

А.М. Кацев, А.С. Шандровская, Э.Р. Абдураманова

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫБОРА ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СКРИНИНГОВОГО БИОТЕСТИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, г. Симферополь

Ключові слова: біофармацевтичний скринінг, біоломінесцентний аналіз, біотестування.

Ключевые слова: биофармацевтический скрининг, биоломинесцентный анализ, биотестирование.

Key words: biopharmaceutical screening, bioluminescent analysis, biotesting.

Досліджено можливість використання органічних розчинників (диметилсульфоксиду, диметилформаміду, ізопропанолу й етанолу) для скринінгового біотестування гідрофобних лікарських речовин. Встановлено, що диметилсульфоксид виявляє найменшу дію на бактерії, що світяться, і є найприйнятнішим розчинником у нейтральних і слабколужних умовах тестування. Зіставлення даних біоломінесцентного аналізу органічних розчинників з їх фізико-хімічними характеристиками, розрахованими за допомогою комп'ютерних програм, свідчило, що біологічна індиферентність диметилсульфоксиду може додатково обґрунтуватись його низькою гідрофобністю, найбільшим значенням поверхневого натягнення і рКа та відносно низьким значенням молярного об'єму.

Исследована возможность использования органических растворителей (диметилсульфоксида, диметилформамида, изопропанола и этанола) для скринингового биотестирования гидрофобных лекарственных веществ. Установлено, что диметилсульфоксид оказывает наименьшее воздействие на светящиеся бактерии и является более приемлемым растворителем в нейтральных и слабощелочных условиях тестирования. Сопоставление данных биоломинесцентного анализа органических растворителей с их физико-химическими характеристиками, рассчитанными с помощью компьютерных программ, показало, что биологическая индифферентность диметилсульфоксида может дополнительно обосновываться его низкой гидрофобностью, наибольшим значением поверхностного натяжения и рКа и относительно низким значением молярного объема.

The possibility of using of organic solvents (dimethylsulfoxide, dimethylformamide, isopropanol and ethanol) for screening biotesting of hydrophobic medicinal substances was investigated. It was established that dimethylsulfoxide has shown the least influence on luminescent bacteria and it was more acceptable solvent at the neutral and alkaline conditions of testing. Comparison of organic solvents bioluminescent analysis data with their physicochemical descriptions, calculated by computer programs, showed that biological indifference of dimethylsulfoxide can be additionally grounded by its low hydrophobic properties, by maximal value of surface tension and pKa and relatively low value of molar volume.

Ежегодно в мире синтезируется большое количество химических соединений с целью поиска новых лекарственных веществ. Для этого ведется постоянный крупномасштабный скрининг по различным параметрам, которые включают в себя физико-химические и биологические свойства. С целью оптимизации поиска лекарственных веществ активно внедряются компьютерные методы прогнозирования фармакологической активности синтезируемых веществ на основании структуры и свойств (QSAR) [1,2].

Одним из методов фармакологического скрининга может стать биотест на основе морских светящихся бактерий, который уже многие годы используется для мониторинга токсичности водных объектов окружающей среды. В многочисленных исследованиях показано, что ингибиторами бактериальной люминесценции являются вещества поверхностно-активной природы, антибиотики с различным спектром действия, цитотоксические вещества и ряд других. Это дает возможность использовать биоломинесцентный метод для первичного отбора синтезируемых веществ на определенные виды биологической активности, а также для получения первичной информации об их токсичности [3,4].

В связи с этим встает вопрос о влиянии физико-химических свойств тестируемых веществ на биоломинесценцию тест-бактерий. С одной стороны, лекарственные вещества должны обладать дифильными свойствами (согласно правилу пяти $\log P < 5$), чтобы всасываться в желудочно-кишечном тракте [5]. С другой стороны, высокая

гидрофобность субстанций приводит к их низкой растворимости в воде, что затрудняет проведение и интерпретацию результатов биологических испытаний.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Подбор оптимального растворителя лекарственных веществ и подготовка проб для биофармацевтического скрининга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для биотестирования использовали морские светящиеся бактерии *Photobacterium leiognathi* Sh 1 из коллекции Крымского государственного медицинского университета. Бактерии выращивали в течение 16–18 ч на жидкой питательной среде при pH=7, содержащей 3% хлорида натрия. Температурный режим культивирования составлял 28–32°C.

Для биотестирования острого действия в пробу вносили 0,8 мл 3% NaCl, 2–50 мкл тестируемого раствора, 50 мкл буферного раствора. Для создания кислой среды при биотестировании с pH=5,5, использовали 0,1 М фосфатно-цитратный буфер; для получения нейтральных условий добавляли 0,1 М фосфатный буфер; pH=8,5 поддерживали добавлением 0,1 М трис-HCl буфера. В последнюю очередь в пробу вносили 50–100 мкл суспензии светящихся бактерий до конечной концентрации $5 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ кл/мл (разведение в 1000–2000 раз), после чего пробы перемешивали и инкубировали 30 мин при температуре 25°C. Измерения биоломинесценции проводили с помощью биоломинометра БЛМ 8801, СКТБ «Наука», Россия. Результаты представляли графически с по-

мощью компьютерной программы Excel, а также рассчитывали индекс биологического эффекта БЭ (%) по формуле $BЭ=100-I(\%)$,

где $I(\%)$ – интенсивность биолюминесценции при максимальном количестве тестируемого образца (50 мкл), в % от контроля, в качестве которого использовали пробы без добавления тестируемого образца.

При оценке хронического действия в пробы дополнительно вводили питательную среду в объеме 20–50 мкл, с целью создания условий для роста светящихся бактерий. Измерение биолюминесценции проводили через 18 ч инкубации при температуре 28–32°C.

Свойства исследуемых растворителей определяли расчетным путем с использованием специализированных компьютерных программ. С помощью веб-сайта ChemSilico LLC, USA, в режиме on-line, определяли: 1) логарифм коэффициента распределения октанол/вода (CSLogP), 2) логарифм коэффициента распределения с учетом заряженных частиц при pH=2; 5; 7,4 (CSLogD), 3) растворимость в воде при pH=2; 5; 7,4 (CSWS), связывание с белками плазмы (CSPB), 4) индекс мутагенности (CSMIA), 5) отрицательный логарифм константы диссоциации (pKa), 6) абсорбцию ЖКТ (CSHIA). Такие свойства, как молярный объем (см³), коэффициент молярной рефракции, поверхностное натяжение (дин/см), поляризуемость рассчитывали с помощью программы ACD/ChemSketch Freeware, USA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Многие биологически активные вещества, обладая хорошей способностью проходить через биологические мембраны, плохо растворимы в воде [5]. Это означает, что для проведения биофармацевтических испытаний требуется подбор специальных органических растворителей, пригодных для получения жидких форм препаратов. Основными критериями выбора оптимального растворителя в данных условиях являются высокая растворяющая способность, совместимость с водой, низкая токсичность по отношению к биологическим тест-объектам. С целью подбора растворителей для приготовления образцов, подвергаемых биотестированию, изучено острое и хроническое действие таких веществ, как диметилсульфоксид (ДМСО), диметилформамид (ДМФА), изопропанол (ИП) и этанол на биолюминесценцию светящихся бактерий.

Установлено, что в 30-минутном тесте на острую токсичность при нейтральном значении pH все исследуемые растворители, за исключением ИП, практически не оказывали действия на биолюминесценцию светящихся бактерий, вплоть до разведения 1:20 (0,05), *рис. 1*.

С увеличением концентрации ИП закономерно ингибировал свечение бактерий, что свидетельствует о его токсических свойствах по отношению к данному тест-объекту и непригодности для получения проб при биотестировании лекарственных веществ.

Преыдушие исследования показали, что многие органические вещества, обладающие токсичностью, не всегда оказывают ингибирующее действие на биолюминесценцию светящихся бактерий. Для биотестирования таких веществ

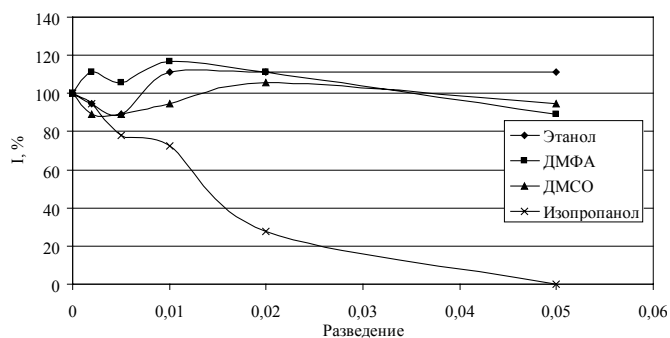


Рис. 1. Влияние органических растворителей на биолюминесценцию бактерий *P. leiognathi* Sh1 при pH=7.

предложен подход, который заключался в снижении pH среды до нижней физиологической для бактерий границы (pH=5,5), а также введении веществ-модуляторов чувствительности бактерий. В результате происходило значительное усиление действия веществ на бактериальную биолюминесценцию, что показано на примере неионогенных ПАВ и токсинов биологической природы [6]. Кроме того, показано, что для некоторых веществ (например, солей мышьяка) биологическое действие максимально проявляется в слабощелочных условиях [7]. Поэтому на следующем этапе изучали действие растворителей на светящиеся бактерии при pH=5,5 и 8,5 (*рис. 2, 3*).

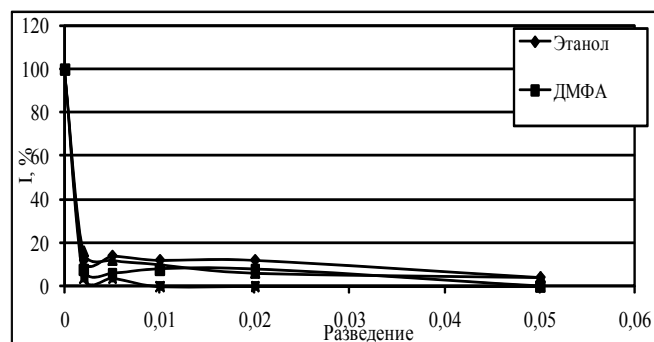


Рис. 2. Влияние органических растворителей на биолюминесценцию бактерий *P. leiognathi* Sh1 при pH=5,5.

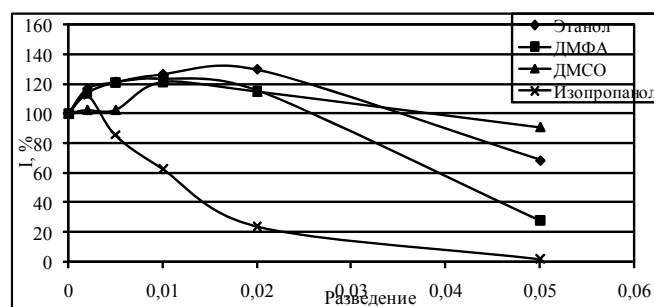


Рис. 3. Влияние органических растворителей на биолюминесценцию бактерий *P. leiognathi* Sh1 при pH=8,5.

В кислой среде (при pH=5,5) наблюдалось быстрое тушение бактериальной люминесценции всеми исследуемыми растворителями уже при разведении 1:500, что делает эти условия неприемлемыми для биотестирования водонерастворимых органических веществ. В щелочной среде при pH=8,5 действие растворителей аналогично действию при нейтраль-



Физико-химические и биологические свойства растворителей

Растворители	LogP	pKa	Молярный объем, см ³	σ, дин/см	БЭ, %, pH=7	БЭ, %, pH=5,5	БЭ, %, pH=8,5
ДМСО	-0,12	35,10	71	43,6	5,6	96	9,1
ДМФА	-0,56	2,89	82,6	25,7	11,1	100	72,1
ИПС	0,07	15,4	75,9	22,6	100	100	98,1
Этанол	-0,35	16,04	59	22,3	-11,1	96	31,2
Коэффициенты корреляции							
К, pH=7	0,714	-0,122	0,424	-0,311			
К, pH=5,5	-0,021	-0,714	0,826	-0,501			
К, pH=8,5	0,152	-0,699	0,591	-0,695			

ном pH, однако ДМФА и этанол проявляли в щелочной среде более сильное ингибирующее действие при разведении 1:20, чем при pH=7. Таким образом, ДМСО может быть выбран как наиболее приемлемый растворитель для нейтральных и слабощелочных условий биотестирования, оказывающий наименьшее воздействие на светящиеся бактерии.

Использование методики биотестирования для определения хронического действия веществ показало следующие результаты. Практически при всех значениях pH низкие концентрации растворителей не оказывали значительного влияния на рост светящихся бактерий. Ингибирующее действие проявляли ДМФА, ИП и этанол только при разведении 1:20, снижая биолюминесценцию в среднем на 50%. Также как и в предыдущем случае, в этом биотесте ДМСО не оказывал никакого действия даже при разведении 1:20.

Для более полного понимания полученных результатов, а также выяснения, какие из физико-химических свойств органических растворителей определяют их биологическое действие, произведен компьютерный анализ. Целью этого этапа работы было получение полных данных о физико-химических свойствах растворителей с применением возможностей компьютерного моделирования. Для этого использован веб-сайт фирмы ChemSilico LLC, USA, специализирующийся на QSAR и дающий возможность получения широкого спектра физико-химических свойств веществ по их структуре. Дополнительно с этой же целью использована программа ACD/ChemSketch Freeware, USA, которая также прогнозирует некоторые физико-химические свойства веществ по их структуре. Полученные данные сравнивали с результатами биотестирования, определяя коэффициент корреляции между ними. Среди 13 физико-химических свойств отобраны 3 наиболее значимые, для которых наблюдаемая корреляция с биологическим эффектом была больше 0,5 или меньше -0,5, хотя бы при одном из трех pH (табл. 1). К таким физико-химическим свойствам, которые в наибольшей степени определяли биологический эффект были отнесены CSlogP, CSpKa, молярный объем и поверхностное натяжение.

Из полученных результатов следует, несмотря на высокую гидрофильность всех исследуемых растворителей, которая проявляется в смешивании с водой в любых соотношениях и соответствующих показателях LogP, именно этот показатель в наибольшей степени коррелировал с биологическим эффектом (БЭ, %) при pH=7. Это означает, что

в этих условиях с увеличением гидрофобности возрастает ингибирующее действие растворителей на биолюминесценцию бактерий. При кислых и щелочных условиях действие этого фактора практически прекращается. Другой показатель, константа кислотной диссоциации (pKa), наоборот, в наибольшей степени влиял на БЭ растворителей при кислых и щелочных значениях pH, увеличивая тенденцию к ингибированию биолюминесценции с усилением кислотных свойств. Молярный объем оказывал влияние на биологическое действие растворителей при всех изученных pH, проявляя максимальные значения при pH=5,5. Все исследуемые растворители – низкомолекулярные соединения с невысокими значениями молярного объема, и с его увеличением способность ингибировать биолюминесценцию возрастала.

Также важным фактором, который определял биологическое действие растворителей, являлось поверхностное натяжение, с увеличением которого ингибирующее действие на бактериальную биолюминесценцию снижалось. Максимальную роль поверхностное натяжение приобретало при pH=8,5. Остальные физико-химические свойства, определяемые расчетным путем, практически не коррелировали с результатами биологических испытаний.

Полученные данные позволяют выявить те физико-химические свойства, которые определяют действие органических веществ на светящиеся бактерии, а также условия, при которых их действие проявляется в максимальной степени. Таким образом, биологическая индифферентность ДМСО, выбранного в качестве оптимального растворителя по результатам биолюминесцентного анализа, может быть дополнительно обоснована тем, что это вещество имеет низкую гидрофобность, наибольшие значения поверхностного натяжения и pKa, а также относительно низкое значение молярного объема. Можно также предположить, что эти же факторы будут являться дескрипторами, которые могут быть использованы для QSAR биологически активных веществ. Это согласуется с имеющимися данными специальной литературы, где было показано, что гидрофобность веществ коррелирует с токсичностью для некоторых групп алифатических соединений [4].

ВЫВОДЫ

1. Изучено действие органических растворителей, приемлемых для растворения гидрофобных лекарственных веществ, на биолюминесценцию светящихся бактерий при различных pH.



2. Показано, что оптимальным растворителем при нейтральных и слабощелочных рН, обладающим минимальным биологическим действием, является диметилсульфоксид.

3. Сопоставление результатов биотестирования с физико-химическими свойствами растворителей, вычисленными с использованием компьютерных программ, показало, что биологический эффект определяется, прежде всего, гидрофобностью (LogP), поверхностным натяжением (σ), рКа и молярным объемом тестируемых веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Regulatory use of computational toxicology tools and databases at the United States food and drug administration's office of food additive safety / *K.B. Arvidson, R. Chanderbhan, K. Muldoon-Jacobs [et al]* // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* – 2010. – Vol. 6, №7. – P. 793-796.
2. *Boyer S.* The use of computer models in pharmaceutical safety evaluation / *S. Boyer* // *Altern. Lab. Anim.* – 2009. – Vol. 37, №5. – P. 467-475.
3. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria / *S. Girotti, E.N. Ferri, M.G. Fumo [et al]* // *Ibid.* – 2008. – Vol. 608. – P. 2-29.
4. *Parvez S.* Toxicity assessment of organic pollutants: reliability of bioluminescence inhibition assay and univariate QSAR models using freshly prepared *Vibrio fischeri* / *S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji* // *Toxicol. In Vitro.* – 2008. – Vol. 22, №7. – P. 1806-1813.
5. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / *C.A. Lipinski, E. Lombardo, B.W. Dominy [et al]* // *Adv. Drug Del. Rev.* – 1997. – Vol. 23. – P. 3-25.
6. Пат. 24287 UA, МПК G 01 N 33/18. Спосіб визначення токсичності речовин у водних розчинах / *Кацев А.М., Абдураманова Е.Р., Стародуб М.Ф.*; заявник і патентовласник Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського. – № u200701375; заявл. 09.02.2007; опубл. 26.06.2007, Бюл. №9.
7. Effect of pH on arsenate and arsenite toxicity to luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*) / *E. Fulladosa, J. Murat, M. Martinez [et al]* // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 2004. – Vol. 46, №2. – P. 176-182.

Сведения об авторах:

Кацев А.М., к. хим. н., доцент, зав. каф. фармации Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского. Шандровская А.С., студентка Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского.

Абдураманова Э.Р., младший научный сотрудник ЦНИЛ Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского.

Адрес для переписки:

Кацев Андрей Моисеевич. 95006, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7, КГМУ, каф. фармации.

Тел.: (0652) 55 49 18.

Рецензент: проф. С.И. Коваленко
Поступила в редакцию 30.07.2010 г.