

УДК: 615.076:579.22:579.843

А. М. КАЦЕВ¹, кандидат химических наук
С. Л. САФРОНЮК¹,
И. Е. ЦОКАЛО¹, кандидат фармацевтических наук
А. В. ШЕРЕМЕТЬЕВА¹,
Н. Ф. СТАРОДУБ², профессор

¹Державна установа „Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського”

²Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

В работе изучается вопрос применимости биотеста на светящихся бактериях для определения активности антибиотиков. Показано, что ингибирование биолюминесценции происходило под действием всех исследованных препаратов, независимо от их специфичности. Наибольшее действие оказывали те вещества, которые повреждают клеточную стенку бактерий. Для антибиотиков, которые действуют на синтетический аппарат клетки, отмечено значительное увеличение ингибирующего влияния на бактериальную люминесценцию бактерий в тесте на хроническое действие, по сравнению с тестом на острое действие.

Ключевые слова: фармацевтический анализ, биолюминесценция, люминесцентные бактерии, биотестирование.

Фармацевтический анализ является ключевым элементом любой стадии создания лекарственных препаратов. На начальных этапах проводится скрининг и отбор будущих лекарственных веществ из огромного числа синтезируемых Биологически-активных веществ, количество которых достигает 100000 в день. На более поздних этапах разработки оптимального состава, лекарственной формы и способа введения проводится биофармацевтический анализ высвобождения и всасывания лекарственных веществ. Задачами фармацевтического анализа являются: определения специфических и неспецифических видов активностей, токсичности, физико-химических свойств, установление зависимости химическое строение биологическая активность. Для его проведения используются самые современные методы химического, физического и биологического анализа, которые удовлетворяют требованиям высокой чувствительности, низкой стоимости, производительности [1].

Одним из перспективных методов для проведения фармацевтического биоанализа является бактериальное биолюминесцентное биотестирование [2, 3]. В качестве тест-объектов в нем используются светящиеся бактерии, которые представляют собой живые системы, излучающие видимый свет, как результат общего метаболизма клетки. Вещества с разным механизмом биологической активности приводят к изменению биолюминесценции, снижая или увеличивая её интенсивность. Измеряя уровень свечения бактерий в зависимости от концентрации вещества или от времени, оценивают общую токсичность (экотоксичность) объекта и его биодоступность. Показана хорошая корреляция результатов этого метода с

данными, полученными на других водных организмах (дафнии, рыб). Для некоторых групп препаратов корреляция наблюдалась и с данными токсичности для теплокровных животных (мышь крысы, кролики) [4, 5]. Билюминесцентный метод тестирования может быть адаптирован для проведения скрининговых исследований, за счет использования 96-луночных (и более) планшетов или биосенсорной технологии [6, 7]. В последнем случае измерения могут проводиться и в режиме on-line [8].

Целью работы было изучение применимости и информативности биотестирования на светящихся бактериях при фармацевтическом анализе антибиотиков.

Материалы и методы. В работе использовали светящиеся бактерии из коллекции Крымского медицинского университета, выделенные авторами из Черного и Азовского морей в 1998 – 2012 гг. Количественную оценку интенсивности билюминесценции проводили с помощью люминометра БЛМ 8801 (СКТБ «Наука», Россия), с самописцем (LKB Bromma, Швеция). Результаты фиксировали в относительных единицах, соответствующих милливольтам.

В работе использовали аптечные формы антибиотиков: тетрациклин (Белмедпрепараты, Беларусь), бензилпенициллин (ОАО Киевмедпрепарат, Украина, SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Англия); цефтриаксон (Лубныфарм, Украина), линкомицин (Дарница, Украина), стрептомицин (ОАО Киевмедпрепарат, Украина), гентамицин (Дарница, Украина).

Для проведения билюминесцентного анализа использовали 16-часовую культуру светящихся бактерий на стационарной фазе роста, разведенную 3 %-м хлоридом натрия в необходимое число раз, которое подбирали экспериментально. Острое действие (токсичность, антибактериальный эффект) оценивали, смешивая в кюветах люминометра 0,8–0,9 мл тестируемого раствора в 2,5–3%-ом растворе NaCl, 100 мкл буферного раствора с pH=5,6–8,5 и 50–200 мкл бактериальной суспензии [9], после чего регистрировали изменение интенсивности билюминесценции в течение 30–120 минут с использованием самописца. Действие образцов выражали в виде эффективных концентраций вещества, вызывающих 20%-е, 50%-е или 80%-е снижение билюминесценции бактериальной суспензии, (соответственно ЭК₂₀, ЭК₅₀ и ЭК₈₀).

Для определения хронического действия веществ, 16-часовую культуру светящихся бактерий инокулировали в разведенную в 10 раз жидкую питательную среду при объемном соотношении 1:100 (бактерии:свежая среда). Полученную бактериальную суспензию разливали в 24-луночные планшеты, по 1 мл в лунку и туда же добавляли анализируемый раствор. Планшет помещали в термостат и культивировали в течение 16 часов при температуре 20–30 °С (в зависимости от температурного оптимума штамма). Хроническое действие (токсичность) оценивали аналогично острому по эффективным концентрациям ЭК₂₀, ЭК₅₀ или ЭК₈₀

Результаты и обсуждение. Использование билюминесцентного тестирования в качестве метода анализа основано на том, что светящиеся бактерии, реагируя уменьшением свечения на действие токсических, биоцидных и других свойств веществ, являются аналитическим инструментом, где билюминесценция – это аналитический сигнал, пропорциональный концентрации действующего вещества, а сами бактерии – чувствительный элемент. Таким образом, метод с одной стороны показывает биологическую активность препарата в данных условиях, а с другой является аналитическим методом определения его концентрации.

Учитывая бактериальную природу билюминесцентного биотеста можно было предположить, что такой класс лекарственных веществ, как антибиотики, в

особенности, подавляющие жизнедеятельность грамотрицательных бактерий, будут также ингибировать свечение бактерий [10]. Одним из таких антибиотиков является полимиксин, который использовался в работе в виде химического вещества полимиксин В (Sigma, США), а также в виде одноименного лекарственного препарата (Киевмедпрепарат, Украина).

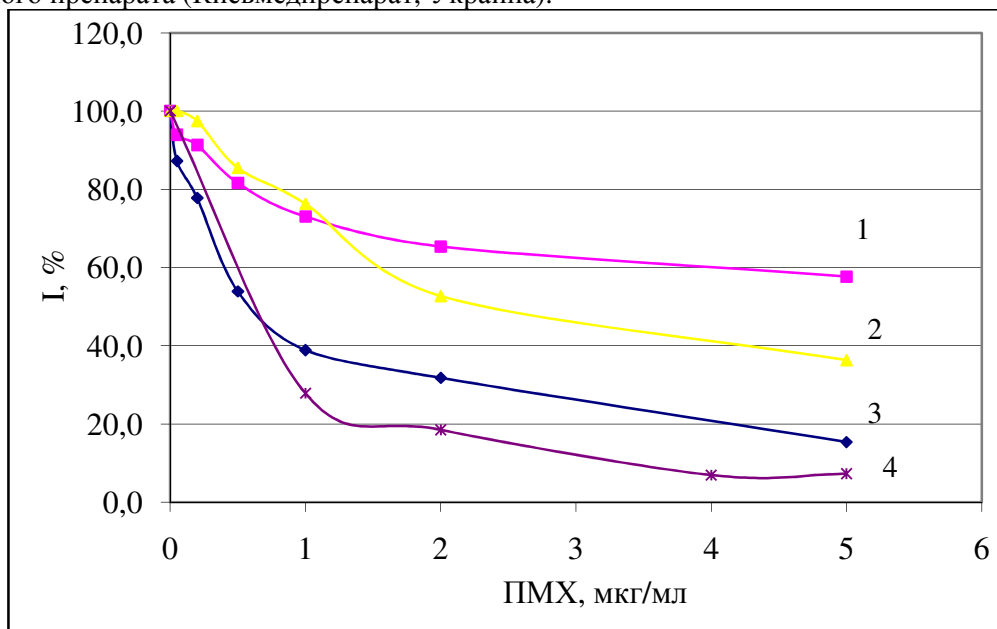


Рис. 1. Действие полимиксина В на биолюминесценцию светящихся бактерий. Полимиксин В (Sigma, USA) : 1 – *P. leiognathi* Cr1; 2 – *V. fischeri* F1, 3 – *P. phosphoreum* Sq3; полимиксина В (Киевмедпрепарат, Украина) : 4 – *P. phosphoreum* Sq3

Как показано на рис. 1, оба препарата ингибировали биолюминесценцию различных видов светящихся бактерий. Большей чувствительностью к антибиотику обладали бактерии вида *P. phosphoreum* (штамм Sq3). При этом лекарственный препарат отечественного производства обладал более выраженными ингибирующими свойствами, чем химически чистый полимиксин фирмы Sigma. Минимальные действующие концентрации ($ЭК_{20}$) для полимиксина (Sigma, USA) при использовании штаммов *P. phosphoreum* Sq3, *V. fischeri* F1, *P. leiognathi* Cr1 были соответственно 0,25; 0,56; 0,80 мкг/мл, а для препарата производства «Киевмедпрепарат» при использовании бактерий *P. phosphoreum* Sq3 – 0,16 мкг/мл.

Также исследовались антибиотики других групп с различными механизмами действия и спектрами активности. Среди них был тетрациклина гидрохлорид, обладающий бактериостатическим действием в отношении грамположительных микроорганизмов. Его действие на штаммы различных видов светящихся бактерий было практически одинаковым. При использовании штамма *P. leiognathi* Sh1, 15-минутный тест показал среднюю чувствительность бактерий к препарату, соответствующую 64 мкг/мл. Увеличение времени инкубации антибиотика и бактерий до 90 минут, усиливало эффект и позволило снизить действующую концентрацию до 25 мкг/мл (Рис. 2).

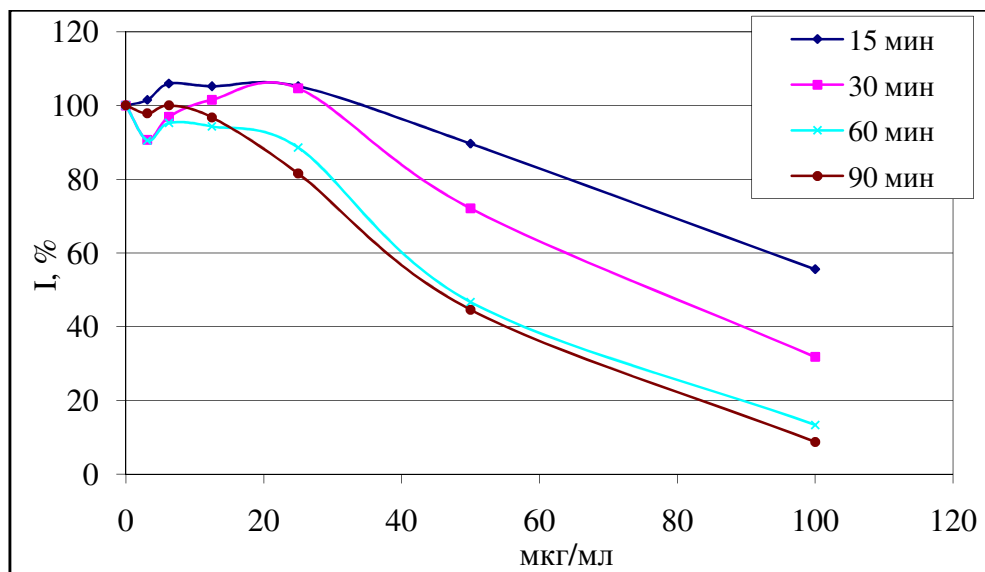


Рис. 2. Действие тетрациклина гидрохлорида на биолюминесценцию светящихся бактерий *P. leiognathi* Sh1.

Так как увеличение времени приводило к снижению действующих концентраций антибиотика, далее был использован тест на хроническую токсичность. В результате его применения, действующие концентрации тетрациклина были снижены на 4 порядка, а ЭК₂₀ составила 0,002 мкг/мл (2 нг/мл). Полученное значение эффективной концентрации значительно ниже, чем МПК антибиотика, которое варьирует в зависимости от штамма от 0,1 до 100 мкг/мл.

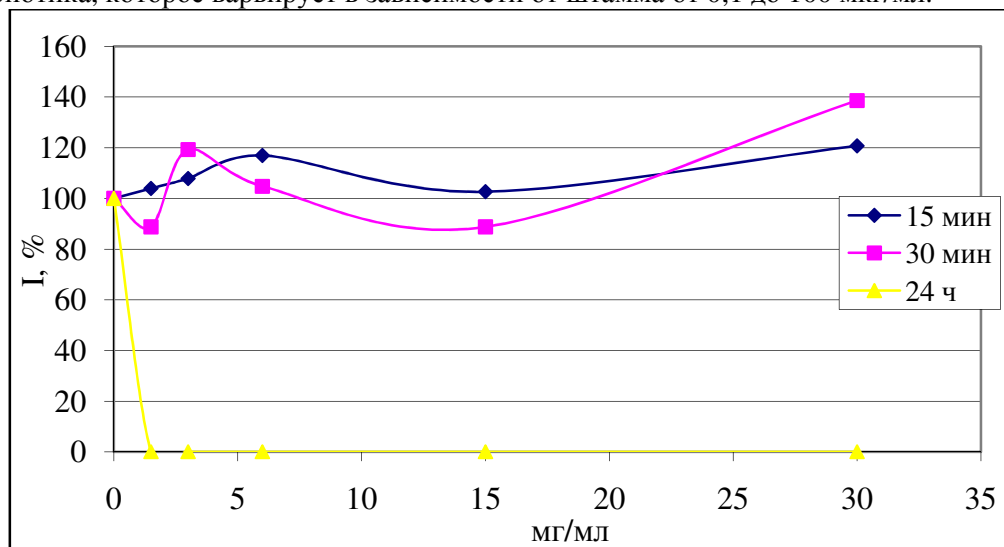


Рис. 3 Действие линкомицина на светящиеся бактерии в тесте на острую и хроническую токсичность.

Действие антибиотиков линкомицина и стрептомицина сульфата было сходным. В тесте на острую токсичность они практически не оказывали действия на биолюминесценцию светящихся бактерий, а при переходе на методику определения

хронического действия, ингибировали бактериальную люминесценцию. При этом минимальная действующая концентрация линкомицина была 0,3 мг/мл, а полное тушение люминесценции происходило при 1,5 мг/мл. Для стрептомицина эти величины были соответственно равны 0,01 мг/мл и 0,05 мг/мл (Рис.3, 4).

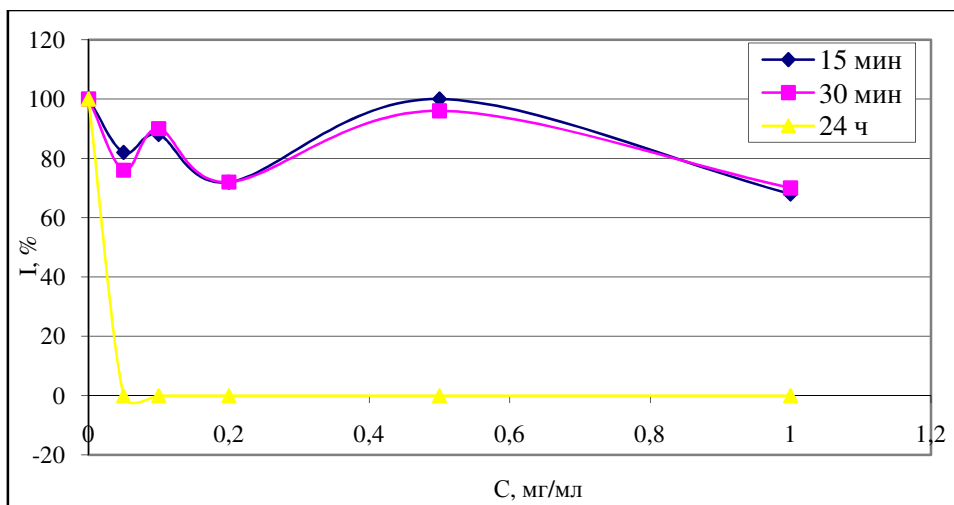


Рис. 4. Действие стрептомицина сульфата на светящиеся бактерии в тесте на острую и хроническую токсичность.

Несколько отличные результаты были получены при изучении антибиотика аминокликозидного ряда – гентамицина. Как показано на рис. 5, он оказывал ингибирующее действие на биолюминесценцию бактерий, как в тесте на острое действие, так и в тесте на хроническое действие. ЭК₂₀ гентамицина составили 0,06; 0,02 и 0,01 мг/мл при времени биотестирования соответственно 15 мин, 30 мин и 24 ч.

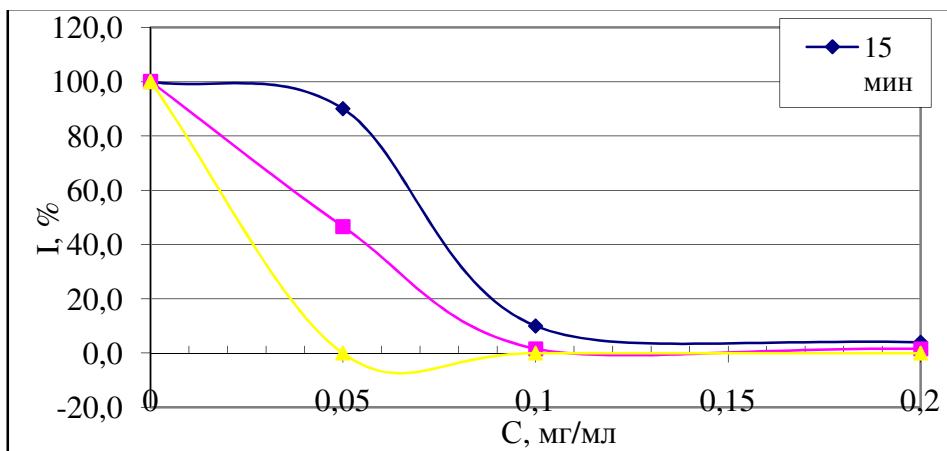


Рис. 5. Действие гентамицина на светящиеся бактерии в тесте на острую и хроническую токсичность.

Препарат бензилпенициллин характеризовался активностью в 15-минутном тесте на острое действие ЭК₅₀=0,76 мг/мл (рис. 6). При переходе на методику биотестирования хронического действия ингибирующее действие антибиотика

усиливалось, что сопровождалось снижением действующей концентрации бензилпенициллина до 0,01 мг/мл.

Аналогичным действием характеризовался и антибиотик цефало-споринового ряда – цефтриаксон (рис. 7). В 15-минутном тесте наблюдалось незначительное ингибирование бактериальной биолюминесценции до уровня 60% от контроля, с ЭК₂₀=0,1 мг/мл. Применение теста на хроническую токсичность вызывало практически полное тушение свечения бактерий и снижение минимальной действующей концентрации до 0,01 мг/мл.

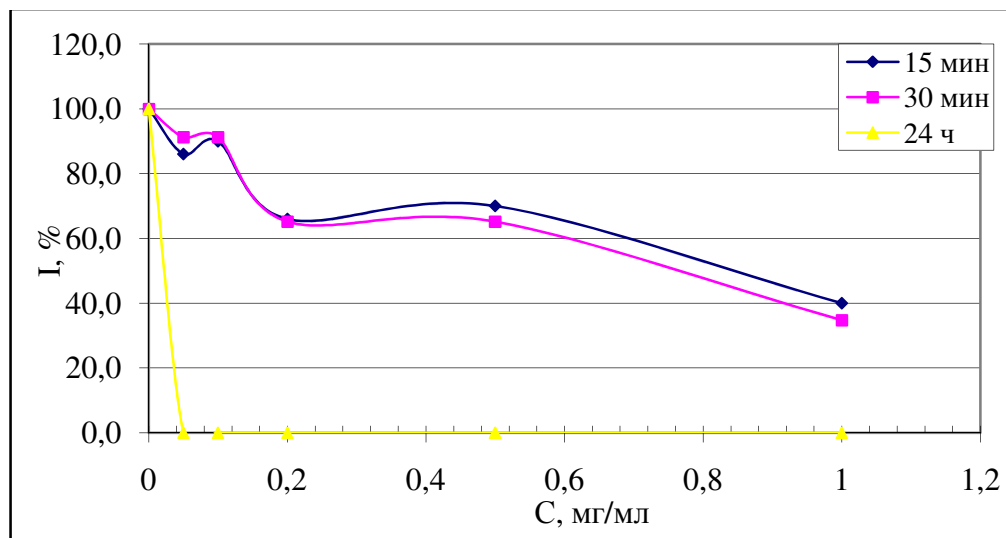


Рис. 6. Действие бензилпенициллина на светящиеся бактерии в тесте на острую и хроническую токсичность.

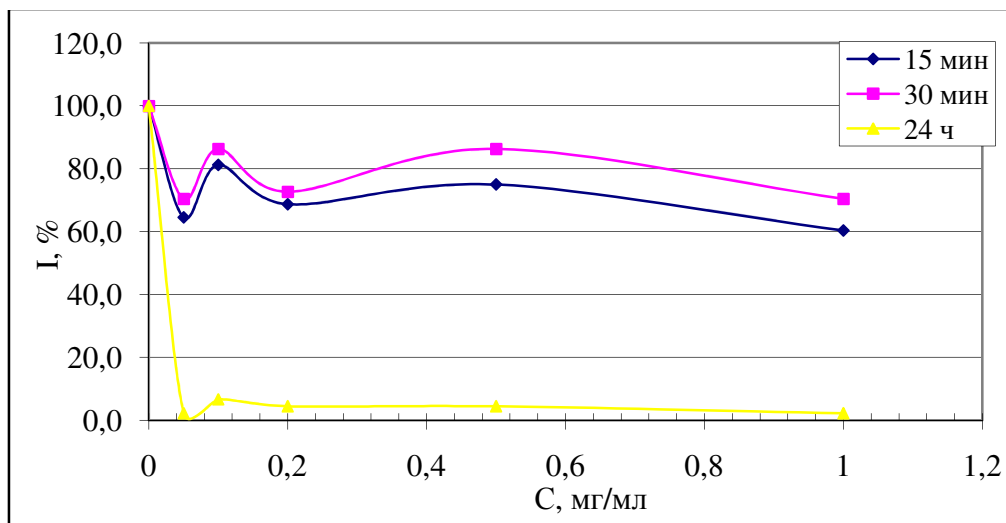


Рис. 7. Действие цефтриаксона на светящиеся бактерии в тесте на острую и хроническую токсичность.

Полученные результаты показали, что, несмотря на грамотрицательность светящихся бактерий, ингибирование биолюминесценции происходило под действием всех исследованных антибиотиков, независимо от их специфичности. Наи-

большее действие оказывали те соединения, которые повреждают клеточную стенку бактерий. Для антибиотиков, которые действуют на синтетический аппарат клетки, можно отметить значительное увеличение ингибирующего действия на бактериальную люминесценцию бактерий в тесте на хроническое действие, по сравнению с тестом на острое действие.

Сравнение действующих концентраций различных препаратов также представляет ценную информацию о механизме их действия. Антибиотик, линкомицин, специфичный преимущественно против грамположительных бактерий, ингибировал биолюминесценцию только в тесте на хроническое действие при ЭК₅₀=0,75 мг/мл, в то время как стрептомицин, обладающий широким спектром действия и будучи ингибитором синтеза белка, обладал в этом же тесте ЭК₅₀=0,03 мг/мл. Другой антибиотик полимиксин, который специфичен по отношению грамотрицательных бактерий, и действует за счет нарушения целостности и проницаемости цитоплазматической мембраны, оказывал острое действие на светящиеся бактерии при ЭК₅₀=0,001 мг/мл, что аналогично действию катионных поверхностно-активных антисептиков [11].

Таким образом, светящиеся бактерии как тест-объекты, могут быть использованы не только для определения токсичности в экологии, но и для изучения лекарственных препаратов, обладающих антибиотической активностью, что согласуется с имеющимися литературными данными [12, 13, 14, 15]. Это дает возможность применять биотестирование, как на начальных этапах скрининга новых лекарственных веществ на биологическую активность, так и на более поздних стадиях разработки лекарственных форм.

Список використаної літератури

1. *Go´mez-Hens A., Aguilar-Caballos M.P.* Modern analytical approaches to high-throughput drug discovery / A. Go´mez-Hens, M.P. Aguilar-Caballos // Trends in Anal. Chem. – 2007. – V. 26, No. 3. – P. 171-182.
2. *Дерябин Д. Г.* Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д. Г. Дерябин. – М: Наука, 2009. – 248 с.
3. Analytical bioluminescence and chemiluminescence / A. Roda, M. Guardigli, E. Mishelini [et al.] // Anal. Chem. – 2003. – Vol. 75, № 25. – P. 462–470.
4. *Bulich A. A.* The luminescent bacteria toxicity test: its potential as an in vitro alternative / A. A. Bulich, K. K. Tung, G. Scheibner // J. Biolumin. Chemilumin. – 1990. – Vol. 5, № 2. – P. 71–77.
5. *Kaiser K. L. E.* Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms / K. L. E. Kaiser // Environ. Health Perspect. – 1998. – Vol. 106, № 2. – P. 583–591.
6. Immobilization of bioluminescent *Escherichia coli* cells using natural and artificial fibers treated with polyethyleneimine / Y. F. Chu, C. H. Hsu, P. K. Soma [et al.] // Bioresour. Technol. – 2009. – Vol. 100, № 13. – P. 3167–3174.
7. *Mitchell R. J.* Characterization and optimization of two methods in the immobilization of 12 bioluminescent strains / R.J. Mitchell, M.B. Gu // Biosensors and Bioelectronic. – 2006. – Vol. 22, № 2. – P. 192–199.
8. Optical modeling of bioluminescence in whole cell biosensors / H. Ben-Yoay, T. Elad, O. Shlomovits [et al.] // Biosens. Bioelectron. – 2009. – Vol. 24, № 7. – P. 1969–1973.
9. Acute toxicity and relationship between metabolites and ecotoxicity during the biodegradation process of non-ionic surfactants: fatty-alcohol ethoxylates, nonylphenol polyethoxylate and alkylpolyglucosides / E. Jurado, M. Fernández–

Serrano, J. Núñez-Olea [et al.] // Water. Sci. Technol. – 2009. – Vol. 59, № 12. – P. 2351–2358.

10. Hilpert K. Use of luminescent bacteria for rapid screening and characterization of short cationic antimicrobial peptides synthesized on cellulose using peptide array technology / K. Hilpert, R.E. Hancock // Nature Protocols. – 2007. – Vol. 2. – P. 1652–1660.

11. Кацев А. М. Влияние поверхностно-активных веществ на интенсивность люминесценции бактерий / А. М. Кацев, Н. Ф. Стародуб // Український біохімічний журнал. – 2003. – Т. 75, №2. – С. 94–103.

12. Cho K. W. Bioluminescent assay for sphingolipid ceramide N-deacylase using *Vibrio harveyi* dark mutant M-17 / K. W. Cho // J. Microbiol. – 2008. – Vol. 46, № 5. – P. 585–589.

13. Chromatography–bioluminescence coupling reveals surprising bioactivity of inthomycin A / W. Kreiss, R. Fröde, V. Möhrle [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2010. – Vol. 398, № 5. – P. 2081–2088.

14. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles / R. Barrena, E. Casals, J. Colón [et al.] // Chemosphere. – 2009. – Vol. 75, № 7. – P. 850–857.

15. Examination of the mechanism of phenanthrenequinone toxicity to *Vibrio fischeri*: evidence for a reactive oxygen species-mediated toxicity mechanism / W. Wang, J. Nykamp, X. D. Huang [et al.] // Environ. Toxicol. Chem. – 2009. – Vol. 28, № 8. – P. 1655–1662.

ОЦІНКА ЗАСТОСОВАННЯ БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНОГО АНАЛІЗУ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ АКТИВНОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ/ А. М. Кацев, С.Л.Сафронюк, И. Е. Цокало, А. В. Шере-метьева, Н. Ф. Стародуб

У роботі розглядаються питання застосування біотесту на бактеріях, які світяться, для визначення активності антибіотиків. Показано, що інгібування біолоюмінесценції відбувалося під дією всіх досліджених препаратів, незалежно від їх специфічності. Найбільшу дію надають ті речовини, які ушкоджують клітинну стінку бактерій. Для антибіотиків, які діють на синтетичний апарат клітини, притаманне значне збільшення впливу, що в свою чергу, інгібує бактерійну люмінесценцію бактерій

Ключові слова: фармацевтичний аналіз, біолоюмінесценція, люмінесцентні бактерії, біотестування.

ESTIMATION OF APPLICABILITY BIOLUMINESCENT ANALYSIS AT THE VALUATION OF THE ACTIVITY OF DRUGS/ A. M. Katzev, S. L. Safronjuk, I.E. Zokalo, A. W. Cheremet'jeva, N. F. Starodub

The paper deals with the application of bioassays on luminescent bacteria, to determine the activity of antibiotics. It is shown that inhibition of bioluminescence occurred under all investigated preparations, regardless of their specificity. The greatest effect of providing those compounds that damage the cell wall of bacteria. For antibiotics that act on the synthetic apparatus of the cell, inherent in a significant increase in exposure, which in turn inhibits luminescent bacteria.

Key words: pharmaceutical analysis, bioluminescence, luminescent bacteria biological testing.

Рецензент – доктор ветеринарних наук В. Л. Коваленко.