



АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
ОРДЕНА ЛЕНИНА СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
ИНСТИТУТ ФИЗИКИ им.Л.В.КИРЕНСКОГО

Препринт № 75Б

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ  
ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ  
СУЛЬФОПРОИЗВОДНЫХ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ

В.А.Кратасюк, В.И.Макурина,  
А.М.Кузнецов, Н.Б.Плотникова,  
С.Е.Медведева, И.С.Гриценко,  
В.П.Черных

Красноярск 1988

THE INVESTIGATION OF INFLUENCE OF BIOLOGICAL ACTIVE  
SUCCINIC ACID SULFODERIVATIVES ON BACTERIAL LUMINESCENCE

V.A. Kratasyuk, V.I. Makurina\*, A.M. Kuznetsov, N.B. Plotnikova, S.E. Medvedeva, I.S. Gritsenko\*, V.P. Chernykh\*

Institute of Biophysics, USSR Academy of Sciences,  
Siberian Branch, Krasnoyarsk, 660036, U S S R

\*Pharmaceutical Institute, Khar'kov, U S S R

The comparative study dealing with the influence of two different in structure groups of pharmacologically active succinic acid sulfoderivatives, i.e. N-(arylsulfonamido) succinimides and hydroxyamides of arensulfohydrosides of succinic acid upon luminous bacteria and bioluminescent reaction catalyzed by luciferase has been carried out. The inhibition of luciferase has been shown practically not to depend on lipophilic properties of the succinic acid sulfoderivatives. These molecules exert a variety of influence on luminous bacteria. The influence of these substances is followed by the increase or the inhibition of light intensity or by the lack of the effect at all. It has been shown that the increase in light intensity was observed for high lipophilic molecules but in case with hydrophylic ones the inhibitory effect was observed. The changes in the ultrastructure of luminous bacteria didn't take place as a result of these influences.

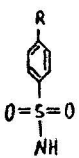

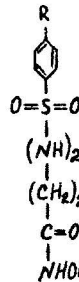
Сульфопроизводные янтарной кислоты представляют собой перспективную группу веществ с разносторонней фармакологической активностью [1,2].

В работе [1] установлено, что биологический эффект сульфопроизводных янтарной кислоты существенно зависит от их кислотности. В продолжение исследований по изучению закономерностей связи между фармакологическим действием и свойствами сульфопроизводных янтарной кислоты мы изучили влияние последних на бактериальную люминесценцию.

Работа выполнена с целью изучения влияния сульфопроизводных янтарной кислоты на люминесценцию интактных бактерий и выделенных из них фермент-субстратных систем и сравнения полученных данных с их липофильными свойствами. Результаты работы могут быть полезными при интерпретации механизма действия исследуемых веществ, а также для определения возможности их биолюминесцентного тестирования [3,4], необходимого при изучении фармакокинетики и биодоступности.

Для исследования выбраны две группы сульфопроизводных янтарной кислоты, существенно различающихся строением. Первую группу составили N-(арилсульфонамидо) сукцинимиды (табл. I, соедин. 1 а-е), содержащие в своей структуре сукцинимидный цикл. Вторая группа соединений - это гидроксиамиды аренсульфогидразидов янтарной кислоты, имеющие линейное строение (соедин. 2 а-е). Для указанных соединений по методу [5] были экспериментально определены коэффициенты распределения (P) в системе n-октанол-вода. Данные, представленные в таблице I, свидетельствуют о том, что липофильность, количественно характеризуемая с помощью логарифмов коэффициентов распределения ( $\lg P$ ), существенно зависит от природы заместителя в бензольном кольце соединений исследуемого изоострук-

Таблица I  
Липофильность сульфопроизводных янтарной кислоты и их действие на люминесценцию *Photobacterium phosphoreum*

Группа веществ	R	N соединения	lgP	Действие на люминесценцию			$\frac{\Delta I}{I_1}, \%$
				концентрация, мг/мл	конт-роль, I <sub>1</sub> , мВ	действие, I <sub>1</sub> , мВ	
	NO <sub>2</sub>	Ia	-0,45	0,1	59	50	-15±0,45
	CH <sub>3</sub> <sup>0</sup>	Iб	-0,19	0,1	31	30	- 3±0,20
	H	Iв	-0,17	0,1	52,5	50	- 5±0,14
	CH <sub>3</sub>	Iг	0,35	0,01	50	52,5	+ 5±0,40
				0,1	33	41	+10±0,38
	Cl	Id	0,54	1,0	80	84	+ 5±0,14
	Br	Ie	0,69	0,1	72	82	+14±0,44
	NO <sub>2</sub>	2a	-0,86	0,1	50	50	0
	CH <sub>3</sub> <sup>0</sup>	2б	-0,59	0,1	31	30	- 3±0,20
	H	2в	-0,56	0,1	52,5	50	- 5±0,14
	CH <sub>3</sub>	2г	0,02	0,1	57,5	55	- 5±0,14
	Cl	2д	0,17	0,01	38	48,6	+20±1,0
	Br	2e	0,29	0,1	40	40	0

турного ряда. Наибольшей липофильностью характеризуются вещества, содержащие в своей структуре гидрофобные CH<sub>3</sub>, Cl, Br - радикалы.

Сравнение липофильных характеристик с результатами испытаний влияния изучаемых веществ на биолюминесценцию интактных бактерий показало, что по характеру воздействия на свечение *in vivo* вещества разделились на 3 группы (табл. I). К первой из них относятся гидросульфамиды (2 а, е), не оказывавшие влияния на люминесценцию бактерий. Поскольку эти соединения являются полярными по своим

липофильным характеристикам, возможно, отсутствие влияния на биолюминесценцию связано с плохой проницаемостью этих соединений через мембраны клеток бактерий: для гидроксиамида (2 е) из-за высокой липофильности Br-радикала в бензольном кольце, что может приводить к прилипанию вещества к поверхности мембраны, а для гидроксиамида (2 а) из-за низкой его липофильности за счет полярной  $\text{NO}_2$ -группы, что препятствует прохождению вещества через липидный слой мембраны клетки. Высказанное предположение находит свое подтверждение значительным влиянием рассматриваемых веществ на реакцию биолюминесценции.

Вторая группа веществ включает сульфопроизводные янтарной кислоты, стимулирующие свечение бактерий. К ним относятся имиды (I г-е) и гидроксиамид (2 д). Интересно отметить, что все указанные соединения содержат в бензольном кольце липофильные заместители ( $\text{CH}_3$ , Cl, Br), причем максимальное влияние на биолюминесценцию бактерий оказывают вещества, характеризующиеся наиболее выраженным липофильным характером (I е, 2 д).

Третью группу веществ составляют ингибиторы биолюминесценции *in vivo*. Следует отметить, что наиболее сильным ингибирующим эффектом обладал имид (I а), содержащий в своей структуре гидрофильную  $\text{NO}_2$ -группу.

Ингибирование свечения веществами (I а, б; 2 б, в) было практически одинаковым. Следует отметить и близость липофильных характеристик этих веществ.

Было изучено влияние I а, I в, I д на ультраструктуру светящихся бактерий. Показано, что обработка клеток этими веществами не вызывает изменений в их тонкой организации. Отсутствие повреждающего действия этих веществ на клетки может служить косвенным показанием для фармацевтического использования этих веществ.

Изучение влияния сульфопроизводных янтарной кислоты на реакцию светоизлучения проводили с использованием нескольких концентраций ингибиторов (табл. 2). При этом не было обнаружено веществ, увеличивающих интенсивность свечения люциферазной реакции. Имиды (I в, д) не оказывали влияния на свечение даже при добавлении в кювету  $2 \cdot 10^{-2}$  мг вещества.

Большая часть исследованных веществ оказывает ингибирующее влияние на биолюминесцентную реакцию в концентрациях от  $10^{-8}$  М до  $10^{-6}$  М. Причем сила ингибирования при добавлении в кювету  $10^{-2}$  мг вещества возрастала в ряду  $\text{H} > \text{CH}_3 > \text{CH}_3\text{O} > \text{Cl}$  для имидов и в ряду

Таблица 2

Влияние сульфопроизводных янтарной кислоты на реакцию биолюминесценции

Вещество	Количество мг вещества, добавляемого в 10 <sup>2</sup> цветку	Контроль I <sub>1</sub> (мВ)	Вещество I <sub>2</sub> (мВ)	$\frac{I_2}{I_1} \%$
Ia	1,0	89±5	84±6	0
	2,0	104±3	100±6	0
Iб	0,5	43±3	13±1	70
	1,0	44±3	10±1	77
Iв	0,01	7,3±0,3	6,7±0,4	8
	0,1	6,5±0,4	1,4±0,1	78
	1,0	4,7±0,4	0,3±0,1	94
Iг	0,5	40±2	12±1	70
	1,0	655±21	100±28	85
Id	0,5	60±4	60±0	0
	2,0	54±0	54±0	0
Ie	0,5	25±0	22±0	12
	1,0	46±3	25±3	46
	2,0	54±4	28±2	48
2a	0,5	60±10	62,5±3,5	0
	1,0	655±7	347±45	47
	2,0	753±74	180±82	73
2б	1,0	89±4	56±2	37
	2,0	75±4	29±7	61
2в	0,5	29±3	27,5±0,7	0
	1,0	56±1	46±3	18
	2,0	54±4	38±5	30
2г	0,5	72,5±3,5	67,5±3,5	0
	2,0	91±0	70±1	23
2д	0,5	42±1	25±1	41
	1,0	38±2	8±2	79
2e	0,5	54±3	33±3	39
	1,0	39±2	10±2	74
	2,0	88±6	22±0	75

$\text{Cl} > \text{NO}_2 > \text{CH}_3 > \text{H}$  для гидроксимидов.

Расположение веществ в таких рядах несколько нарушается при ингибировании меньшими или большими 0,1 мг количествами вещества. Характерно, что влияние изучаемых веществ на биолюминесценцию *in vitro* практически не связано с их липофильными свойствами.

При сравнении влияния исследуемых веществ на свечение интактных бактерий и реакцию биолюминесценции все вещества были разделены на 5 групп (табл.3).

Таблица 3  
Сравнение данных влияния на биолюминесценцию *in vivo* и *in vitro* сульфопроизводных янтарной кислоты

Вещества	Влияние <i>in vivo</i>	Влияние <i>in vitro</i>
2 а,е	0	-
1 б,в	-	-
2 б-г	-	-
1 г,е	+	-
2 д	+	-
1 а	-	0
1 д	+	0

Первую группу составили гидроксимидамы (2 а,е), которые ингибировали реакцию свечения, но не влияли на люминесценцию *in vivo*. Как было уже отмечено, причиной этого эффекта может быть плохая проницаемость мембран бактерий для этих веществ.

Во вторую группу вошли имидамы (1 а,б) и гидроксимидамы (2 б-г), для которых наблюдается ингибирование в обоих случаях, что связано с непосредственным ингибирующим воздействием этих веществ на люминесцентную систему бактерий.

В трех последних группах действие веществ на свечение бактерий более сложное. Так, вещества (1 г,е; 2 д) увеличивают свечение бактерий, но при этом ингибируют реакцию свечения. По-видимо-

му при этом влияние на *in vivo* и *in vitro* не связано, либо осуществляется опосредованно через какие-либо метаболические пути. Ингибирующее влияние имида (I а) и стимулирующее влияние имида (I д) не связано с их влиянием на люминесцентную систему.

Таким образом показано, что влияние сульфопроизводных янтарной кислоты различается для систем *in vivo* и *in vitro*. Полученные результаты могут быть интересны при обсуждении вопроса о локализации люциферазы в периплазматическом пространстве [6].

#### Методы исследования

Растворы веществ готовили следующим образом. Вещества I в, г растворяли в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,0 при нагревании до 40-60°C в термостате в течение нескольких часов. Вещества I а, б, д; 2 д-е в концентрации 1 мг/мл растворяли в 96% этаноле при нагревании до 40-60°C в термостате с последующим выдерживанием при комнатной температуре в течение суток. При этом вещества I а, д; 2 б, е оставались в этаноле в взвеси. В последнем случае в реакционную смесь добавляли взвесь, предварительно тщательно перемешанную.

Объектом исследования служила культура бактерий *Photobacterium phosphoreum* из коллекции Института биофизики СО АН СССР. Культуру выращивали на твердой питательной среде Егоровой [7] в течение 18 часов при 22 градусах, затем смывали 3% раствором NaCl, центрифугировали и ресуспендировали полусинтетической средой [8] с последующим доращиванием бактерий в течение 5 часов при перемешивании на мешалке до логарифмической фазы роста. Выросшую культуру вновь центрифугировали и ресуспендировали 3% раствором NaCl с добавлением глицерина (2 мл на литр), таким образом, чтобы количество бактерий было примерно  $10^9$  клеток/мл. Эту культуру светящихся бактерий использовали для исследования действия веществ.

2 мл суспензии бактерий помещали в кювету прибора "Биолюцинометр", регистрировали исходное свечение ( $I_1$ ), затем в кювету вводили 0,2 мл раствора исследуемого вещества и регистрировали  $I_2$ .

Эффективность ингибирования или стимулирования определяли по следующей формуле:

$$\frac{\Delta I}{I_1} = \frac{I_1 - I_2}{I_1} \cdot 100(\%)$$



Чем больше эта величина, тем больше эффект действия исследуемого вещества.

Действие исследуемых веществ на ультраструктуру светящихся бактерий изучали методом ультратонких срезов. Для этого культуру бактерий готовили так же, как и для измерения свечения *in vivo*. После 15 минут обработки имидами клетки отмывали от вещества и готовили из них электронно-микроскопические препараты [9], которые просматривали в электронном микроскопе JEM-100С при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Для измерений биолюминесценции *in vitro* использовали реакционную смесь общим объемом 800 мкл, содержащую:

1) 50 мкл 0,0025% раствора тетрадеканала (0,25% раствор тетрадеканала в метаноле разводили в 100 раз 0,1 М фосфатным буфером pH 7,0);

2) 10-20 мкл препарата люциферазы из *Photobacterium leiognathi*. Препарат был получен в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО АН СССР;

3) 230-240 мкл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,0;

4) 500 мкл раствора ФМН<sub>2</sub> ( $5,4 \cdot 10^{-5}$  М), полученного фотовосстановлением раствора ФМН той же концентрации в присутствии  $10^{-2}$  М ЭДТА, pH 7,0.

Исследуемые вещества вносили в реакционную смесь в количестве 5, 10 и 20 мкл перед добавлением ФМН<sub>2</sub>. При работе со спиртовыми растворами веществ в контроле в реакционную смесь дополнительно вносили соответствующее количество этанола.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на микрокалькуляторе "Электроника МК-51".

1. Макурина В.И., Черных В.П., Гриценко И.С. и др. Корреляции структура-активность производных аренсульфогидразидов янтарной кислоты // Хим.-фармац. журн. - 1986. - № 9. - С. 1095-1099.
2. Макурина В.И., Черных В.П., Гриценко И.С. та ін. Дослідження зв'язку структура-гіпогікемічна активність в ряду похідних аренсульфогідрозидів янтарної кислоти за допомогою комплексу програм "Ознака" // Фармац. журн. - 1986. - № 2. - С. 69-70.
3. Кратасюк В.А., Гительзон И.И. Бактериальная люминесценция и биолюминесцентный анализ // Биофизика. - 1982. - Т. 27, № 6. -

- С. - 937-953.
4. Кратасюк В.А., Гительзон И.И. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе // Успехи микробиологии. - 1986. - № 21. - С. 3-30.
  5. Макуріна В.І. Дослідження ліпофільних властивостей і констант іонізації біологічно активних сульфогідратидів дикарбонових кислот та їх похідних // Фармац.журн. - 1985. - № 5. - С.55-59.
  6. Межевикін В.В., Высоцкий Е.С., Заворуев В.В., Сальников М.В. О локализации люциферазы у светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* // ДАН СССР. - Т. 258, № 6. - С. 1470-1471.
  7. Egorova A.A. Leuchtbakterien im Schwarzen und im Azowischen Meere // Zbl. Bakt. Abt. - 1929. - Bd.2, N. 79. - S.168-173.
  8. Кузнецов А.М., Родичева Э.К., Рожавя Л.П. Полусинтетическая среда для светящихся бактерий рода *Photobacterium* // Изв.СО АН СССР (сер.биол.наук). - 1978. - № 5, вып.1. - С. 37-39.
  9. Медведева С.Е., Воробьева Т.И., Бирюзова В.И. Особенности ультраструктурной организации морских светящихся бактерий и их мутантов // Микробиология. - 1979. - Т.48, № 6. - С 1050-1054.

-----  
Ответственный за выпуск Байкина И.Н.

Подписано к печати 21.01.88г. АЛО6023  
Тираж 200 Заказ 27 Объем 0,5 п.л.  
Формат бумаги 60х90/16 Бесплатно  
-----