

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского  
Серия «Биология, химия». Том 27 (66). 2014. № 2. С. 186-195.

УДК 577.113

## ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КОМБИНАЦИЙ ДНК-ИНТЕРКАЛЯТОРОВ С КОФЕИНОМ НА ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БАКТЕРИИ

Кацев А.М.<sup>1</sup>, Скамрова Г.Б.<sup>2</sup>, Евстигнеев М.П.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского,  
Симферополь, Республика Крым, Российская Федерация

<sup>2</sup>Севастопольский национальный технический университет, Севастополь, Республика  
Крым, Российская Федерация

<sup>3</sup>Белгородский государственный университет, Белгород, Российская Федерация  
E-mail: katsev@mail.ru

В настоящее время одним из перспективных направлений развития медикаментозного лечения различных заболеваний является комбинированное использование различных лекарственных препаратов. Целью работы было выявление закономерностей проявления, а также поиск механизма совместного влияния комбинации ароматических соединений на *in vitro* уровне. С помощью биотеста на основе морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1 изучали концентрационно-зависимый протекторный эффект действия кофеина на типичные мутагенные препараты профлавинов и бромистый этидий, который заключался в восстановлении бактериального свечения при введении кофеина. Полученные данные косвенно указывают на то, что в основе наблюдаемого протекторного эффекта лежит интерцепторный механизм, обусловленный гетероассоциацией препаратов с кофеином. Это также дает основание утверждать, что биолюминесценция нативных светящихся бактерий является показателем биологического эффекта ароматических токсических соединений и их комбинаций.

**Ключевые слова:** биолюминесцентный тест, профлавинов, бромистый этидий, кофеин, *Photobacterium leiognathi*.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одним из перспективных направлений развития медикаментозного лечения различных заболеваний является комбинированное использование различных лекарственных препаратов, взаимно-дополняющих, либо взаимно-усиливающих эффект друг друга. Лекарственные препараты, основой которых являются ароматические соединения, достаточно широко используются в комбинированной терапии раковых заболеваний [1]. Считается, что одним из возможных механизмов совместного действия ароматических соединений может выступать нековалентное комплексобразование таких молекул в биологической

жидкости, модулирующее медико-биологическую активность препаратов – так называемый интерцепторный механизм действия [2, 3]. Многочисленные подтверждения этой гипотезе были обнаружены на *in vitro* уровне для различных клеточных систем и комбинаций ароматических препаратов с такими ароматическими молекулами как кофеин [4, 5], рибофлавин [6], хлорофиллин [7, 8] и некоторых других (называемыми интерцепторами или перехватчиками [2, 3]). Более того, существуют основания полагать, что интерцепторный механизм является общезначимым для биологических *in vitro* систем, содержащих смесь препарат-интерцептор, и не зависящим от вида клеточной культуры и способа регистрации биологического отклика [9, 10].

В настоящей работе с целью выявления закономерностей проявления, а также поиска механизма совместного влияния комбинации ароматических соединений на *in vitro* уровне, нами был впервые использован биолюминесцентный тест на основе морских светящихся бактерий. Такие тест-объекты реагируют изменением интенсивности свечения на любые колебания метаболизма, поэтому многие вещества с различными механизмами действия могут быть оценены с использованием такого метода. По данным [11], как ингибирование биолюминесценции, так и ее активирование более чем на 50%, связано с проявлением токсичности. Этот принцип широко описан в литературе и используется для оценки экотоксичности водных сред. С другой стороны биолюминесцентный метод основан на точном измерении физического сигнала - интенсивности излучаемого света, что приближает его к более точным физико-химическим методам. В качестве действующих веществ нами использовались классические комбинации кофеина с ДНК-связывающимися ароматическими мутагенами: профлавином и бромистым этидием.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ДНК-интеркаляторы бромистый этидий (БЭ), профлавин (ПФ), и кофеин (КАФ) производства фирмы Sigma (USA). Биолюминесцентный анализ проводили с помощью светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1, выделенных из Азовского моря и обладающих высокой чувствительностью к действию токсических факторов различной природы, а также высокой скоростью роста [12, 13].

Изучение острого действия веществ (токсичности). Подготовку бактерий для биотестирования осуществляли следующим образом. Музейную культуру, которая хранилась на полужидком агаре под вазелиновым маслом, высевали на жидкую питательную среду. После инкубации при температуре 30 °С, бактерии анализировали визуально на наличие биолюминесценции. При выявлении свечения, бактерии с жидкой питательной среды высевались на твердую среду с рассевом до отдельных колоний. Для следующего пересева отбирали наиболее ярко светящуюся колонию, которую пересевали на жидкую питательную среду и использовали для проведения биотестирования.

Полученную на предыдущем этапе бактериальную культуру разводили 3 % хлоридом натрия до концентрации клеток  $5 \cdot 10^5$  кл/мл. Для определения острого действия (токсичности) образцов, в кюветах люминометра смешивали 0,8–0,9 мл

тестируемого раствора в 2,5–3%-ом растворе NaCl, 100 мкл буферного раствора с рН=7,0 и 50 мкл бактериальной суспензии. Регистрировали изменение интенсивности биолюминесценции в течение 30–120 минут с использованием самописца. Результаты представляли в виде зависимости интенсивности биолюминесценции  $I=(I_t/I_0) \cdot 100$  (%) (где  $I_t$  – интенсивность биолюминесценции в присутствии вещества;  $I_0$  – интенсивность биолюминесценции в контроле), от концентрации вещества.

Хроническое действие (токсичность) определяли по эффекту тестируемого объекта на рост и биолюминесценцию светящихся бактерий. В кюветы люминометра вносили 0,8–0,9 мл 3%-го раствора хлорида натрия, 5–50 мкл тестируемого образца и 50 суспензии светящихся бактерий. После измерения биолюминесценции в пробы вносили 20–50 мкл стерильной среды для светящихся бактерий и помещали их в термостат при температуре 30°C на 16 ч. Измерение биолюминесценции и обработку результатов проводили аналогично методике определения острого действия.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Раздельное исследование действия мутагенных веществ на биолюминесценцию светящихся бактерий показало, что при концентрации до 0,1 мг/мл (ПФ – 0,4 ммоль/л; БЭ – 0,25 ммоль/л), а для кофеина – до 1 мг/мл (5,2 ммоль/л) и времени контакта с бактериями до 60 мин, все они действуют аналогичным образом, ингибируя бактериальную биолюминесценцию. Для БЭ отмечалось некоторое возрастание свечения при концентрациях до 0,05 ммоль/л (рис. 1-3).

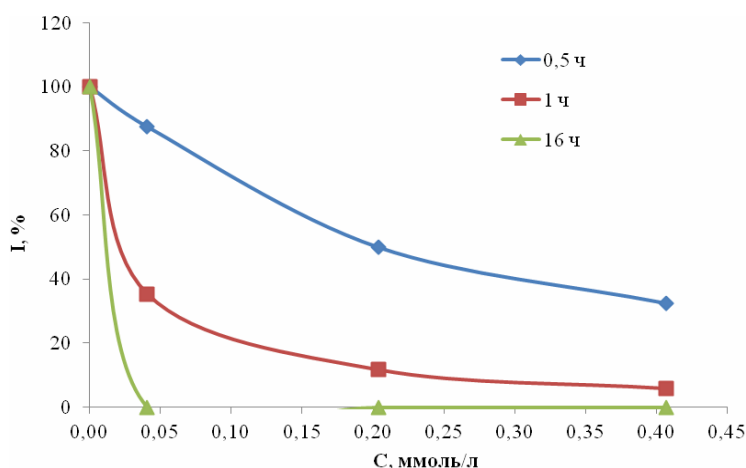


Рис. 1. Острое и хроническое действие профлафина на биолюминесценцию *P. leiognathi* Sh1.

Оценка хронического действия веществ выявила их разнонаправленный характер: КАФ и БЭ приводили к значительному возрастанию интенсивности бактериального свечения, ПФ – к полному её тушению (рис. 1–3). При этом биологический эффект проявлялся при более низких концентрациях, чем острое

действие. Дальнейшее снижение концентрации веществ и определение их эффективных значений, при которых происходило увеличение или снижение биолюминесцентного сигнала в 2 раза ( $ЭК_{50}$ ), показало, что для БЭ и ПФ они соответственно равны 0,002 и 0,008 ммоль/л.

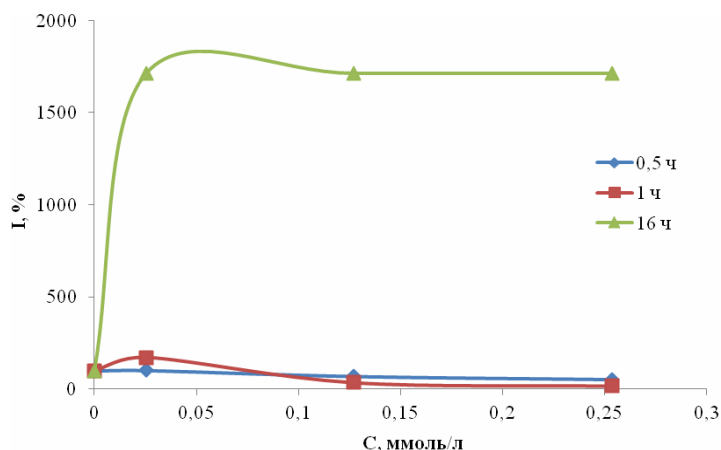


Рис. 2. Острое и хроническое действие бромистого этидия на биолюминесценцию *P. leiognathi* Sh1.

Как показано в работе [14], разнонаправленный характер влияния мутагенных веществ на светящиеся бактерии связан с двумя процессами. Повышение люминесценции является результатом взаимодействия с нуклеиновыми кислотами и мутагенного действия, в то время как, ингибирование свечения определяется токсичностью. Для одного и того же штамма светящихся бактерий при низких концентрациях веществ-мутагенов ПФ и БЭ наблюдалась стимуляция биолюминесценции, а при более высоких – ее снижение. При этом кофеин, даже при концентрациях на порядок выше остальных веществ, проявлял только мутагенные свойства, но не токсические. Полученные результаты указывают на то, что наблюдаемая в данной работе реакция бактериальной культуры на ароматические мутагены в виде изменения биолюминесценции является результатом совместного действия токсического и мутагенного эффектов, причем при близких значениях молярных концентраций ПФ проявляет токсические свойства в тесте на хроническое действие, а БЭ – мутагенные. Это совпадает с данными [15], а также с тем, что ПФ используется в качестве бактериостатического лекарственного средства. Отметим, что по данным разных авторов (см. [16, 17] и ссылки в них) равновесная константа комплексообразования БЭ с нативной ДНК в несколько раз превышает константу для ПФ, что в целом косвенно подтверждает роль ДНК в интерпретации механизма обнаруженной разнонаправленности.

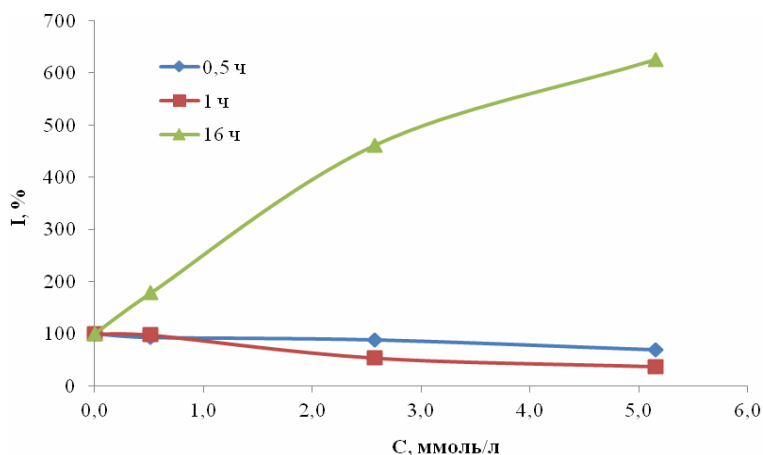


Рис. 3. Острое и хроническое действие кофеина на биолуминесценцию *P. leiognathi* Sh1.

При изучении совместного действия кофеина и ДНК-интеркаляторов с использованием методики оценки острого действия (1 ч) было установлено, что при соотношениях кофеин/препарат приблизительно 100:1 (моль/моль) происходит восстановление биолуминесценции до уровня 100% (рис. 4). При использовании методики оценки хронической токсичности, наблюдалась концентрационно-зависимая отмена разнонаправленного действия интеркаляторов на светящиеся бактерии под действием КАФ, которая выражалась в снижении биолуминесценции, активированной БЭ, и восстановлении свечения, ингибированного ПФ (рис. 5). Отмеченные эффекты наблюдались при соотношениях КАФ/препарат 100–200, что совпадает с результатами, полученными при использовании методики оценки острого действия.

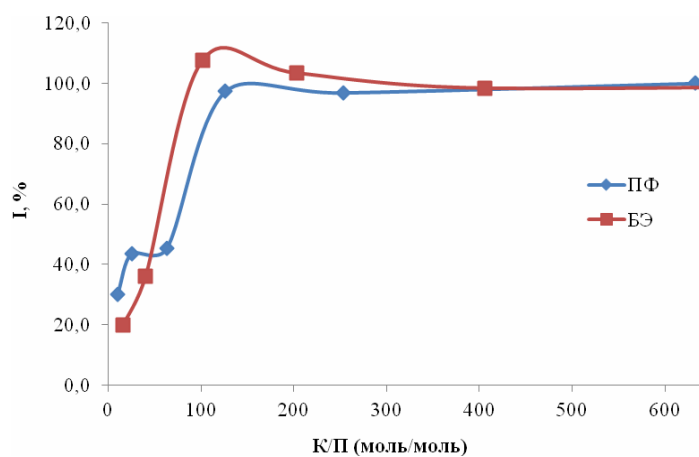


Рис. 4. Острое действие ПФ и БЭ в присутствии КАФ (по оси X: К/П – соотношение кофеин/препарат, моль/моль).

Таким образом, несмотря на разнонаправленность действия исследуемых веществ, полученные результаты указывают на «протекторный эффект» кофеина по отношению, как к мутагенному, так и токсическому действиям ДНК-интеркаляторов. Концентрационно-зависимый протекторный эффект кофеина в различных клеточных [18] и бактериальных [4, 5] системах в присутствии токсичных ароматических соединений известен в литературе достаточно давно. Важно подчеркнуть, что в системах Препарат-Кофеин типичный протекторный эффект проявляется при концентрациях КАФ на 2–3 порядка больших, чем концентрации действующего вещества, что хорошо согласуется с соотношением концентраций КАФ/Препарат, представленным на рис. 4.

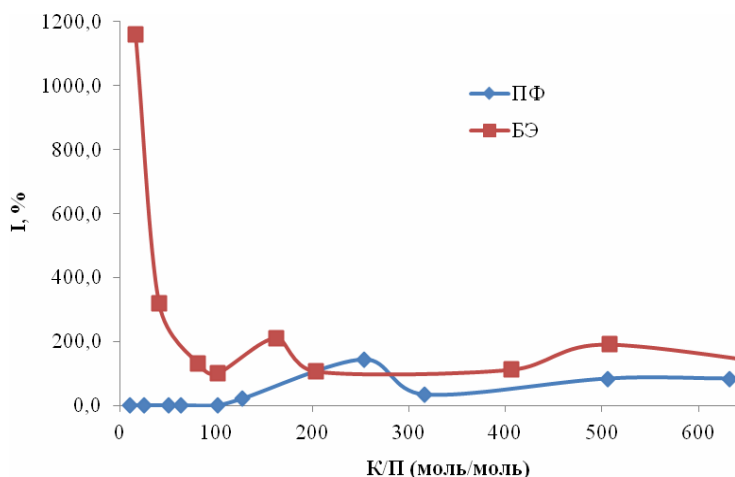


Рис. 5. Хроническое действие ПФ и БЭ в присутствии КАФ (по оси X: К/П – соотношение кофеин/препарат, моль/моль).

По нашим данным, в подавляющем большинстве случаев, интерпретация протекторному эффекту, даваемая различными авторами, сводится к так называемому механизму интерцепторного действия, суть которого заключается в следующем [2–10, 18]. Ароматические молекулы препарата и кофеина, присутствующие в исследуемой культуре *одновременно*, способны образовывать нековалентные гетерокомплексы друг с другом, стабилизированные стэкинг-взаимодействиями ароматических хромофоров. Такой гетерокомплекс является «неактивным» в биологическом смысле, следовательно, гетероассоциация уменьшает число «активных» мономерных форм препарата, способных вызвать биологический эффект. Это приводит к протекторному эффекту, наблюдаемому, в частности, и в настоящей работе. Полученные результаты также показывают, что одни и те же концентрации кофеина защищают как от мутагенного эффекта БЭ, так и от токсического эффекта ПФ. Согласно теории интерцепторно-протекторного действия [2, 9] протекторный эффект КАФ в отношении ПФ должен проявляться в большей степени, чем КАФ-БЭ вследствие более высокой константы

гетероассоциации ПФ-КАФ ( $K_h=160 \text{ M}^{-1}$ ) по сравнению с БЭ-КАФ ( $K_h=62 \text{ M}^{-1}$ ) [9]. Полноценная проверка этой гипотезы в рамках настоящей работы не представляется возможной и составляет предмет дальнейшего специального исследования. Вместе с тем предварительные данные указывают на то, что в исследуемых системах при коротковременной экспозиции препаратов, кофеина и бактерий происходит однонаправленное ингибирование биолюминесценции под действием интеркаляторов, оказывающее наибольшее влияние именно на систему с ПФ, в то время как в системе БЭ-КАФ эффект ингибирования выражен намного слабее, что находится в согласии с предсказанием теории интерцепторно-протекторного действия.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе обнаружен концентрационно-зависимый протекторный эффект действия кофеина на биолюминесценцию культуры светящихся бактерий *P. leiognathi* Sh1, содержащую типичные мутагенные препараты ПФ и БЭ, и заключающийся в восстановлении биолюминесцентного сигнала при введении КАФ. Эффект кофеина проявляется при различных концентрациях препаратов при остром (длительность выдержки культуры менее, либо равное 1 час) и хроническом (длительность выдержки 16 ч) действии.

Полученные данные косвенно указывают на то, что в основе наблюдаемого протекторного эффекта лежит интерцепторный механизм, обусловленный гетероассоциацией препаратов с кофеином, хорошо известный из литературных данных для других клеточных систем. Это также дает основание утверждать, что биолюминесценция нативных светящихся бактерий является показателем биологического эффекта ароматических токсических соединений и их комбинаций.

### Список литературы

1. Chu E. Physicians' cancer chemotherapy drug manual / E. Chu, V.T. DeVita // L.: Jones and Bartlett Publ. – 2003. – 512 p.
2. Evstigneev M. P. DNA-binding aromatic drug molecules: Physico-chemical interactions and their biological roles / M. P. Evstigneev // Saarbrücken: Lambert Academic Publishing. – 2010. – 96 p.
3. Evstigneev M. P. Physicochemical mechanisms of synergistic biological action of combinations of aromatic heterocyclic compounds / M. P. Evstigneev // Org. Chem. Int.–2013. ID 278143-10. - Режим доступа: <http://www.hindawi.com/journals/oci>.
4. Alleviation of mutagenic effects of polycyclic aromatic agents (quinacrine mustard, ICR-191 and ICR-170) by caffeine and pentoxifylline / J. Piosik, K. Ulanowska, A. Gwizdek-Wiśniewska, [et. al.] // Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen. – 2003. – Vol. 530, № 1–2. – P. 47–57.
5. Woziwodzka A. Caffeine, pentoxifylline and theophylline form stacking complexes with IQ-type heterocyclic aromatic amines / A. Woziwodzka, A. Gwizdek-Wiśniewska, J. Piosik // Bioorg. Chem. – 2011. – Vol. 39, № 1. – P. 10–17.
6. Ramu A. The riboflavin-mediated photooxidation of doxorubicin / A. Ramu, M.M. Mehta, J. Liu, I. Turyan, A. Aleksic // Cancer Chemother. Pharmacol.–2000. – Vol.46. – P. 449-458.
7. Dashwood R. Antimutagenic potency of chlorophyllin in the Salmonella assay and its correlation with binding constants of mutagen-inhibitor complexes / R. Dashwood, D. Guo // Environ. Mol. Mutagen. – 1993. – Vol. 22, № 3. – P. 164–171.

8. Attenuation of acridine mutagen ICR-191 – DNA interactions and DNA damage by the mutagen interceptor chlorophyllin / M. Pietrzak, H. Dorota Halicka, Z. Wiczorek [et. al.] // *Biophys. Chem.* – 2008. – Vol. 135, № 1-3. – P. 69–75.
9. Quantitation of the molecular mechanisms of biological synergism in a mixture of DNA-acting aromatic drugs / M. P. Evstigneev, A. O. Lantushenko, V. P. Evstigneev, Y. V. Mykhina, D. B. Davies // *Biophys. Chem.* – 2008. – Vol. 132, № 2–3. – P. 148–158.
10. Application of the theory of interceptor and protector action on the data from the biological experiment in vitro / A. S. Buchelnikov, V. A. Rubakina, A. A. Mosunov, M. P. Evstigneev // *Biophys. Bulletin of Karazin National Univ.* – 2013. – Vol. 30, № 2. – P. 106-117.
11. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д.Г. Дерябин. – М: Наука, 2009. – 248 с.
12. Кацев А. М. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей / А. М. Кацев, Джон Макемсон // *Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского, серия «Биология, химия».* – 2006. – Т. 19, № 4. – С. 111–116.
13. Katsev A. M. Effects of hydrogen peroxide on light emission by various strains of marine luminescent bacteria / A. M. Katsev, G. Wegrzyn, H. Szpilewska // *J. Basic Microbiol.* – 2004. – Vol. 44, № 3. – P. 178–184.
14. Agata C. Induction of light emission by luminescent bacteria treated with UV light and chemical / C. Agata, P. Konrad, G. Wegrzyn // *J. Appl. Genet.* – 2002. – Vol. 43, № 3. – P. 377-389.
15. Lewis R. J. *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials.* 9th ed. / R. J. Lewis // NY: Van Nostrand Reinhold. – 1996. – Vol. 1, № 3. – P. 1027–1031.
16. Complexation of heterocyclic ligands with DNA in aqueous solution / S. F. Baranovskii, P. A. Bolotin, M. P. Evstigneev, D. N. Chernyshev // *J. Appl. Spectr.* – 2008. – Vol. 75. – P. 251–260.
17. Interaction of ethidium bromide and caffeine with DNA in aqueous solution / S.F. Baranovsky, P.A. Bolotin, M. P. Evstigneev, D. N. Chernyshev // *J. Appl. Spectr.* – 2009. – Vol. 76. – P. 132–139.
18. Traganos F. Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drugs in vitro: A flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with novantrone, doxorubicin, ellipticine, and the doxorubicin analogue AD198 / F. Traganos, J. Kapuściński, Z. Darzynkiewicz // *Cancer Res.* – 1991. – Vol. 51, N 14. – P. 3682–3689.

**Кацев А.М. Вивчення біологічної дії комбінацій ДНК-інтеркаляторів з кофеїном на люмінесцентні бактерії / А.М. Кацев, Г. Б. Скамрова, М.П. Євстигнєєв // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Биология, химия”. – 2014. – Т. 27 (66), № 2. – С. 186-195.**

На даний час одним з перспективних напрямків розвитку медикаментозного лікування різних захворювань є комбіноване використання різних лікарських препаратів. **Мета.** Виявлення закономірностей прояву, а також пошук механізму спільного впливу комбінації ароматичних сполук на *in vitro* рівні. **Методи.** Біоломінесцентний тест на основі морських світних бактерій. **Результати.** У даній роботі виявлений концентраційно-залежний протекторний ефект дії кофеїну на біоломінесценцію культури світних бактерій *P. leiognathi* Sh1, що містить типові мутагенні препарати профлавін і бромистий етидій, і що полягає у відновленні біоломінесцентного сигналу при введенні кофеїну. **Висновки.** Отримані дані опосередковано вказують на те, що в основі спостережуваного протекторного ефекту лежить інтерцепторний механізм, обумовлений гетероасоціацією препаратів з кофеїном. Це також дає підставу стверджувати, що біоломінесценція нативних світних бактерій є показником біологічного ефекту ароматичних токсичних сполук та їх комбінацій.

**Ключові слова:** біоломінесцентний тест, профлавін, бромистий етидій, кофеїн, *Photobacterium leiognathi*.