. N. Lepengue [et al.] // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. – 2012. – Vol. 11. – P. 18.

178. Kovalenko, S. I. Substituted 2-[(2-Oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetamides with thiazole and thiadiazole fragments: Synthesis, physicochemical properties, cytotoxicity, and anticancer activity [Text] / S. I. Kovalenko, I. S. Nosulenko, A. Y. Voskoboynik [et al.] // Scientia Pharmaceutica. – 2012. – Vol. 80, No. 4. – P. 837 – 865.

179. Kricka, L. J. Clinical and biochemical applications of luciferases and luciferins [Text] / L. J. Kricka // Anal Biochem. – 1988. – Vol. 175. – P. 14–21

180. Kuhn, D. M. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism [Text] / D. M. Kuhn, M. Balkis, J. Chandra, P. K. Mukherjee, M. A. Ghannoum // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 506–508.

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

182. Kurvet, I. LuxCDABE—Transformed Constitutively Bioluminescent *Escherichia coli* for Toxicity Screening: Comparison with Naturally Luminous *Vibrio fischeri* [Text] / I. Kurvet, A. Ivask, O. Bondarenko, M. Sihtmäe, A. Kahru // Sensors (Basel). – 2011. – V. 11. №. 8. – P. 7865 – 7878

183. Labella, A. M. Description of new and amended clades of the genus *Photobacterium* [Text] / A. M. Labella, M. D. Castro, M. Manchado, J. J. Borrego // Microorganisms. – 2018. – Vol. 6(1). – P. 24.

184. Lappalainen, J. A new flash method for measuring the toxicity of solid and colored samples [Text] / J. Lappalainen, R. Juvonen, M. Karp. // Chemosphere. – 1999. – Vol. 38. – P. 1069–1083,

185. Lappalainen, J. Automated color correction method for *Vibrio fischeri* toxicity test. Comparison of standard and kinetic assays [Text] / J. Lappalainen, R. Juvonen, J. Nurmi, M. Karp. // Chemosphere. – 2001. – Vol. 45. – P. 635–641
186. Liang, H. Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae) [Text] / H. Liang, Y. Xing, J. Chen, [et al.] // BMC Complement. Altern. Med. – 2012. – Vol. 12. – P. 238.
187. Lima, T. M. S. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms [Text] / T. M. S. Lima, L. C. Procópio, F. D. Brandao [et al.] // Biores. Technol. – 2011. – Vol. 102. – P. 2957–2964.
188. Lin, Z. Quantification of joint effect for hydrogen bond and development of QSARs for predicting mixture toxicity [Text] / Z. Lin, P. Zhong, K. Yin, L. Wang, H. Yu // Chemosphere. – 2003. – V. 52(7). – P. 1199–1208.
189. Long, S. Toxicity of tetracycline and its transformation products to a phosphorus removing *Shewanella* strain [Text] / S. Long, Y. Yang, S. G. Pavlostathis [et al.] // Chemosphere. – 2019. – Vol. 246. – P. 125681.
190. Loureiro, D. R. P. Structures, activities and drug-likeness of anti-infective xanthone derivatives isolated from the marine environment: A Review [Text] / D. R. P. Loureiro, J. X. Soares, J. C. Costa [et al.] // Molecules. – 2019. – Vol. 24(2):243 – P. 1–23.
191. Luis, P. A novel group contribution method in the development of a QSAR for predicting the toxicity (*Vibrio fischeri* EC₅₀) of ionic liquids [Text] / P. Luis, I. Ortiz, R. Aldaco, A. Irabien // Ecotoxicol Environ Saf. – 2007. – V. 67(3). – P. 423–429.
192. Maestro, B. Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines [Text] / B. Maestro, A. González, P. García, J. M. Sanz // FEBS J. – 2007. – Vol. 274 (2). – P. 364–376.
193. Magaldi, S. Well diffusion for antifungal susceptibility testing [Text] / Magaldi, S., S. Mata-Essayag, C. Hartung de Capriles [et al.] // Int. J. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 8. – P. 39–45.

194. Maier, L. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria [Text] / Maier, L. M. Pruteanu, M. Kuhn [et al.] // Nature. –2018. –Vol. 555. – P. 623–628
195. Main, C. R. Community-level and species-specific associations between Phytoplankton and Particle-associated *Vibrio* species in delaware's inland bays [Text] / C. R. Main, L. R. Salvitti, E. B. Whereat, K. J. Coyne. // Appl. Environ Microbiol. – 2015. – Vol. 81(17). – P. 5703–5713.
196. Marincs, F. On-line monitoring of growth of *Escherichia coli* in batch cultures by bioluminescence [Text] / F. Marincs // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – Vol. 53. – P.536–541.
197. Marston, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry [Text] / A. Marston // J. Chromatogr. – 2011. – Vol. 19 № 1218. – P. 2676–2683.
198. Mehrabani, M. Evaluation of anti-fungal activities of *Myrtus communis* L. by bioautography method [Text] / M. Mehrabani, A. Kazemi, S. A. Ayatollahi Mousavi, [et al.] // Jundishapur J. Microbiol. – 2013. – Vol. 6. – P. 1–7.
199. Meighen, E. A. Genetics of bacterial bioluminescence [Text] / E. A. Meighen // Annu. Rev. Genet. – 1994. – Vol. 28. – P. 117–139.
200. Melagraki, G. A novel RBF neural network training methodology to predict toxicity to *Vibrio fischeri* [Text] / G. Melagraki, A. Afantitis, H. Sarimveis, O. Igglessi-Markopoulou, A. Alexandridis // Mol Diersity. – 2006. – V. 10(2). – P. 213–221.
201. Meletiadis, J. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media [Text] / J. Meletiadis, J. F. G. M. Meis, J. W. Mouton, P. E. Verweij // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39. – P. 478–484.
202. Mogilnaya, O. A. Growth and bioluminescence of luminous bacteria under the action of Aflatoxin B1 before and after its treatment with nanodiamonds [Text] / O. A. Mogilnaya, A. P. Puzyr, V. S. Bondar. // Appl. Biochem. Microbiol. – 2010. – Vol. 46. – P. 33–37. ,
203. Monteiro, M. C. A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin

[Text] / M. C. Monteiro, M. de la Cruz, J. Cantizani [et al.] // J. Biomol. Screen. – 2012. – Vol. 17. – P. 524–529.

204. Moustafa, A. El-N. In vitro antibacterial activity of some antihistaminics belonging to different groups against multi-drug resistant clinical isolates [Text] / A. El-N. Moustafa, M. A-S. Hamida, M. K. Amal, G. O. Hoda, M. El-H. Omar // Braz J Microbiol. – 2011. – V. 42(3). – P. 980–991.

205. Müller, K. Fluorine in pharmaceuticals: Looking beyond intuition [Text] / K. Müller, Ch. Faeh, F. Diederich // Science. – 2007. – Vol. 317. – P. 1881–1885.

206. Neale, P. A. Applying a mixture toxicity modulating to predict bacterial bioluminescence inhibition by non-specifically acting pharmaceuticals and specifically acting antibiotics [Text] / P. A. Neale, F. D. L. Leusch, B. I. Escher, // Chemosphere. – 2017. – Vol. 173. – P. 387–394.

207. Nijs, A. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical micro-biology laboratory [Text] / A. Nijs, R. Cartuyvels, A. Mewis [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 3627–3630

208. Nosulenko, I. S. [(9-R₁-10-R₂-3-R₃-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetamides derivatives with the fragments of carcass amines / I. S. Nosulenko, O. YU. Voskoboynik, G. G. Berest [et al.] // Журналорганічноїтафармацевтичноїхімії. – 2014. – Т. 12, № 1(45). – С. 17–27

209. Nosulenko, I. S. Synthesis 3-R-8-R₁-9-R₂-10-R₃-R-6-thioxo-6,7-dihydro-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-2-ones, its antibacterial and antifungal activity [Text] / I. S. Nosulenko, O. Yu. Voskoboynik, G. G. Berest [et al.] // Sci Pharm. – 2014. – Vol. 82. – P. 483–500.

210. Nosulenko, I. S. Synthesis and antimicrobial activity of 6-Thioxo-6,7-dihydro-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]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.

211. Nosulenko, I. S. Synthesis and antiviral activity [9-R₁-10-R₂-3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-6-yl)thio]acetamides derivatives with the fragments of carcass amines [Text] / I. S. Nosulenko, O. Yu. Voskoboynik, G. G. Berest

[et al.] // Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry. – 2014. – Vol. 12(45). – P. 17–27.

212. Nuria, A. Rapid measurement of anti-tuberculosis drug activity in vitro and in macrophages using bioluminescence [Text] / A. Nuria, T. Fletcher, N. Krishnan, S. Wiles, B. D. Robertson // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – Vol. 67. – P. 404–414.

213. Oliveira, A. G. Circadian control sheds light on fungal bioluminescence [Text] / A. G. Oliveira, C. V. Stevani, H. E. Waldenmaier [et al.] // Curr Biol. – 2015. – Vol. 25(7). – P. 964–968.

214. Ouedrhiri, W. Chemical composition of *Citrus aurantium* L. Leaves and zest essential oils, their antioxidant, antibacterial single and combined effects [Text] / W. Ouedrhiri, S. Bouhdid, M. Balouiri [et al.] // J. Chem. Pharm. Res. – 2015. – Vol. 7. – P. 78–84.

215. Overview of Adverse Drug Reactions [Электронный ресурс] // Режимдоступа: <https://www.merckmanuals.com/en-ca/home/drugs/adverse-drug-reactions/overview-of-adverse-drug-reactions> (дата обращения 9. 03. 2019).

216. Özçelik, B. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids [Text] / B. Özçelik, M. Kartal, I. Orhan // Pharm Biol. – 2011. – Vol. 49 (4). – P. 396–402.

217. Padrtova, R. R. Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of an optimal test battery [Text] / R. R. Padrtova, R. Marsalek, I. Holoubek. // Chemosphere. – 1998. – Vol. 37. – P. 495–507,

218. Paloque, L. A new, rapid and sensitive bioluminescence assay for drug screening on *Leishmania* [Text] / L. Paloque, N. Vidal, M. Casanova [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 2013. – Vol. 95. – P. 320–323.

219. Panchaud, P. Discovery and optimization of isoquinoline ethyl ureas as antibacterial agents [Text] / P. Panchaud, T. Bruyère, A. C. Blumstein [et al.] // J Med Chem. – 2017. – Vol. 60 (9). – P. 3755–3775

220. Paparella, A. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes* [Text] / A. Paparella, L. Taccogna, I. Aguzzi, [et al.] // Food Control. – 2008. – Vol. 19. – P. 1174–1182.

221. Parsajoo, C. Biosensors for drug testing and discovery [Text] / C. Parsajoo, J.-m. Kauffmann, M. Elkaoutit // Woodhead Publishing Series in Biomaterials. – 2012. №. 45. Chapter 9. – P. 233–263
222. Pattabiraman, V. R. Rethinking amide bond synthesis [Text] / V. R. Pattabiraman, J. W. Bode // Nature. – 2011. – Vol. 480. – P. 471–479.
223. Peitzsch, N. *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor [Text] / N. Peitzsch, G. Eberz, D. H. Nies // Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – V. 64. – P. 453–458.
224. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard – 9th edition [Text] / P. A. Wayne // Clinical and Laboratory Standards Institute. – 2006. – CLSI M2–A9, 26 p.
225. Pfaller, M. A. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization [Text] / M. A. Pfaller, D. J. Sheehan, J. H. Rex // Clin. Microbiol. Rev. – 2004. – Vol. 17. – P. 268–280.
226. Photobiological sciences online bioluminescence. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.photobiology.info> (дата обращения 10. 07. 2019).
227. Pinto, P. C. A. G. Automated high throughput *Vibrio fischeri* assay for (eco) toxicity screening: applications to ionic liquids [Text] / P. C. A. G. Pinto, S. P. F. Costa, J. L. F. C. Lima, M. L. M. F. S. Saraiva, // Ecotoxicol. Environ. Safety. – 2012. – Vol. 80. – P. 97–102
228. Preston, S. Biosensing the acute toxicity of metal interactions: Are they additive, synergistic, or antagonistic? [Text] / S. Preston, N. Coad, J. Townend, K. Killham, G. I. Paton // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2000. – Vol. 19(3). – P. 775 – 780
229. Qin, W. C. Toxicity of organic pollutants to seven aquatic organisms: effect of polarity and ionization [Text] / W. C. Qin, L. M. Su, X. J. Zhang et al. // SAR QSAR Environ Res. – 2010. – V. 21(5–6). – P. 389–401.

230. Ramanathan, S. Bacterial biosensors for monitoring toxic metals [Text] / S. Ramanathan, M. Ensor, S. Daunert // Trends Biotechnol. – 1997. – Vol. 15. – P. 500–506.
231. Ramani, R. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test [Text] / R. Ramani, V. Chaturvedi // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – Vol. 44. – P. 2752–2758.
232. Ramani, R. Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans* [Text] / R. Ramani, A. Ramani, S. J. Wong, // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 35. – P. 2320–2324.
233. Ravindran, J. Bacterial bioluminescence response to long-term exposure to reverse osmosis treated effluents from dye industries [Text] / J. Ravindran, B. Manikandan, P. V. Shirodkar [et al.] // J. Microbiol. – 2014. – Vol. 60. – P. 661–668
234. Reis, R. S. Comparison of flow cytometric and alamar blue tests with the proportional method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Rifampin and Isoniazid [Text] / R. S. Reis, I. N., Jr., S. L. S. Lourenço, L. S. Fonseca, M. C. S. Lourenço // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 2247–2248.
235. Ren, S. Estimating the toxicities of organic chemicals to bioluminescent bacteria and activated sludge [Text] / S. Ren, P. D. Frymier // Water Research. – 2002. – V. 36(17). – P. 4406–4414.
236. Ren, S. Toxicity of metals and organic chemicals evaluated with bioluminescence assays [Text] / S. Ren, P. D. Frymier // Chemosphere. – 2005. – Vol. 58. – P. 543–550
237. Ringwood, A. H. Interpretation of Microtox solid-phase toxicity tests: the effects of sediment composition [Text] / A. H. Ringwood, M. E. Delorenzo, P. E. Ross, A. F. Holland. // Environ. Toxicol. Chem. – 1997. – Vol. 16. – P. 1135–1140
238. Ripp, S. Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control [Text] / S. Ripp, D. E. Nivens, Y. Ahn [et al.] // Environ. Sci. Technol. – 2000. – Vol. 34 (5). – P. 846–853

239. Roda, A. Peer reviewed: analytical bioluminescence and chemiluminescence [Text] / A. Roda, M. Guardigli, E. Mishelini [et al.] // Anal. Chem. – 2003. – Vol. 75, No. 25. – P. 462–470.

240. Roda, A. Use of thermostable luminescent bacteria as a rapid cytotoxicity test. In: Bioluminescence and Chemiluminescence. Fundamentals and applied aspects (A. Campbell, L. J. Kricka, P. E. Stanley 1265 Eds) / A. Roda, C. Polimeni, T. Maugeri [et al.] // Wiley & Sons, Chichester, UK. – 1994. – P. 160–163.

241. Rodriguez-Tudela, J. L. Interlaboratory evaluation of hemacytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi [Text] / J. L. Rodriguez-Tudela, E. Chryssanthou, E. Petrikkou [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 5236–5237.

242. Rupani, S. P. Characterization of the stress response of a bioluminescent biological sensor in batch and continuous [Text] / S. P. Rupani, M. B. Gu, K. B. Konstantinov [et al.] // Cultures biotechnology progress. – 1996. – Vol. 12, Issue3. – P. 387–392.

243. Sahin, D. Design and synthesis of new 1,2,4-triazole derivatives containing morpholine moiety as antimicrobial agents [Text] / D. Sahin, H. Bayrak, A. Demirbas [et al.] // Turk. J. Chem. – 2012. – Vol. 36. – P. 411–426.

244. Scheper, T-H. Fermentation monitoring and process control [Text] / T-H. Scheper, F. Lammers // Curr Opin Biotechnol. – 1994. – Vol. 5. – P. 187–191

245. Sergeieva, T. Yu. Hydrazinolysis of 3- $\hat{R}$ [1,2,4]triazino[2,3-c]quinazolin-2-ones. Synthetic and theoretical aspects [Text] / T. Yu. Sergeieva, O. Yu. Voskoboynik, S. I. Okovytyy [et al.] // J. Phys. Chem. A. – 2014. – Vol. 118. – P. 1895–1905;

246. Shahat, A. A. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from the seeds of *Enterolobium contortisiliquum* (leguminosae) [Text] / Shahat, A. A, G. El-Barouty, R. A. Hassan [et al.] // J. Environ. Sci. Health. – 2008. – Vol. 43. Is. 6. – P. 519–525

247. 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.

248. Stevens, M. F. G. Triazines and related products. Part I. 1,3-di-Ocyanophenyltriazene [Text] / M. F. G. Stevens // J. Chem. Soc. C. – 1967. – P. 1096–1098.

249. Stuard, S. B. Relevance and application of read-across – Mini review of European Consensus Platform for alternatives and Scandinavian society for cell toxicology 2017 Workshop Session [Text] / S. B. Stuard, T. Heinonen // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. – 2018. – Vol. 123 (5S). – P. 37–41.

250. Suleimana, M. M. Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species [Text] / M. M. Suleimana, L. J. McGaw, V. Naidoo, J. N. Eloff // Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. – 2010. – Vol. 7. – P. 64–78.

251. Svena, M. J. Local Anesthetics as Antimicrobial Agents: A Review [Text] / M. J. Svena, E. S. J. Barbara, P. D. Alan // Surgical Infections. – 2008. – V. 9(2). – P. 205–13

252. Tanet, L. Bacterial bioluminescence: light emission in *Photobacterium phosphoreum* is not under quorum-sensing control [Text] / L. Tanet, C. Tamburini, C. Baumas [et al.] // Biology. Medicine. Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – P. 365.

253. Tang, Y. W. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology, 2nd ed [Text] / Y. W. Tang, C. W. Stratton // Springer, New York Heidelberg Dordrecht, London, 2013. – pp. 937.

254. Tauriainen, S. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead [Text] / S. Tauriainen, M. Karp, W. Chang, M. Virta // Biosensors and Bioelectronics. – 1998. – Vol. 13. – P. 931–938.

255. Theuretzbacher, U. Global antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens and clinical need [Text] / U. Theuretzbacher // Current Opinion in Microbiology. – 2017. – Vol. 39. – P. 106–112

256. Tulgar, S. The antimicrobial activity of ephedrine and admixture of ephedrine and propofol: an in vitro study [Text] / S. Tulgar, E. A. Alasehir, O. Selvi // Rev. Bras. Anesthesiol. – 2018. – Vol. 68, No. 1 – P. 69–74
257. Ukrainets, I. V. 4-Hydroxy-2-quinolones. Synthesis and antitubercular activity of N-R-amides of 4-hydroxy-6-methyl-2-oxo-1-propyl-1,2,5,6,7,8-hexahydro-quinoline-3-carboxylic acid [Text] / I. V. Ukrainets, E. V. Kolesnik, L. V. Sidorenko [et al.] // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2007. – Vol. 43(3). – P. 326–333.
258. Unge, A. Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual gfp-lux AB marker system [Text] / A. Unge, R. Tombolini, L. Molbak, J. K. Jansson // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65. – P. 813–821
259. Valgas, C. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products [Text] / C. Valgas, S. Machado de Souza, E. F. A. Smania, A. Smania Jr. // Braz. J. Microbiol. – 2007. – Vol. 38. – P. 369–380.
260. Van Dyk, T. K. Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions [Text] / T. K. Van Dyk, W. R. Majarian, K. B. Konstantinov [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60. – P. 1414–1420
261. Vesterlund, S. Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances [Text] / S. Vesterlund, J. Palta, A. Lauková, M. Karp, A. C. Ouwehand // J Microbiol Methods. – 2004. – Vol. 57 (1). – P. 23–31.
262. Vighi, M. Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). I: QSAR equation for narcotics and polar narcotics [Text] / M. Vighi, S. Migliorati, G. S. Monti (2009) // Ecotoxicol Environ Saf. – 2009. – Vol. 72(1). – P. 154–161.
263. Vojtek, L. Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph [Text] / L. Vojtek, P. Dobes, E. Buyukguzel, J. Atosuo, Pavel Hyrsil // Eur. J. Entomol. – 2014. – Vol. 111. – P. 335–340.
264. Voskoboynik, A. Yu. Synthesis of 6-R-3-(2-aminophenyl)-4H-[1,2,4]thiazin-5-ones: resources and limitations [Text] / A. Yu. Voskoboynik, G. G.

Berest, D. Yu. Skorina [et al.] // *Chemistry & Chemical Technology*. – 2011. – Vol. 5(2). – P. 129–132.

265. White, R. L. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test [Text] / R. L. White, D. S. Burgess, M. Manduru, J. A. Bosso // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1996. – Vol. 40. – P. 1914–1918.

266. Zarubin, M. Bacterial bioluminescence as a lure for marine zooplankton and fish [Text] / M. Zarubin, S. Belkin, M. Ionescu, A. Genin // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2012. – Vol. 09, No. 3. – P. 853–857.

267. Zou, X. A. docking-based receptor library of antibiotics and its novel application in predicting chronic mixture toxicity for environmental risk assessment [Text] / X. Zou, X. Zhou, Z. Lin, Z. Deng, D. Yin // *Environ Monit Assess.* – 2013. – Vol. 185(6). – P. 4513–4527.

167
ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1.

Морфо-культуральные свойства выделенных светящихся микроорганизмов

Морфо-культуральная характеристика/культура микроорганизмов	Sh1	M1	Fsh	F1	M3
по величине	Средние	Средние	Средние	Средние	Крупные
по форме	Круглые	Круглые	Круглые	Круглые	Круглые
по цвету, зависящему от пигмента	Белые	Белые	Белые	Желтые	Белые
по консистенции	Слизистые	Слизистые	Слизистые	Слизистые, пигментированные	Слизистые
по поверхности	Гладкие, выпуклые	Гладкие, выпуклые	Гладкие, выпуклые	Гладкие, выпуклые	Гладкие, выпуклые
по краю	С ровным краем	С ровным краем	С ровным краем	С ровным краем	С ровным краем
по структуре	Аморфная структура	Аморфная структура	Аморфная структура	Аморфная структура	Аморфная структура
Вид помутнения	Пленка на поверхности среды	Диффузное помутнение	Диффузное помутнение	Пленка на поверхности среды	Пристеночный рост
Цвет клеток после окраски по Граму	розовая	розовая	розовая	розовая	розовая
Рост/свечение при "+4" градуса по Цельсию	"-/-"	"-/-"	"-/-"	"-/-"	"-/-"
Рост/свечение при "+20" градуса по Цельсию	"+/+"	"+/+"	"+/+"	"+/+"	"+/+"

Продолжение приложения 1.					
Рост/свечение при "+35" градуса по Цельсию	"+/+"	"+/+"	"+/+"	"+/+"	"+/+"
Рост/свечение при "+37" градуса по Цельсию	"+/+"	"+/+"	"+/+"	"+/+"	"+/+"
Наличие желтого пигмента	нет	нет	есть	есть	нет
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 I, 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	$3,87 \times 10^{-3}$	$1,27 \times 10^{-3}$	$4,09 \times 10^{-3}$	$5,20 \times 10^{-4}$	$2,39 \times 10^{-4}$

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

Акты о внедрении результатов диссертационного исследования



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУН «НБС–ННЦ»

д-р с.-х. наук, чл.-корр. РАН

Ю.В. Плугатарь

06 2021 г.

АКТ

внедрения результатов диссертационной работы С.Л. Сафронюка «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биоломинесцентных бактериальных тест-объектов», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН» в Научно-исследовательскую работу

Результаты диссертационной работы «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биоломинесцентных бактериальных тест-объектов» Сафронюка Сергея Леонидовича были использованы для оценки антибактериальной активности экстрактов ароматических и лекарственных растений из коллекции Никитского ботанического сада (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН» (298648, Российская Федерация, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита, спуск Никитский, 52, тел. +8(3654)250-530, e-mail: priemnaya-nbs-nnc@yandex.ru) с использованием методики оценки острого и хронического действия экстрактов на природные морские биоломинесцентные бактерии и методики оценки механизмов антибактериальной активности веществ с использованием рекомбинантных lux-биосенсоров.

Зав. лаборатории ароматических
и лекарственных растений
главный науч. сотр., д-р биол. наук

О.М. Шевчук

Ведущий научный сотрудник
лаборатории ароматических
и лекарственных растений канд. биол. наук

Н. В. Марко

Зав. сектором стандартизации,
канд. с.-х. наук

Н.Н. Бакова

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
АО "Алуштинский

эфиромасличный совхоз-завод",
к. с.-х. наук Новосад А.С.



2024 г.

АКТ

внедрения результатов диссертационной работы С.Л. Сафронюка «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия в АО "Алуштинский эфиромасличный совхоз-завод" в Научно-исследовательскую работу

Результаты диссертационной работы «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов» Сафронюка Сергея Леонидовича были использованы для оценки антибактериальной активности гидролатов ароматических и лекарственных растений АО "Алуштинский эфиромасличный совхоз-завод" (298500, Российская Федерация, Республика Крым, город Алушта, улица 15 апреля, дом 37, тел. +7(036560)5-86-95, e-mail: aromaoil@aemsz.ru) с использованием методики оценки 15 минутного и 18 часового действия гидролатов на природные морские биолюминесцентные бактерии и методики оценки механизмов антибактериальной активности веществ с использованием рекомбинантных lux-биосенсоров.

Начальник лаборатории, к.фарм.наук

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to E.V. Burceva.

Е.В. Бурцева



Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени В.И.Вернадского»
(ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И.Вернадского»)
ИНСТИТУТ «МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
имени С.И.Георгиевского»

бульвар Ленина, 5/7,
г. Симферополь, 295051
Тел.: +7(3652) 554-854; факс: 27-15-47
E-mail: office@ma.cfuv.ru
http://www.ma.cfuv.ru/

УТВЕРЖДАЮ

Директор Института
«Медицинской академии
им. С. И. Георгиевского»

ФГАОУ ВО
«КФУ им. В.И.Вернадского»
проф. С. И. Крутиков



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Название предложения для внедрения:** результаты диссертационной работы Сафронюка С. Л. «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

2. **Учреждение, в котором проводится разработка, адрес, фамилия, отчество авторов:** Институт «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», кафедра медицинской и фармацевтической химии – заведующий кафедрой, д.б.н. Кацев А. М., ст. преподаватель Сафронюк С.Л. (г. Симферополь, Бульвар Ленина 5/7).

3. Источники информации:

1. Диссертационная работа Сафронюка С. Л. «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов»;

2. Сафронюк, С. Л. Применимость рекомбинантных lux-биосенсоров для выявления некоторых механизмов антибактериальной активности направленно синтезированных производных 2-((2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-С]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 биолюминесцентных 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. Биолюминесцентный 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.

4. **Базовое учреждение, в котором проводилось внедрение:** кафедра медицинской и фармацевтической химии Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» протокол № 6 от 30.08.2021 г

6. Результаты внедрения: использование предлагаемых материалов в научно-исследовательской деятельности, полученные в рамках диссертационного исследования, являются основой для создания новых методов анализа фармацевтических субстанций и их препаратов, а также вновь синтезируемых веществ органической природы, основанных на измерении биолюминесценции.

7. Сроки внедрения: 2021 гг.

8. Замечания и предложения организации, в которой проводилось внедрение: существенных замечаний нет.

9. Ответственный за внедрение: заведующий кафедрой медицинской и фармацевтической химии Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», д.б.н., профессор, Кацев А. М.

01.09.2021

дата



подпись



Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени В.И.Вернадского»
(ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И.Вернадского»)
ИНСТИТУТ «МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
имени С.И.Георгиевского»

бульвар Ленина, 5/7,
г. Симферополь, 295051
Тел.: +7(3652) 554-854; факс: 27-15-47
E-mail: office@ma.cfuv.ru
http://www.ma.cfuv.ru/

УТВЕРЖДАЮ

Директор Института
«Медицинской академии
им. С. И. Георгиевского»

ФГАОУ ВО
«КФУ им. В. И. Вернадского»
Медицинская академия имени
С. И. Георгиевского
«02.08.2021 г.»



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Название предложения для внедрения:** результаты диссертационной работы Сафронюка С. Л. «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

2. **Учреждение, в котором проводится разработка, адрес, фамилия, отчество авторов:** Институт «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», кафедра медицинской и фармацевтической химии – заведующий кафедрой, д.б.н. Кацев А. М., ст. преподаватель Сафронюк С.Л. (г. Симферополь, Бульвар Ленина 5/7).

3. Источники информации:

1. Диссертационная работа Сафронюка С. Л. «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов»;

2. Сафронюк, С. Л. Применимость рекомбинантных lux-биосенсоров для выявления некоторых механизмов антибактериальной активности направленно синтезированных производных 2-((2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-С]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 биолюминесцентных 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. **Базовое учреждение, в котором проводилось внедрение:** кафедра медицинской и фармацевтической химии Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» протокол № 6 от 30.08.2021 г.

5. **Включено:** в научно-исследовательскую деятельность кафедры медицинской и фармацевтической химии в рамках реализуемого в рамках проекта И/2018/16 программы развития ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» посвященному использованию биолюминесцентного метода анализа биологического действия веществ органической природы для выявления неспецифической и специфической антимикробной активности.

5. Включено: в лекционный курс и практические занятия проектной деятельности «Медицинская химия» для 10-х классов в Муниципальном бюджетном общеобразовательном учреждении «Школа-гимназия №10 им. Э. К. Покровского» и Муниципальном бюджетном общеобразовательном учреждении «Гимназия №11 им. К. А. Тренева» муниципального образования городской округ Симферополь Республики Крым, посвященному использованию биolumинесцентного метода анализа в фармацевтических исследованиях, анализу неспецифической и специфической антибактериальной активности фармацевтических субстанций в отношении бактериальной клетки посредством измерения интенсивности свечения биolumинесцентных бактерий и биотестированию направленно-синтезированных органических соединений.

6. Результаты внедрения: использование предлагаемых материалов в учебном процессе позволяет углубить знания в фармацевтической химии как науке, овладеть фармацевтическими и биологическими методами оценки качества фармацевтических субстанций.

7. Сроки внедрения: 2021 гг.

8. Замечания и предложения организации, в которой проводилось внедрение: существенных замечаний нет.

9. Ответственный за внедрение: заведующий кафедрой медицинской и фармацевтической химии Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», д.б.н., профессор, Кацев А. М.

01.09.2021
дата


подпись



Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
**«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени В.И.Вернадского»**
(ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И.Вернадского»)
**ИНСТИТУТ «МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
имени С.И.Георгиевского»**
бульвар Ленина, 5/7,
г. Симферополь, 295051
Тел.: +7(3652) 554-854; факс: 27-15-47
E-mail: office@ma.cfuv.ru
http://www.ma.cfuv.ru/

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института
«Медицинской академии
им. С. И. Георгиевского»
ФГАОУ ВО
«КФУ им. В. И. Вернадского»
проф. Е. С. Крутиков
18.08.2021 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Название предложения для внедрения:** результаты диссертационной работы Сафронюка С. Л. «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биоломинесцентных бактериальных тест-объектов», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

2. **Учреждение, в котором проводится разработка, адрес, фамилия, отчество авторов:** Институт «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», кафедра медицинской и фармацевтической химии – ст. преподаватель Сафронюк С.Л. (г. Симферополь, Бульвар Ленина 5/7).

3. Источники информации:

1. Диссертационная работа Сафронюка С. Л. на тему «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биоломинесцентных бактериальных тест-объектов»;

2. Сафронюк, С. Л. Применимость рекомбинантных lux-биосенсоров для выявления некоторых механизмов антибактериальной активности направленно синтезированных производных 2-((2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-С]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 биоломинесцентных 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. **Базовое учреждение, в котором проводилось внедрение:** Центральная научно-исследовательская лаборатория Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» протокол № 08 от «26» августа 2021 г.

5. **Включено:** в научно-исследовательскую деятельность Центральной научно-исследовательской лаборатории посвященные использованию биоломинесцентного метода анализа в медико-биологических и фармацевтических исследованиях, направленных на анализ неспецифической и специфической антимикробной активности фармацевтических субстанций и веществ органической природы.

6. **Результаты внедрения:** использование предлагаемых материалов в научно-исследовательской деятельности, полученных в рамках диссертационного исследования результаты Сафронюк С.Л., являются основой для разработки методов, направленных на оценку неспецифического и специфического антимикробного действия фармацевтических субстанций и лекарственных средств, основанных на измерении биолюминесценции бактерий.

7. **Сроки внедрения:** 2021 гг.

8. **Замечания и предложения организации, в которой проводилось внедрение:** существенных замечаний нет.

9. **Ответственный за внедрение:** заведующая кафедрой базисной и клинической фармакологии Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», д. м. н., профессор, Фомочкина И. И.

06.09.2021
дата


подпись



Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени В.И.Вернадского»
(ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И.Вернадского»)
ИНСТИТУТ «МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
имени С.И.Георгиевского»

бульвар Ленина, 5/7,
г. Симферополь, 295051
Тел.: +7(3652) 554-854; факс: 27-15-47
E-mail: office@ma.cfuv.ru
http://www.ma.cfuv.ru/

УТВЕРЖДАЮ

Директор Института
«Медицинской академии
им. С. И. Георгиевского»

ФГАОУ ВО

«КФУ им. В. И. Вернадского»

проф. Е. С. Крутиков

2021 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Название предложения для внедрения:** результаты диссертационной работы Сафронюка С. Л. «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

2. **Учреждение, в котором проводится разработка, адрес, фамилия, отчество авторов:** Институт «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», кафедра медицинской и фармацевтической химии – заведующий кафедрой, д.б.н. Кацев А. М., ст. преподаватель Сафронюк С.Л. (г. Симферополь, Бульвар Ленина 5/7).

3. Источники информации:

1. Диссертационная работа Сафронюка С. Л. на тему «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов»;

2. Сафронюк, С. Л. Применимость рекомбинантных lux-биосенсоров для выявления некоторых механизмов антибактериальной активности направленно синтезированных производных 2-((2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-С]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 биолюминесцентных 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. **Базовое учреждение, в котором проводилось внедрение:** кафедра базисной и клинической фармакологии Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» протокол № 4 от 24.08.2021г.

5. **Включено:** в научно-исследовательскую деятельность кафедры базисной и клинической фармакологии, посвящённые использованию биолюминесцентного метода анализа лекарственных препаратов, направленного на анализ неспецифической и специфической антимикробной активности с применением светящихся бактерий акваторий Азовского и Черного морей.

6. Результаты внедрения: использование предлагаемых материалов в научно-исследовательской деятельности, полученных в рамках диссертационного исследования результаты Сафронюк С.Л., являются основой для создания новых методов анализа фармацевтических субстанций и веществ органической природы, основанных на измерении биолюминесценции.

7. Сроки внедрения: 2021 гг.

8. Замечания и предложения организации, в которой проводилось внедрение: существенных замечаний нет.

9. Ответственный за внедрение: заведующая ЦНИЛ Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», д. м. н., в. н. с., Зяблицкая Е. Ю.

06.09.21

дата


подпись

Патент на изобретение «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 противірусної дії щодо штамів Influenza Virus типів А та В».



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 111855

(13) C2

(51) МПК

A61K 31/53 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2014 03565	(73) Власник(и):
(22) Дата подання заявки: 07.04.2014	ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 24.06.2016	УНІВЕРСИТЕТ,
(41) Публікація відомостей про заявку: 12.10.2015, Бюл.№ 19	пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 24.06.2016, Бюл.№ 12	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
(72) Винахідник(и):	UA 90982 C2; 10.06.2010
Коваленко Сергій Іванович (UA),	UA 96186 C2; 10.06.2010
Воскобойнік Олексій Юрійович (UA),	G.G. Berest Synthesis and biological activity of
Носуленко Інна Степанівна (UA),	novel N-cycloalkyl-(cycloalkylaryl)-2-[(3-R-2-
Берест Галина Григорівна (UA),	oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-6-
Кацев Андрій Мойсейович (UA),	yl)thio]acetamides / G.G. Berest, A.Yu.
Сафронюк Сергій Леонідович (UA)	Voskoboynik, S.I. Kovalenko, A.M. Antypenko,
	I.S. Nosulenko, A. M. Katsev, A.S.
	Shandrovskaya // European Journal of
	Medicinal Chemistry. - 2011. - Vol. 46, Issue
	12. - P. 6066-6074
	Kovalenko S.I. Substituted 2-[(2-oxo-2H-
	[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-6-
	yl)thio]acetamides with Thiazole and
	Thiadiazole Fragments: Synthesis,
	Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and
	Anticancer Activity / S.I. Kovalenko, I.S.
	Nosulenko, A.Yu. Voskoboynik, G.G. Berest et
	al. // Scientia Pharmaceutica.- 2012. - Vol. 80.
	- P. 837-865
	Kovalenko S.I. Novel N-aryl(alkaryl)- 2-[(3-R-
	oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3-c]quinazoline-6-
	yl)thio]acetamides: synthesis, cytotoxicity,
	anticancer activity, COMPARE analysis and
	docking /S.I. Kovalenko, I.S. Nosulenko, A.Yu.
	Voskoboynik, G.G. Berest et al. // Med. Chem.
	Res. - 2013. - Vol. 22. - P. 2610-2632
	Воскобойнік О.Ю. МЕТОДИ СИНТЕЗУ
	ТРИАЗИНОХІНАЗОЛІНІВ / О.Ю.
	Воскобойнік, С. І. Коваленко, О. В.
	Карпенко, Д. Ю. Скорина, Г. Г. Берест, І. С.
	Носуленко, О. В. Кривошей // Журнал
	органічної та фармацевтичної хімії. - 2012.
	- Т.10. - В. 1(37). - С. 3-17

UA 111855 C2

(54) ЗАСТОСУВАННЯ N-ЦИКЛОАЛКІЛ- АБО N-ЦИКЛОАЛКАРИЛ-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 ПРОТИВІРУСНОЇ ДІЇ ЩОДО ШТАМІВ INFLUENZA VIRUS ТИПІВ А ТА В

Патент на полезную модель «Способ биотестирования веществ различной природы».



УКРАЇНА

(19) UA (11) 64811 (13) U
(51) МПК
C02F 3/32 (2006.01)
G01N 33/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальністю
власника
патенту

(54) СПОСІБ БІОТЕСТУВАННЯ РЕЧОВИН РІЗНОЇ ПРИРОДИ

1

2

(21) u201103044

(22) 15.03.2011

(24) 25.11.2011

(46) 25.11.2011, Бюл. № 22, 2011 р.

(72) КАЦЕВ АНДРІЙ МОЙСЕЙОВИЧ, АБДУРАМАНОВА ЕЛЬВІРА РУСТАМІВНА, ЧОРНИЙ ПАВЛО ВАЛЕРІЙОВИЧ, САФРОНЮК СЕРГІЙ ЛЕОНІДОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "КРИМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ С.Г. ГЕОРГІЄВСЬКОГО"

(57) 1. Спосіб біотестування речовин різної природи, що включає підготовку бактерійної суспензії, змішування її з аналізованим зразком, інкубацію, вимірювання інтенсивності світіння фотобактерій і визначення показника ефективної концентрації речовини (ЕК), що інгібує біолоюмінесценцію на 50 % у порівнянні з біолоюмінесценцією контрольного зразка, який відрізняється тим, що для ре-

єстрації люмінесценції використовують світлочутливу плівку, на яку накладають матрицю зі світло-непроникного матеріалу з комірками для кювет, кількість яких більше 2, потім проводять експозицію, проявляють, фіксують і сканують світлочутливу плівку з отриманням цифрового зображення, у зонах засвічування якого величина цифрового сигналу пропорційна інтенсивності світіння фотобактерій, потім за цифровим зображенням обчислюють ЕК, за яким судять про токсичність речовини, вважаючи речовину нетоксичною, малотоксичною, токсичною та сильно токсичною при значеннях ЕК відповідно менше 20 %, від 20 % до 50 %, від 50 % до 80 % і більше 80 %.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що експозицію проводять протягом 1-15 хвилин у залежності від природи токсичного чинника й первинної інтенсивності люмінесценції бактерійної суспензії.

Корисна модель належить до області екології, біології, медицини та фармації, а саме до методів визначення біоцидності різних речовин шляхом реєстрації зміни інтенсивності люмінесцентного сигналу біологічних об'єктів.

Як прототип вибраний спосіб біотестування речовин різної природи (Bulich A., Tung K., Scheibner G. The luminescent bacteria toxicity test: its potential as an in vitro alternative. J. Biolumin. Chemilumin, 1990. - 5. - Р. 71-77), який полягає у вимірюванні інтенсивності біолоюмінесценції фотобактерій за допомогою біолоюмінометра, при цьому люофільно-висушені або свіжо-вирощені світні бактерії видів *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium leiognath*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* розводять у буферному розчині з рН=7, після чого в кюветах люмінометра змішують із різними концентраціями або розчиненнями аналізованого розчину, після інкубації при температурі 20-25 °С вимірюють інтенсивність біолоюмінесценції у порівнянні з контролем - суспензією світних бактерій без додавання аналізованого розчину, а результати представляють у вигляді ефективної кон-

центрації речовин, що інгібують біолоюмінесценцію на 50 % - ЕК₅₀, яка є критерієм їх токсичності, аналогічно величині ЛД₅₀, що використовують в тестах на тваринах.

Ознаками, які співпадають з істотними ознаками способу, що заявляється, є: підготовка бактерійної суспензії, змішування її з аналізованим зразком, інкубація, вимірювання інтенсивності світіння фотобактерій і визначення ефективної концентрації речовини, що інгібує біолоюмінесценцію на 50 % у порівнянні з біолоюмінесценцією контрольного зразка.

Причинами, які перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату (підвищення ефективності біотестування), є: трудомісткість процесу, оскільки аналіз кожного окремого зразка проводять по черзі, і, як наслідок, низька швидкість проведення аналізу.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалення способу-прототипу шляхом заміни люмінометра рентгенівською плівкою, яку використовують як світлочутливий матеріал, що дозволяє одночасно досліджувати велику кількість зразків,

(13) U

(11) 64811

(19) UA