

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 2, Number 314 (2016), 28 – 33

INFLUENCES OF FS-1 MEDICINE ON THE CYTOPLASMATIC MEMBRANE OF *E.COLI*

S. Kassymbekova, B. Kerimzhanova, A. Ilyin

JSC "Scientific Center for Anti-Infectious Drugs", Almaty, Kazakhstan.
E-mail: s_kassymbekova@mail.ru

Keywords: Iodinated medicine FS-1, membrane permobilization, membrane lytic activity.

Abstract. According to WHO data presented in 2015, the mortality rate from infectious diseases takes the second place in the world after cardiovascular diseases, that is why it is actual today (WHO, 2015). The widespread introduction into clinical practice of antimicrobial agents led to the formation of drug resistance in microorganisms. Struggle against drug resistance has now taken a global dimension. At the same time one of the ways to overcome resistance of microorganisms to chemotherapeutic drugs is the creation of new chemotherapeutic agents, differing action to the antimicrobial mechanism. So there is a group of halogenated organic substances that are characterized by extremely high antibacterial and antiviral properties [2]. The JSC "Scientific Center for anti-infectious drugs" designed and synthesized compositions of iodine-containing ionic polymer-based systems. It developed a new iodinated drug FS-1 and received a patent for the RK №20129000 (2014.). The medical substance FS-1 is registered in the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan under № 248 from 04.08.2015 years. This article presents the results of studying the effects of medical substance FS-1 on bacterial membrane permeability in experimental culture *E.coli* and determination membrane lital drug activity.

УДК 615.281.9:611.018.821

ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ФС-1 НА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ *E.COLI*

С. С. Касымбекова, Б. Ф. Керимжанова, А. И. Ильин

АО «Научный центр противоинфекционных препаратов», Алматы, Казахстан

Ключевые слова: иодсодержащее лекарственное средство ФС-1, проницаемость клеточных мембран, мембранолитическая активность.

Аннотация. По данным ВОЗ, смертность от инфекционных болезней занимает второе место в мире после заболеваний сердечнососудистой системы, отсюда проблема является на сегодня актуальной (WHO, 2015). Широкое внедрение в клиническую практику противомикробных препаратов обусловило формирование лекарственной устойчивости у микроорганизмов. Борьба с лекарственной устойчивостью в настоящее время приобрела глобальные масштабы. При этом одним из путей преодоления резистентности микроорганизмов к химиопрепаратам является создание новых химиотерапевтических средств, отличающихся механизмом антимикробного действия. Так существует группа галогенпроизводных органических веществ, которым присущи экстремально высокие антибактериальные и противовирусные свойства [2]. В АО «Научный центр противоинфекционных препаратов» разработаны и синтезированы композиции иодсодержащих ионных комплексов на полимерной основе. Разработано новое иодсодержащее лекарственное средство ФС-1 и получен Патент РК за №20129000 (2014г.). Лекарственный препарат ФС-1 зарегистрирован в МЗ РК за № 248 от 08.04.2015 года. В статье представлены результаты изучения воздействия лекарственного средства ФС-1 на проницаемость бактериальной мембранны в эксперименте на культуре *E.coli* и определение мембранолитической активности препарата.

Известно, что иод нарушает структуры бактериальных трансмембранных белков и белков-ферментов, не имеющих мембранной защиты [3, 4].

Окисленные трансмембранные белки теряют свою кристаллическую структуру и нарушаются их функции. Окисление же мембранных фосфолипидов приводит к возрастанию подвижности полярных $-N^+-(CH_3)3$ -групп; увеличению вращательной подвижности С-С связей, что приводит к ускорению латеральной диффузии молекул через мембрану [5].

Также, по мнению некоторых авторов, окисление липидов приводит к ослаблению липид-белковых взаимодействий, что облегчает выход липидов из мембран и как следствия лизису бактериальной мембраны [6-8].

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния нового иодсодержащего лекарственного средства ФС-1 на бактериальную клетку.

Материалы и методы. В качестве модельного микроорганизма взят музейный штамм *E.coli* ATCC 25922, полученный с Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC).

Определение проницаемости интактных клеток проводили по методике, основанной на спектрофотометрическом измерении выхода низкомолекулярных соединений из бактериальных клеток [9]. При этом культивирование тестовых штаммов микроорганизма проводили на жидкой питательной среде. Сбор бактериальной массы культуры осуществляли в начале фазы стационарного роста. Затем проводили центрифугирование с целью очистки культуры от среды. Бактериальную суспензию готовили на физиологическом растворе с нейтральным pH (pH = 7,0) согласно стандарту мутности равной 1,5·10⁸ КОЕ/мл.

В работе использованы следующие концентрации ФС-1: 0,1; 0,05 и 0,025 мкг/мл. Положительным контролем служила суспензия *E.coli*, обработанная органическим буферным раствором (Rett Buffer), который заведомо повышает проницаемость мембран. Отрицательным контролем служила суспензия культур без воздействия ФС-1. Так же ставили «Бланки» – тестируемые концентрации ФС-1 на физ. растворе, которые как фон автоматически вычитались прибором с полученных экспериментальных данных. Для отрицательного контроля в качестве бланка брали чистый физ. раствор, а для положительного контроля – физ. раствор с Rett Buffer.

Оптическую плотность супернатанта замеряли в 5-ти повторах на спектрофотометре Smart Spec Plus при длине волны 260/280 нм.

Результаты эксперимента выражали в процентах по отношению к отрицательному контролю, принимаемому за 100 %.

Определение мембранолитической активности препарата ФС-1 проводили на сферопластах *E.coli* ATCC 25922 [9].

Получали сферопласти путем воздействия на культуру *E.coli* ферментным препаратом – лизоцимом. Чистоту выделенных сферопластов контролировали фазово-контрастной микроскопией мазков на микроскопе Leica DM 2500.

Исследуемые концентрации лекарственного средства ФС-1 были: 1000, 800, 600, 400, 300, 150, 100, 75, 50, 25, 5 и 1 мкг/мл.

Отрицательным контролем служила суспензия сферопластов без воздействия препарата ФС-1. Так же ставили тестируемые концентрации препарата ФС-1 в том же буфере, что и сферопласти суспендировали, и данную пробу использовали как «бланк» при замере оптической плотности.

Замеры оптической плотности проводили с помощью микропланшетного ридера Multiscan ascent и спектрофотометре Lamda 35 (Perkin Elmer, США) при длине волны 540 нм в течение 30 мин с интервалом в 5 мин.

Контроль лизиса сферопластов проводили после 30 мин замеров посредством высевов суспензий сферопластов на плотные питательные среды, которых инкубировали в термостате 24–48 ч при температуре 37 °C.

Результаты. В опытах изучения проницаемости мембраны клеток при воздействии различных концентраций лекарственного средства ФС-1 нами использован метод спектрофотометрической детекции выхода низкомолекулярных соединений из бактериальных клеток. Так как согласно литературным данным в естественных условиях из бактериальной клетки в среду их обитания выходят различные генетические элементы (таких как транспозоны, мобильных генетических элементов, РНК) а так же АТФ, АДФ и АМФ молекулярная масса которых не превышает 900 Д.

Так же они достаточно липофильны, то есть хорошо растворимы в липидах, что облегчает быстрое проникновение сквозь липидный бислой клеточной мембранны [10, 11]. В виду того, что внутри бактериальной клетки осмотическое давление в несколько раз, а иногда и в десятки раз выше, чем во внешней среде, при повышении проницаемости бактериальной мембранны липофильные низкомолекулярные соединения устремляются в наружу [12]. Тем самым могут служить как сигнальные молекулы изменения проницаемости цитоплазматической мембранны.

Исследования выхода низкомолекулярных соединений из клеток бактерии показали, что все тестируемые концентрации ФС-1 повышают проницаемость бактериальной клетки для выхода низкомолекулярных соединений в культуральную жидкость (рисунок 1).

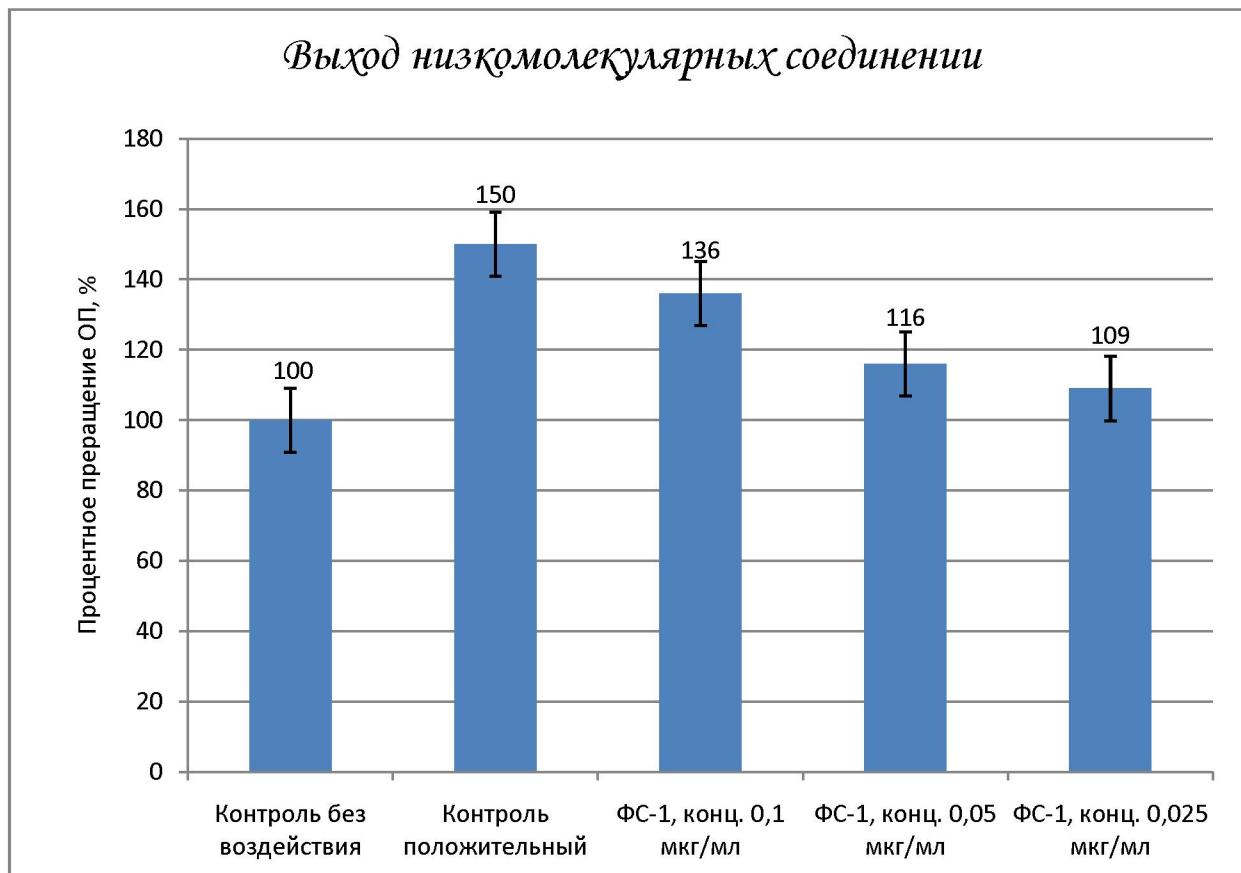


Рисунок 1 – Выход низкомолекулярных соединений из клеток *E.coli* на физиологическом растворе

Как показано на рисунке 1, выход низкомолекулярных соединений из бактериальной клетки под воздействием препарата ФС-1 в концентрации 0,1 мкг/мл на физ. растворе (pH = 7,0) увеличился на 36 %, а в концентрации 0,05 мкг/мл – на 16 %, и в концентрации 0,025 мкг/мл – на 9 %. Данный эксперимент проведен в пятикратной повторности.

Таким образом, исследуемый препарат ФС-1 способствует увеличению количества внутриклеточных низкомолекулярных соединений в культуральной жидкости, что в свою очередь свидетельствует о влиянии препарата ФС-1 на проницаемость, как клеточной мембранны, так и стенки.

Под клеточной стенкой располагается цитоплазматическая мембрана. Одной из основных функций цитоплазматической мембранны является участие в процессах дыхания и деления клетки. Поэтому следующим этапом исследования являлось изучение мембранолитической активности препарата ФС-1 на сферопластах т.е. на клетках лишенных частично клеточной стенки.

Данная методика основана на спектрофотометрических замерах оптической плотности сферопластов по изменению оптической плотности суспензии при длине волны 540 нм.

При фазово-контрастной микроскопии выделенных сферопластов полученная картина соответствовала литературным данным о сферопластах *E.coli* (рисунок 2).

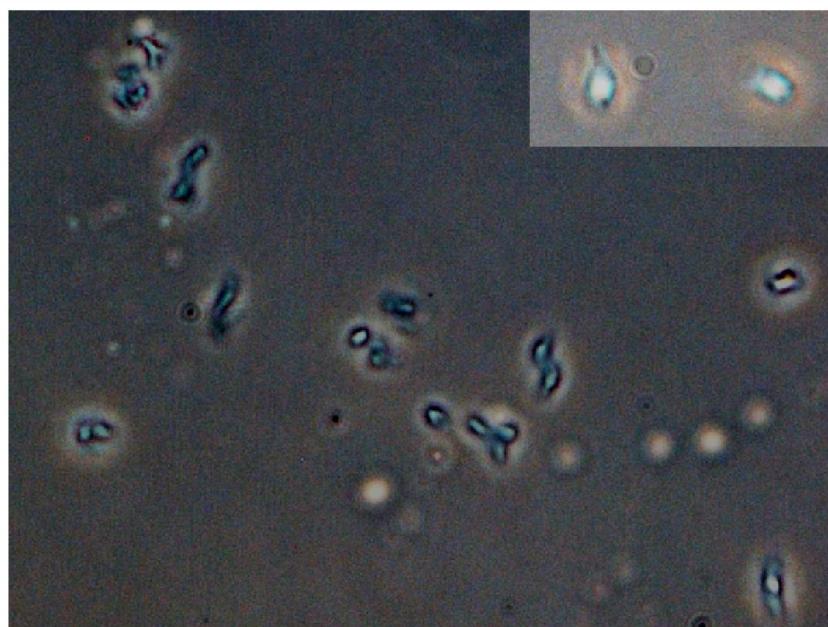


Рисунок 2 – Полученные сферопласты *E.coli* ATCC 8739.
Фазово-контрастная микроскопия, увл.10х100

Замеры на УФ-спектрометре Lamda 35 проводили в течение 30 мин с интервалом 5 мин. Такая временная экспозиция выбрана на основании литературных данных, согласно чему сферопласты в данном буферном растворе активны до 30 мин [9].

При проведении замеров выявлено, что концентрации ФС-1 от 800 по 100 мкг/мл, включительно, в буферном 1 М растворе сахарозы и 10 mM триплекс-НСl сохранял свой специфический цвет, что свидетельствовало о недостоверности результатов замера. Дальнейшими исследованиями установлено, что в результате замеров концентрации препарата ФС-1 от 75 по 1 мкг/мл скорость лизиса сферопластов *E.coli* прямо пропорционально исследуемой концентрации препарата ФС-1. Так наибольший лизис сферопластов наблюдали в концентрации препарата 75 мкг/мл, а наименьший при 1 мкг/мл соответственно как показано на рисунке 3.

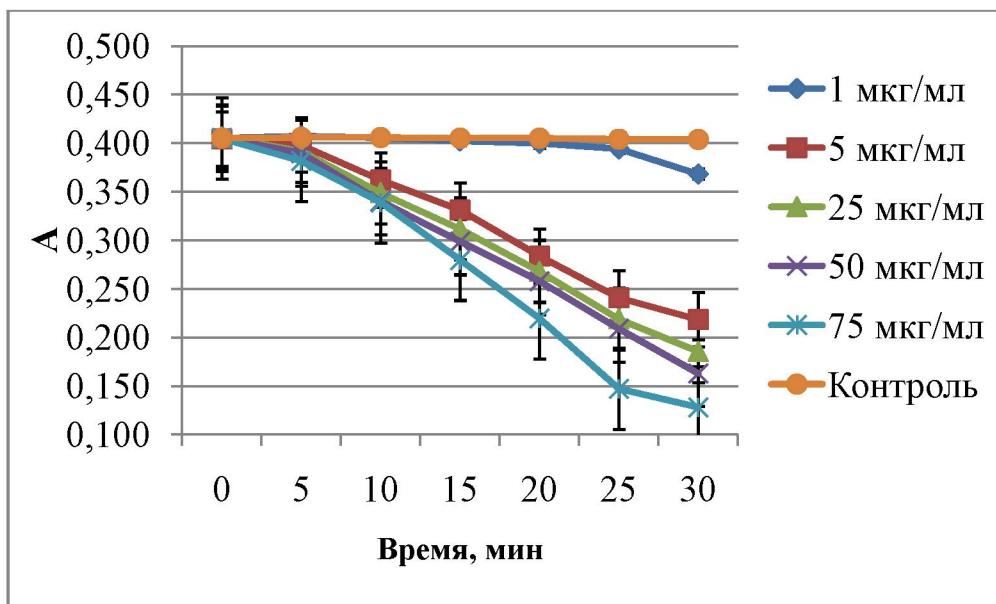


Рисунок 3 – Лизис сферопластов *E.coli* под воздействием препарата ФС-1

Как видно на рисунке 3, сферопласты уже с пятой минуты воздействия ФС-1 в концентрациях от 5 до 75 мкг/мл начинают лизироваться. Тогда как лизирующее действие препарата ФС-1 в концентрации 1 мкг/мл проявляется только после 25 мин воздействия.

Микробиологическими методами исследований в чашках с контрольными высевами суспензий сферопластов также наблюдается доза зависимый лизис сферопластов, как показано в таблице.

Бактериологический контроль лизиса сферопластов

Условия эксперимента	Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	
	до воздействия	после 30 мин воздействия
Контроль	$1,5 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$
1 мкг/мл ФС-1	$1,5 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^7$
5 мкг/мл ФС-1	$1,5 \cdot 10^8$	$8,2 \cdot 10^4$
25 мкг/мл ФС-1	$1,5 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^3$
50 мкг/мл ФС-1	$1,5 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^2$
75 мкг/мл ФС-1	$1,5 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^1$

Из данной таблицы видно, что после 30 мин воздействия лекарственного препарата в концентрации 75 мкг/мл число жизнеспособных клеток сократилось с $1,5 \cdot 10^8$ до $4,5 \cdot 10^1$ КОЕ/мл, т.е. более чем на 99,9 %.

Таким образом, йодсодержащее лекарственное средство ФС-1 способствует увеличению проницаемости как клеточной мембраны, так и бактериальной стенки.

Проведенными исследованиями установлено, что лекарственное средство ФС-1 обладает мембранолитической активностью, вызывая лизис клеток *E.coli*, частично лишенных клеточной стенки, и объясняя механизм бактерицидного действия.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] ВОЗ. Туберкулез // Информационный бюллетень. – Март, 2015. – № 104.
- [2] Hu J.M., Hsiung G.D. Evaluation of new antiviral agents, in vitro perspectives // Antiviral. Res. – 1989. – Vol. 11, № 5-6. – Р. 217-232.
- [3] Ткаченко Л.В., Веревкина О.П., Свиридова Н.И. и др. // Генекология. – 2004. – № 6. – Т. 2. – С. 65-67.
- [4] Тютюнник В.Л. Фарматека. – М., 2005. – № 2. – С. 20-23.
- [5] Болдырев А.А., Кайвяряйнен Е.И., Илюха В.А. Биомембронология: Учебное пособие. – Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2006. – 226 с.
- [6] Пепоян А.З., Мирзоян Н.С., Саакян М.О., Киракосян Л.А., академик Карагезян К.Г. Некоторые особенности антиокислительной системы бактериальных штаммов *Escherichia coli* G35 // Молекулярная биология. – 2001.
- [7] Козлова Н.М., Слобожанина Е.И., Антонович А.Н., Лукьяненко Л.М., Черницкий Е.А. Влияние восстановленного и окисленного глутатиона на физико-химическое состояние мембран эритроцитов // Биофизика. – 2001. – Т. 46, вып. 3. – С. 467-470.
- [8] Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP) // Enzyme and Microbial Technology. – 2002. – Vol. 30. – Р. 454-466.
- [9] Петрыкина З.М., Полин А.Н., Белостоцкая И.С., Комиссарова Н.Л., Вольева В.Б., Плеханова Л.Г., Ершов В.В. Антимикробная и мембранолитическая активность экранированных фенолов // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – № 8. – С. 11-15.
- [10] Биологические мембранны. Методы / Под ред. Финдлея Дж.Б., Уванза У.Г. – 1990. – 412 с.
- [11] Методы общей бактериологии: в 3 т.: Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхарда. – М.: Мир, 1983. – Т.1. – 1983. – 536 с.: ил. – Б. ц.
- [12] Bruce Alberts, et al. Molecular Biology of the cell. – 5th ed. – New York: Garland Science, 2007.

REFERENCES

- [1] VOZ. Tuberkeulez. Informacionnyj bjulleten'. Mart, 2015. № 104.
- [2] Hu J.M., Hsiung G.D. Evaluation of new antiviral agents, in vitro perspectives // Antiviral. Res. 1989. Vol. 11, № 5-6. P. 217-232.
- [3] Tkachenko L. V., Verevkina O.P., Sviridova N.I. i dr. Genekologija. 2004. № 6. T. 2. S. 65-67.

- [4] Tjutjunnik V.L. Farmateka. M., 2005. № 2. S. 20-23.
- [5] Boldyrev A.A., Kjajvjarajnen E.I., Iljuha V.A. Biomembranologija: Uchebnoe posobie. Petrozavodsk: Izd-vo Kar NC RAN, 2006. 226 s
- [6] A.Z. Pepojan, N.S. Mirzjan, M.O. Saakjan, L.A. Kirakosjan, akademik K.G. Karagezjan. Nekotorye osobennosti antiokislitel'noj sistemy bakterial'nyh shtammov Escherichia coli G35 // Molekuljarnaja biologija. 2001.
- [7] Kozlova N.M., Slobozhanina E.I., Antonovich A.N., Luk'janenko L.M., Chernickij E.A. Vlijanie vosstanovlennogo i okislenного glutatonia na fiziko-himicheskoe sostojanie membran jeritrocitov // Biofizika. 2001. T. 46. Vyp. 3. S. 467-470.
- [8] Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP) // Enzyme and Microbial Technology. 2002. Vol. 30. P. 454-466.
- [9] Petrykina Z.M., Polin A.N., Belostockaja I.S., Komissarova N.L., Vol'eva V.B., Plehanova L.G., Ershov V.V. Antimikrobnaja i membranoliticheskaja aktivnost' jekramirovannyh fenolov // Antibiotiki i himioterapija. 1998. № 8. S. 11-15.
- [10] Biologicheskie membrany. Metody. / Pod red. Findleja Dzh.B., Uvanza U.G. 1990. 412 s.
- [11] Metody obshhej bakteriologii: v 3 t.: Per. s angl. / Pod red. F. Gerharda. M.: Mir, 1983. T. 1. 1983. 536 s.: il. B. c.
- [12] Bruce Alberts, et al. Molecular Biology Of The Cell. 5th ed. New York: Garland Science, 2007.

ФС-1 ДӘРІНІҢ *E.COLI* ЦИТОПЛАЗМАЛЫҚ МЕМБРАНАҒА ӘСЕРІ

С. С. Қасымбекова, Б. Ф. Керімжанова, А. И. Ильин

«Инфекцияға қарсы препараттардың ғылыми орталығы» АҚ, Алматы, Қазақстан

Түйін сөздер: ФС-1 йоды бар дәрі, жасуша мембранның өткізгіштігі, мембраналитикалық белсенділігі.

Аннотация. ДДҰ деректері бойынша, жұқпалы аурулардан өлім-жітім, демек мәселе бүтінгі күнге дейін өзекті болып табылады, жүрек-қан тамырлары ауруларынан кейін әлемде екінші орынға шықты (WHO, 2015). Микробқа қарсы клиникалық тәжірибеде көнінен енгізу микроорганизмдердің дәріге тәзімділігін қалыптастырыды. Дәріге тәзімділікпен күрес қазіргі уақытта жаһандық деңгейге ие болды. Сонымен қатар химиотерапиялық препараттарға микроорганизмдердің қарсылық енсеру жолдарының бірі микробқа қарсы әрекетінің құрылымымен ерекшеленетін жаңа химиотерапевтикалық дәрілер өндіру. Соңыктан бактерия мен вирусқа қарсы өте жоғары қасиеттерге көрсету галогенденген органикалық заттардың тобы бар. «Инфекцияға қарсы препараттардың ғылыми орталығы» АҚ-да иондық полимер негізінде йодталған кешендер мен композициялар құрастырылып синтезделген. ФС-1 йоды бар дәрі өнделген және КР №20129000 (2014 ж.) Патенті алынды. ФС-1 дәрісі КР Денсаулық сактау министрлігінде № 248 08.04.2015 ж. тіркелген. Макалада *E.coli* дақылы мен препараттың қызметін анықтау бойынша экспериментке бактериялық мембранасының өткізгіштігінің ФС-1 дәрінің зерттеу әсерінің нәтижелері ұсынылған.

Поступила 05.04.2016 г.