

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Казанский национальный исследовательский технологический  
университет»**

**«НОБЕЛЕВСКИЕ НАДЕЖДЫ КНИТУ - 2020»**

Номинация «Биотехнология»

Научно – исследовательская работа

**«ГЕНОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НОВОЙ ПРОИЗВОДНОЙ  
ФУРАНОНА, ВОЗМОЖНОГО АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО  
ПРЕПАРАТА»**

**Выполнил(а):** Набиуллин Арслан Даниясович  
Ученик 11 класса  
Политехнического лицея № 182  
г. Казани

**Научный руководитель:**  
Доцент кафедры генетики ФГАОУ ВО КФУ, Бабынин Э.В.

Казань, 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
<b>ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	4
1.1 Система чувства кворума.	4
1.2 Чувство кворума и образование биопленок.	6
1.3 Подавление чувства кворума и контроль образования биопленок.	7
1.4 Фураноны –ингибиторы системы чувства кворума.	9
1.5 Действие фуранонов в подавлении бактериальной сигнальной системы.	10
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	14
<b>ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	14
2.1 Объект исследования.	14
2.2 Используемые среды и реактивы.	15
2.3 Тест Эймса.	16
2.4 Определение влияния соединения на систему quorum-sensing.	16
2.5 SOS-lux тест.	17
2.6 Тест <i>Allium sera</i> .	18
2.7 Определение митотической активности тканей.	18
2.8 Статистическая обработка результатов.	19
<b>ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	19
3.1 Оценка мутагенности тестируемого соединения F15 с помощью теста Эймса.	19
3.2 Определение влияния тестируемого соединения F15 на систему quorum-sensing.	20
3.3 Оценка результатов SOS-lux теста.	21
3.4 Оценка мутагенности нового производного фуранона с использованием тест-системы <i>Allium sera</i> .	22
Вывод	23
Список использованных источников	24

## **Введение**

Quorum sensing - способность бактериальной клетки создавать коммуникацию между ними и обеспечивать регулирование фенотипа [Dobretsov *et al.*, 2009; Sauer *et al.*, 2002]. Тесную взаимосвязь QS имеет с образованием биопленок. Основная задача заключается в возникновении у бактерий, живущих в форме биопленки, более высокой степени резистентности и защиты от антимикробных соединений [Davies, 2003]. Для устранения биопленок с их сложным строением требуется избыточное использование антибиотиков или синтетических противомикробных препаратов, что приводит к возникновению устойчивости у микроорганизмов к противодействующим веществам. В подавлении QS не затрагивается выживаемость бактериальной клетки, поэтому при ингибировании чувства кворума нет влияния на жизнеспособность бактерий, и отсутствуют последствия, наблюдаемые после действия антибиотиков [Williams, 2002; Bjarnsholt *et al.*, 2008; Lowery *et al.*, 2010; Uroz *et al.*, 2009].

Различные природные соединения, такие как ванилин, фураноны и несколько типов ферментов являются веществами-ингибиторами чувства кворума, не препятствуя росту бактериальных клеток [Ponnusamy *et al.*, 2009; Eberl *et al.*, 1999; Truchado *et al.*, 2012; Rudrappa *et al.*, 2008; Paul *et al.*, 2009; Ohetal., 2012]. В настоящий момент, исследования в данной тематике вызывают интерес с практической целью. Новые разработки аналогов ингибиторов QS найдут применение в медицине. Однако, для внедрения любого соединения в народно-хозяйственную деятельность требуется установление безопасности этих соединений для здоровья человека.

**Целью** работы является выявление цитотоксичности и мутагенной активности 4-бензил-сульфонил- 5-гидрокси-3-хлор-2 (5H) -фуранона (F15).

### **Задачи:**

- 1) Определить мутагенность нового производного фуранона F15 в тесте Эймса.
- 2) Определить влияние соединения F15 на систему quorum-sensing.
- 3) Определить генотоксичность соединения F15 в SOS-lux тесте.

4) Оценить мутагенность нового производного фуранона с использованием тест-системы *Allium cepa*.

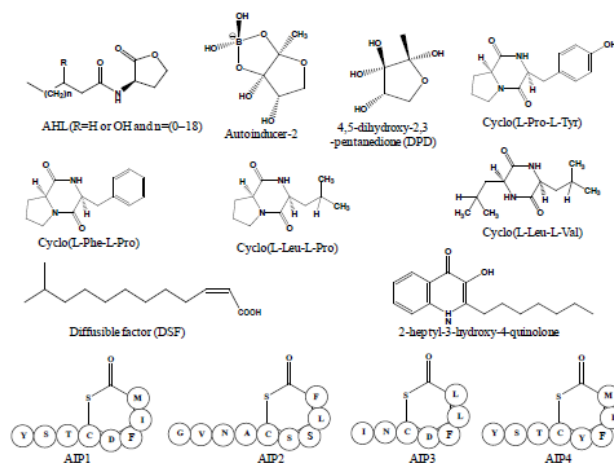
## ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Система чувства- кворума.

Бактериальные клетки используют язык, аутоиндукторов, состоящий из небольших подвижных сигнальных молекул. Молекулы осуществляют связь между бактериальными клетками, участвуют в оценке плотности клеток. Такая система и названа чувством кворума.

Механизм основан на синтезе, высвобождении и поглощении аутоиндукторов в окружающей среде, чья концентрация коррелирует с плотностью бактерий в непосредственной близости. Основной механизм QS включает в себя взаимодействие аутоиндуктора с регулятором транскрипции, либо непосредственно, либо путем активации чувствительной киназы [Choudhary *et al.*, 2010]. Как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии используют видоспецифические аутоиндукторы для активации системы чувства кворума. Сигнальные молекулы QS работают как местные датчики для коммуникации бактериальных клеток. Эти сигнальные молекулы и их рецепторы подразделили на три основных класса (рисунок 1): N-ацилгомосерин лактоны (AHL), олигопептиды, или аутоиндуцированные пептиды (AIP), и аутоиндуктор-2 (AI-2).

Молекулы класса AHL, состоят из гомосеринлактонового кольца и боковых ацильных групп, различаются молекулы по длине и степени окисления ацил-боковой цепи, и продуцируются грамотрицательными бактериями. Пептиды AIP, содержат 5-34 аминокислотных остатков, используются грамположительными бактериями. AI-2 или производное рибозы [4,5-дигидрокси-2,3-пентандион], участвует в QS грамположительных и грамотрицательных бактериях для межвидовой коммуникации [Waters *et al.*, 2005; Reading *et al.*, 2006].



**Рисунок 1 - Структурные формулы классов сигнальных молекул бактерий QS. [Waters *et al.*, 2005; Reading *et al.*, 2006]**

В работах [Chhabra *et al.*, 2005; Williams, 2007] разнообразие структур аутоиндукторов были идентифицированы в грамположительных и грамотрицательных бактериях. Большинство из них это маленькие (<1000 дальтон) пептиды или органические молекулы, состоящие из 5-20 аминокислот. Грамотрицательные бактерии используют ряд соединений, которые участвуют в QS. Среди которых можно выделить: AHL, 2- гептил-3- гидроксид-4- хинол, жирные кислоты длинной цепи и их метиловые эфиры, а также группу взаимозаменяемых фуранонов, полученных из (S)-4,5dihydroxy-2,3-pentandione (DPD), называемых АИ-2.

Производная рибозы АИ-2 также продуцируется грамположительными бактериями, но эти организмы обычно предпочитают линейные, измененные или циклические пептиды АИР, синтезированные *Staphylococcus sp.* [Yarwood *et al.*, 2004; George *et al.*, 2007]. Фактор диффузии - с-бутиролактон, произведенный *Streptomyces sp.*, структурно родственен с AHL, поскольку оба класса принадлежат к бутанолидам. AHL и АИР, в целом, произведенные грамотрицательными и грамположительными бактериями, вовлечены обычно в сигнальную систему чувства кворума и наиболее исследованы. Многие из этих сигнальных молекул чувство кворума химически разнообразны и видоспецифичны, часть из них могут выступать в качестве межвидовой

коммуникации. Такие сигнальные молекулы обладают биологическими свойствами, выходящими далеко за пределы их роли в координации экспрессии генов в штамме-продуцента. Чувство кворума позволяет клеткам принимать сигналы других бактерий, и использовать эту информацию для своих целей. Необходимость AHL обусловлена работой QS, которая влияет на поведение грамотрицательных и фенотип грамположительных бактерий. Грамположительные бактерии используют линейный, модифицированные или циклические пептиды, такие как AIP, для регуляции фенотипа. Система кворума координирует поведение клеток, для увеличения питательной доступности, коллективной защиты от противодействующих организмов или спасения сообщества от неблагоприятных условий [Williams, 2007]. С открытием механизма регуляции системы кворума у бактерий, были описаны многочисленные подобные системы. Чувства кворума регулируют различные функции в грамотрицательных и грамположительных бактериях, включая в себя формирование биопленок, биолюминесценцию, фактора вирулентности, факторы подвижности, производства экзополисахаридов, антибиотиков и эндогликаназы, компетентность и т.д.

## **1.2 Чувство кворума и образование биопленок.**

Чувство кворума и образование биопленок взаимосвязанные явления в бактериальной клетке [Bassler *et al.*, 2006; Davey *et al.*, 2000; Hell-stoodley *et al.*, 2004]. Совместная работа этих процессов позволяет бактериям организовать их деятельность на уровне популяции клеток, позволяющая перейти к плотной многоклеточной структуре в виде биопленок [Kaufmann *et al.*, 2008]. Биопленки - матрично заключенные бактериальные клетки, присоединенные друг к другу [Costerton *et al.*, 2005]. Сложная многослойная структура помогает популяции существовать в прикрепленном виде [O'toole *et al.*, 2000; Greenberg, 2003]. Образование биопленки связано с взаимодействующими процессами, начиная с секреции сигнальных молекул, их диффузии, синтеза EPS-матрикса,

колонизации, прикреплением к поверхности и созреванием [Yarwood *et al.*, 2003].

### **1.3 Подавление чувства кворума и контроль образования биопленок.**

Установлено, что подавление чувства кворума осуществляется прерыванием синтеза аутоиндуктора [Dong *et al.*, 2007]. QS способствует координации поведения популяции бактерий, но это не влияет на их выживание или рост. Таким образом, вмешательство в систему кворума может привести к ингибированию определенных фенотипов, например образование биопленок [Dobretsov *et al.*, 2011; Dobretsov *et al.*, 2009]. Так как система кворума участвует в формировании биопленок, ее контроль позволяет реализовать новый способ борьбы с образованием биопленок, не убивая клетки и не ингибируя их рост [Hentzer *et al.*, 2002].

Существует несколько способов подавления чувства кворума посредством прерывания процессов системы, таких как:

1) Ингибирование синтеза AHL молекул, блокируя белок LuxI синтетазу [Geske *et al.*, 2008; Parveen *et al.*, 2011]

2) Ферментативное уничтожение AHL молекул AHL-ацилазой и AHL- лактоназой предотвращает их накопление [Lin *et al.*, 2003; Sio *et al.*, 2006; Yates *et al.*, 2002]

3) Воздействие на сигнальные рецепторы или блокирование формирования AHL / LuxR комплекса [Koch *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011].

В дополнение к этому, было установлено, что подавление системы кворума, осуществляется в первую очередь воздействием на синтетазы системы кворума и на регуляторные белки [Williams, 2002; Bjarnsholt *et al.*, 2008; Lowery *et al.*, 2010; Uroz *et al.*, 2009]. Эти способы могут быть применены для ингибирования AHL-опосредованной системы кворума в грамотрицательных и, AIP-опосредованной системе кворума в грамположительных бактериях.

Традиционные методы контроля образования биопленок основаны на применении антимикробных соединений или антибиотиков, которые убивают или подавляют рост бактерий. В связи с этим основной проблемой использования такого метода является развитие множественной лекарственной устойчивости среди бактерий [Vanderkool *et al.*, 2005]. Это приводит к поиску не антибиотических соединений, которые способны избирательно блокировать AHL-опосредованное обрастания, не препятствуя росту бактерий. Предполагается, что некоторые природные соединения и ферменты могут контролировать AHL-опосредованные образования биопленок, не затрагивая бактериальный рост, а также исключая риск появлению устойчивости к антибиотикам.

Многие природные соединения растительного происхождения известны своей антимикробной активностью [Kubo *et al.*, 2006], а также являются ингибиторами системы кворума, не затрагивая бактериальный рост. Клетки млекопитающих, растений и водоросли, как известно, выделяют класс таких неантибиотических веществ, которые влияют на систему кворума, ингибируя или активируя ее [Bauer *et al.*, 2004; Dudler *et al.*, 2006]. Растения являются одним из наиболее перспективных источников в поисках природного соединения, ингибиторов QS. Основным преимуществом природных соединений заключается в том, что при их использовании не создается устойчивости бактерий к используемым веществам. Природные соединения структурно аналогичны сигнальным молекулам системы кворума и, таким образом, противодействуют им, а также они способны разрушать LuxR/LasR сигнальные рецепторы [Teplitski *et al.*, 2011; Vattem *et al.*, 2007].

Перспективной группой природного QSI является галогенированные фураноны, которые ингибируют AHL-опосредованную экспрессию генов, взаимодействуя с AHL сигналом его белка [Manefield *et al.*, 1999; Manefield *et al.*, 2002]. Галогенизированные фураноны также известны, как ингибиторы системы кворума посредством дестабилизации и ускорения обратимого процесса синтеза LuxR, которые препятствуют связыванию с ДНК и инициации



транскрипции [Lowery *et al.*, 2008]. В исследовании [Ren *et al.*, 2001] установлено, что фураноны ингибируют AHL молекулы так же, как и AI-2, так как их структура сходна со структурой лактонов и тетрагидрофурановых колец. Фураноны являются структурными аналогами короткой цепи AHL и взаимодействуют с рецепторами типа LuxR [Sanchez- Contreras *et al.*, 2007]. Таким образом, они ингибируют AHL-опосредованную систему кворума и последующее образование биопленок в грамотрицательных бактериях [Givskov *et al.*, 1996; Eberhard *et al.*, 1986; Dong *et al.*, 2000; Hentzer *et al.*, 2003; Nys *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2001].

#### **1.4 Фураноны –ингибиторы системы чувства кворума.**

Фураноны – это аналоги гомосеринлактона, вмешивающиеся в процесс развития структуры биопленок у микроорганизмов, замещая молекулы гомосерин лактона и, тем самым, делая эти организмы более восприимчивыми к лечению природными биоцидами. «Quorum sensing» – это важный фактор, влияющий на способность сальмонелл образовывать биоплёнку. В последние годы учёные предложили использовать фураноны в качестве соединений, препятствующих QS. С помощью фуранонов можно предотвратить формирование бактериальных биопленок и повысить эффективность воздействия дезинфицирующих агентов. Но надо заметить то, что фураноны не убивают микробы, а просто блокируют их способность посылать сигналы друг другу – предотвращают бактериальную коммуникацию. Многие химически синтезированные фураноны эффективнее, чем природные [Dong YH, 2005].

Фураноны синтезируются растениями и выделяются на поверхность в определенной концентрации, где регулируют образование бактериальных колоний и эбибиоту. В лабораторных условиях модельным объектом для изучения экологической роли вторичных метаболитов является Красная водоросль *Delisea Pulchra*. Это позволило использовать фураноны в качестве ингибиторов бактериального обрастания. Фураноны подавляют образования биопленок путем влияния на систему кворума бактерий и ацилированием

гомосеринлактона в грамотрицательных бактериях. Они также воздействуют с помощью альтернативного АИ-2 сигнальной системы в грамотрицательных и грамположительных бактериях. В настоящее время создана информационная база, содержащая данные о более чем 200 фуранонов и их аналогов. Аналоги фуранонов обладают сильнодействующим антиинфекционным эффектом и ингибируют патогенные фенотипы грамотрицательных и грамположительных бактерий, что доказано *in vitro* с помощью генных микрочипов, и *in vivo* на мышах.

### **1.5 Действие фуранонов в подавлении бактериальной сигнальной системы.**

Одним из наиболее важных аспектов биологической активности фуранонов и их аналогов является их способность препятствовать сигнальной системе чувства кворума, и, таким образом, вмешиваться в образование фенотипов, используемых бактериями для колонизации поверхности. Но молекулярный и физиологический механизмы действия не изучен.

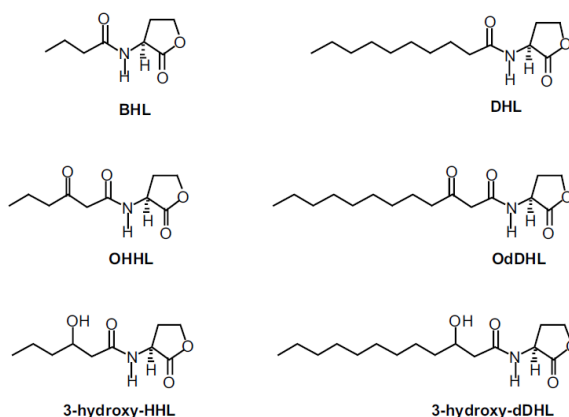
QS позволяет бактериям распознавать критическую плотность клеток, и в ответ активировать экспрессию генов-мишеней [Fuqua *et al.*, 1994]. Бактериальные метаболиты распознают межклеточные сигналы, которые используются для мониторинга численности клеток. К ним относятся: пептиды, бутиллактоны, пальмитиновая кислота метилового эфира, хиноны и циклические дипептиды.

В работе [Whitehead *et al.*, 2001] изучены и охарактеризованы межклеточные сигналы N-ацил-L-гомосерин лактона. AHL синтезируется более 40 видами протеобактерий. Большинство AHL - синтезирующих бактерий ассоциированы с высшими организмами через симбиотические или патогенные взаимодействия [Eberl 1999; Parsek *et al.*, 2000; Camara *et al.*, 2002]. К таким бактериям также относятся и патогены человека: *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium violaceum*, *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Aeromonas hydrophila* and *Brucella melitensis*.

К молекулам AHL относятся: N-бутаноил-L- гомосерин лактон (BHL), N-деcanoил-L-гомосерин лактон (DHL), N-3- (оксогексаноил) - L-гомосерин лактон (OHHL), N-3- (оксо-додеcanoил) -L-гомосерин лактон (OdDHL), N- (3-гидрокси-гексаноил) -L-гомосерин лактон (3-гидрокси-HHL), N- (3- гидрокси-додеcanoил) -L-гомосерин лактон (3-гидрокси-dDHL) (рисунок 1.3).

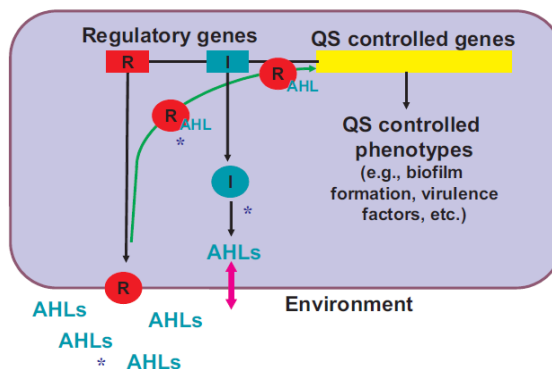
Сигнальные молекулы AHL синтезируются предшественниками синтетазы белка "I" и взаимодействуют с белком регуляции транскрипции "R", для регуляции экспрессии генов-мишеней.

На рисунке 3 показана схема AHL-зависимого QS, в которой AHL-синтетаза, обозначенная "I", как белок и ген, продуцирует ферментативно AHL, которая затем диффундирует из клетки и увеличивается в концентрации. Связывание сигнала с мембранным рецептором, обозначенного "R", как ген и белок, приводит к экспрессии генов системы кворума и, следовательно, фенотипа. Так как аутоиндукция гена "I" является специфичным для организмов, он не включен в эту модель. На схеме «\*» указывает потенциальные сайты вмешательства в систему AHL. Белки LuxI катализируют образование AHL из соответствующих заряженных ацильных белков - переносчиков, в качестве основного донора ацильной цепи и S-аденозил метионина, который формирует фрагмент гомосерин лактона [Parsek, 1999].



**Рисунок 2 - Структурные формулы классов N-ацил-L-гомосерин лактона.** [Williams, 2002; Bjarsholt *et al.*, 2008; Lowery *et al.*, 2010, Uroz *et al.*, 2009]

Общий смысл QS заключается в координации экспрессии признаков, необходимых для патогенных и симбиотических взаимодействий с высшими организмами. К ним относятся биолюминесценция, колонизация поверхностей, развитие биопленок, а также образование факторов вирулентности и гидролитических ферментов при заражении эукариотических хозяев.



**Рисунок 3 - Схема AHL-зависимого QS. [Rice *et al.*, 2005]**

Фураноны специфически препятствуют AHL- регулируемой системе кворума. В обзоре [Givskov *et al.* 1996] исследователи доказали, что природные фураноны ингибируют и поверхностных структур и колонизацию *S. Liquefaciens*, и предположили, что это является конститутивным средством эукариот для вмешательства в систему кворума бактерий. Были представлены обширные экспериментальные доказательства в поддержку этой гипотезы, в том числе подавление фуранонами AHL-зависимой экспрессии биолюминесценции *B. Fischeri* [Manefield *et al.*, 1999], ингибирование синтеза AHL –контролируемого фактора вирулентности и патогенеза в *P. aeruginosa* [Hentzer *et al.*, 2002; Hentzer *et al.*, 2003], и контролируемый QS синтез карбопенема в *E. carotovora* [Manefield *et al.*, 2001].

В ряде исследований установлено, что экспрессия вышеописанных фенотипов ингибируется концентрационно зависимым методом, который не влияет на рост модельных организмов. Данные ЯМР-спектроскопии показали наличие химического взаимодействия между AHL и фуранонами не влияет на ингибирование QS. Однако, доказательством молекулярного взаимодействия между фуранонами и рецепторами QS является способность вытеснять меченные молекулы AHL из *E.coli* при сверхпродукции белка LuxR [Manefield

*et al.*, 1999]. На следующем этапе авторы выяснили, что меченный фуранон не является существенно сходным к клеткам сверхпроизводства LuxR. Вестерн-блоттинг с использованием антител против LuxR показал, что фураноны усиливают деградацию рецепторов LuxR в зависимости от концентрации. Экспрессия LuxR контролируемой PluxI-GFP репортером коррелирует с количеством интактного белка, что позволяет предположить о влиянии фуранонов на QS путем дестабилизации рецептора. Вполне вероятно, что связывание фуранона индуцирует конформационные изменения в белке. Это, в свою очередь, приводит к распознаванию клеточными протеазами, что влечет деградацию неправильно сложенных рецепторов. Эта модель подтверждается тем фактом, что введение AHL может частично снизить влияние фуранонов путем защиты белка LuxR [Manefield *et al.*, 2002].

Совсем недавно фураноны были определены в качестве ингибиторов альтернативной сигнальной системы, т.е. система AI-2. AI-2 система присутствует как в грамотрицательных, так и в грамположительных бактериях и регулирует экспрессию разнообразных факторов вирулентности, а также развитие бактериальных биопленок [Ren *et al.*, 2001; Rice *et al.*, 2005]. Фураноны специфично препятствуют сигнальной системе AI-2 в грамположительных бактериях *E. Coli* [Ren *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2004] и *Bacillus subtilis* [Ren *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2004], что подтвердилось изучением дифференциального выражения гена.

Доказано, что соединения-ингибиторы чувства кворума, такие как фураноны, в 30 раз эффективнее устраняют легочные инфекции. [Winans *et al.*, 2002]. Можно предположить, что введение QSI соединений приведет к развитию менее устойчивых биопленок, но не лишенных способности ингибировать экспрессию бактериальных экзо-ферментов, которые активно разрушают компоненты иммунной системы.

Эффект синергизма антибиотиков и QSI препаратов может оказаться полезным сочетанием в будущем химиотерапии. Кроме того, способность фуранонов ингибировать развитие биопленок может оказаться эффективным в

устранении отторжения медицинских имплантатов. Поверхностные покрытия, содержащие QSI соединения, найдут применение в снижении риска развития образования биопленок на медицинских инструментах.

В обзоре [Henke *et al.*, 2004; Winans *et al.*, 2002]. Описаны два процесса QS происходящих в грамотрицательных бактериях: тип АИ-1, который участвует во внутривидовой связи и тип АИ-2, который связан с межвидовой.

Тип АИ-1 QS состоит из четырех элементов: регулятор транскрипции (белков группы R); палиндромная последовательность ДНК; ацил-гомосерин лактон (AHL), который является сигнальной молекулой (АИ-1); синтетазаAHL белка (белок группы I), который синтезирует аутоиндукторы [Bassler, 2002; Henke *et al.*, 2004; Whitehead *et al.* 2001; Winans *et al.*, 2002].

В настоящее время принято считать, что АИ-1 диффундирует свободно между клеточной и внешней средой и комплексами R белка только при высокой плотности клеток. Комплекс AHL/R связывается через карбоксильную группу, который соответствует палиндромной последовательности с центром в положении  $\approx -40$  п.н. по отношению начала транскрипции участков генов-мишеней [Fuqua *et al.*, 1994; Whitehead *et al.* 2001; Winans *et al.*, 2002].

## **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

#### **2.1 Объект исследования.**

В тесте Эймса был использован индикаторный штамм *Salmonella typhimurium* BA13 (hisG46 araD531 rfa  $\Delta$ gal-uvrB/pKM101), полученный от О.И. Ильинской (кафедра микробиологии, Казанский университет). Сальмонеллы – подвижные, грамотрицательные, факультативные анаэробы, гетеротрофы серологически многообразны и классифицируются по антигенным свойствам. Спор и капсул не образуют. На МПА образуют нежные, полупрозрачные, слегка выпуклые, блестящие колонии с гладким краем. В МПБ равномерное помутнение.

В SOS-lux тесте, для оценки индукции SOS-ответа, использовали индикаторный штамм *E. coli* MGR, способный к биолюминесценции, в ответ на ДНК-повреждающие агенты. Штамм получен в результате трансформации штамма *E. coli* MG1655 плазмидой pDEW238, которая содержит luxCDABE – оперон под контролем *гесА*-промотора.

Для оценки quorum-sensing использовали индикаторный штамм *E. coli* MG1655/pVFR1. Штамм получен в результате трансформации штамма *E. coli* MG1655 плазмидой pVFR1.

В тесте *Allium cepa* в качестве тест-объекта использовали лук репчатый (*Allium cepa* L.).

## 2.2 Используемые среды и реактивы.

1) Среда Сפיцайзен (минимальная агаризованная среда)

[Anagnostopoulos, 1961]:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	4 г
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> .....	4 г
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> х 3Н <sub>2</sub> О.....	18 г
Цитрат Na хН <sub>2</sub> О.....	1 г
Глюкоза.....	5
Дистиллированная вода.....	1000 мл

Добавки:

Аминокислоты.....	5мг/100мл
Витамины.....	3 мг/100 мл
Агар .....	2 г/0мл

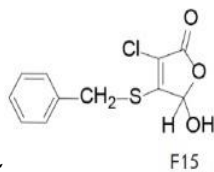
2) МПБ: 4 г порошка с питательными веществами растворяют в 200 мл дистиллированной воды и автоклавируют.

3) Мясо-пептонный агар: 30 г порошка агара растворяют в 1 л дистиллированной воды и автоклавируют.

4) Физиологический раствор (NaCl)..... 1000 мл

5) Новый производный фуранон, синтезирован Курбангалиевой А.Р.,

кафедра органической химии, Химический институт им. А. М. Бутлерова, Казанский федеральный университет (Рисунок 4)



F15

#### Рисунок 4 – Новый производный фуранон.

F15: 4-бензил-сульфонил- 5-гидрокси-3-хлор-2 (5H) -фуранон.

#### 2.3 Тест Эймса.

Мутагенную активность нового производного фуранона исследовали методом стандартного теста Эймса [Maron, Ames, 1983].

Ночную культуру *Salmonella typhimurium* ( $10^9$  клеток/мл) в 0.015 М фосфатном буфере (pH 7,4) инкубировали с тестируемым соединением в различных концентрациях при 37°C 90 мин без встряхивания. После инкубации 2,5 мл расплавленной верхней агары (0.6% агары, 0.6% NaCl, 0.05 мМ L-гистидина, 0.05 мМ биотина, pH 7.4 при 45 ° C) добавляли в пробирки, и смесь наносили на минимальную агаризованную среду (1.5% агар, среда Фогеля-Боннера, содержащая 2% глюкозы) и инкубировали при 37 °C в течение 66 ч. После этого срока подсчитывали число колоний His<sup>+</sup> ревертантов, выросших на поверхности агары. В качестве позитивного контроля использовали этилметансульфонат (ЭМС) для штамма BA13. Согласно методике, мутагенной считается та концентрация тестируемого вещества, если число ревертантов в опыте будет выше контрольных значений более чем в два раза. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

#### 2.4 Определение влияния соединения на систему quorum-sensing.

Ночную культуру *E. coli* MG1655/pVFR1 разводили (1:1000) со свежим NB бульоном. 90 мкл клеточной суспензии были внесены в лунки 96-луночной микропланшеты и затем вносили 10 мкл раствора тестируемых соединений. Раствор N-(3-оксо-додеканоил)-L-гомосерин-лактон использовали как



позитивный контроль и индуктор биолюминесценции, культуру *E. coli* MG1655/pVFR1 в NB бульоне без активатора биолюминесценции использовали как отрицательный контроль.

Микропланшеты инкубировали ночь при 37°C. Люминесценция была измерена с помощью микропланшетного ридера Infinite<sup>®</sup> Pro200, Tecan (Австрия).

## 2.5 SOS-lux-тест.

Для оценки индукции SOS-ответа использовали индикаторный штамм *E. coli* MGR, способный к биолюминесценции, в ответ на ДНК-повреждающие агенты. Штамм получен в результате трансформации штамма *E. coli* MG1655 плазмидой pDEW238, которая содержит luxCDABE – оперон под контролем *recA*-промотора. Ночную культуру штамма, выращенную в питательном бульоне с ампициллином (100 мкг/мл), вносили в планшеты по 0.1 мл в лунку и добавляли в каждую раствор вещества в различных концентрациях. Интенсивность биолюминесценции определяли каждый час в течение 8 ч. В качестве позитивного контроля использовали митомицин С [16]. В последнее время для оценки состояния SOS-системы активно используется эффективный и весьма экономичный метод – SOS-lux-тест, распространившийся благодаря своей простоте и чувствительности [16]. SOS-lux-тест основан на использовании рекомбинантных клеток *Escherichia coli*, способных к SOS-индуцибельной биолюминесценции. Такую способность они приобретают после трансформации их специально сконструированной плазмидой, несущей люциферазный оперон светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* под контролем SOS-индуцибельного промотора. Количественным показателем SOS-индукции в данном методе является световой выход, который может быть измерен на люминометре. Этот метод не требует разрушения клеток, поэтому позволяет исследовать эффективность SOS-ответа при действии различных ДНК повреждающих факторов в режиме реального времени. Фураноны, для которых в настоящем исследовании показана QS-ингибирующая активность,

тестировали на способность индуцировать SOS-ответ в диапазоне концентрации 0–85 мкг/мл

## **2.6 Тест *Allium cepa*.**

Для анализа генотоксичности нового производного фуранона использовали тест-систему *Allium cepa*. Предварительно отобранные стандартные луковицы проращивали в течении нескольких дней в стеклянных стаканах, содержащих 2 мкл/мл нового производного фуранона F15, при температуре 24-25°C. В качестве контроля использовали отстоянную отфильтрованную водопроводную воду. Через несколько дней проводили фиксацию корешков в этиловом спирте (95%) и в ледяной уксусной кислоте в соотношении (1:3). Материал хранили в 70%-ном этиловом спирте при температуре +4°C. Анализ клеток корневой меристемы проводили на микроскопе при 40-вом увеличении на временных давленных препаратах после окрашивания ацетоарсеином [Fiskesjo *et al.*,1985]. На каждом препарате учитывали общее количество клеток, количество делящихся клеток, находящихся в той или иной стадии митоза и патологические митозы. На основании полученных данных определили митотический индекс (MI), распределение клеток по стадиям митоза и патологические митозы.

## **2.7 Определение митотической активности тканей.**

Показателем уровня митотической активности тканей является митотический индекс (MI, %). Индекс показывает отношение числа клеток, находящихся в митозе, к общему числу проанализированных клеток, исследованных на препарате изучаемой ткани. Индекс указывает о нормальном протекании митоза, об угнетении процесса деления клеток или об усилении митотической активности тканей. На основании этого можно сделать заключение о митотическом или митозстимулирующем действии изучаемого фактора. Расчет по определению MI, % было сделано в соответствии с формулой, приведенной ниже:

$$MI, \% = \frac{[П+М+А+Т]}{N} \times 100,$$

Где [П+М+А+Т]– сумма клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофаз [Прохорова, Королева, Фомичева, 2005].

## 2.8 Статистическая обработка результатов.

Статистическую обработку результатов проводили, используя программу «MicrosoftExcel». Приведенные в работе данные представляют собой среднее значение повторностей эксперимента  $\pm$ среднеквадратичное отклонение.

# ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

## 3.1 Оценка мутагенности тестируемого соединения F15 с помощью теста Эймса.

Мутации являются существенным первым шагом в процессе канцерогенеза, следовательно, тест на мутагенность (например, тест Эймса) должен быть широко использован для выявления мутагенов/канцерогенов. В настоящем исследовании был использован штамм VA13. Полученные данные по оценке мутагенных свойств нового производного фуранона представлены на рисунках (Рисунки 5-6). Результаты теста Эймса указывают на то, что вещество F15 не проявляет мутагенных свойств. Следовательно, вещество может быть использовано в практике. Понижение количества His<sup>+</sup> ревертантов, в концентрациях F15 от 6 мкг/мл, связано с токсичностью соединения.

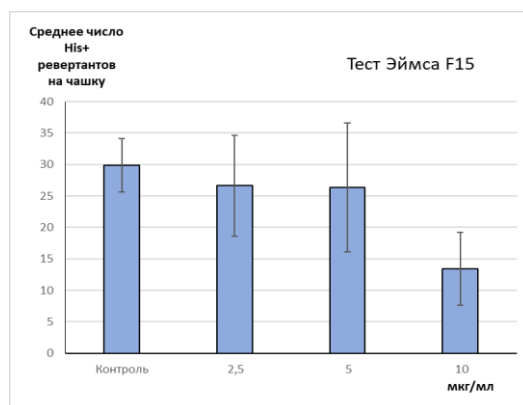


Рисунок 5. Результаты теста Эймса в присутствии соединения F15.

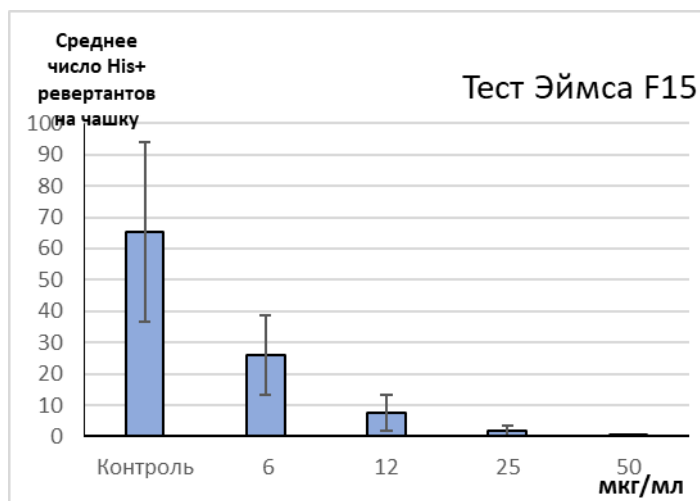


Рисунок 6. Результаты теста Эймса в присутствии соединения F15.

### 3.2 Определение влияния тестируемого соединения F15 на систему quorum-sensing.

В экспериментах, по определению влияния тестируемого соединения F15 на систему quorum-sensing был использован АГЛ для штамма MG1655/pVFR1. Результаты по веществу F15 представлены на рисунках (Рисунок 7-9). На 1 сутки показатель биолюминесценции у штамма QS соединение F15 в концентрациях от 10 мкг/мл до 42 мкг/мл был выше, чем у штамма SOS (Рисунок 9). Различия в реакции штаммов на фуранон можно объяснить активацией QS системы. В более высоких концентрациях от 42 мкг/мл до 85 мкг/мл показатель биолюминесценции понижается, что связано с антибактериальным действием соединения. Полученные данные свидетельствуют о том, что соединение F15 влияет на чувство кворума.

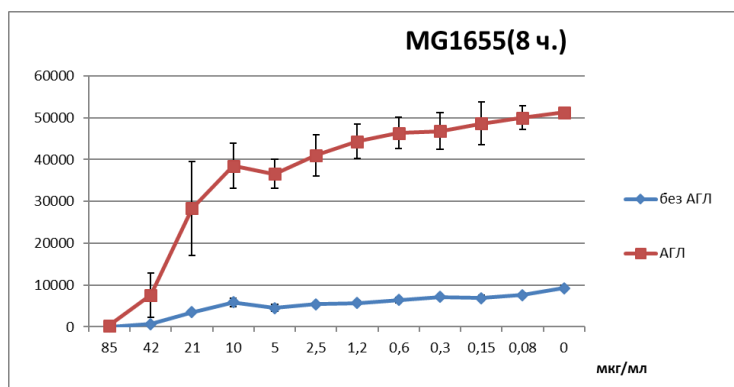
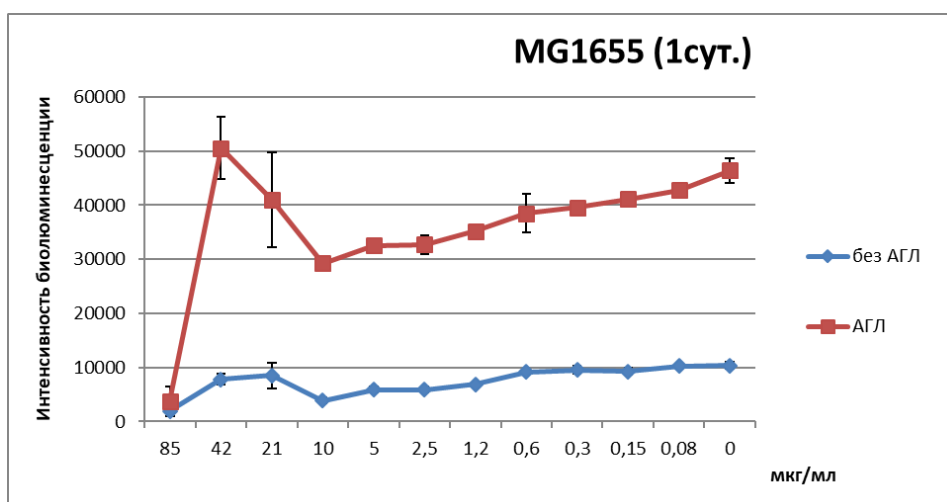
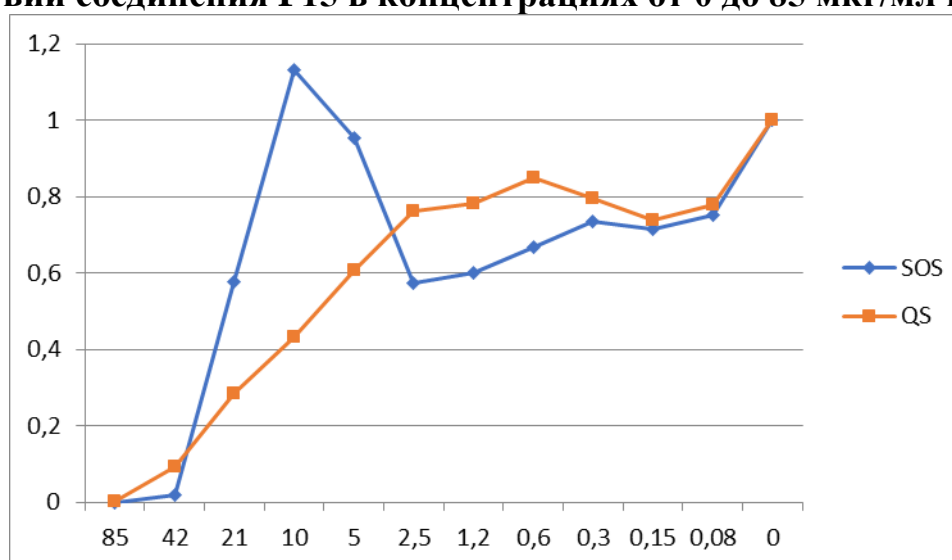


Рисунок 7. Интенсивность биолюминесценции MG1655/pVFR1 в присутствии соединения F15 в концентрациях от 0 до 85 мкг/мл через 8 часов.



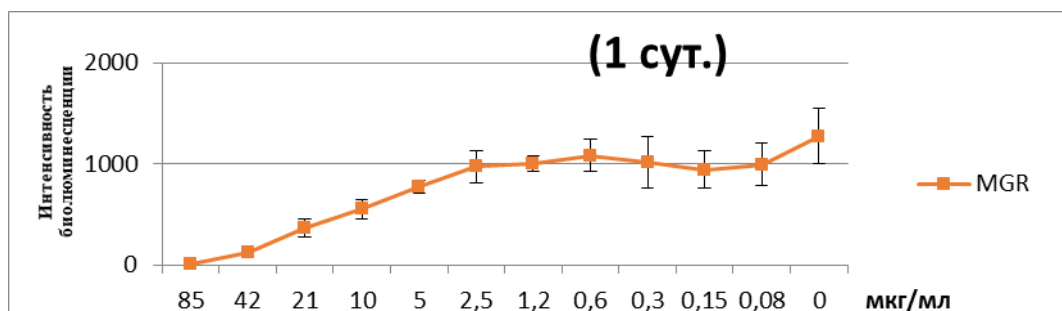
**Рисунок 8. Интенсивность биолюминесценции MG1655/pVFR1 в присутствии соединения F15 в концентрациях от 0 до 85 мкг/мл на 1 сутки.**



**Рисунок 9. Относительная биолюминесценция у штаммов MGR (SOS), MG1655/pVFR1 (QS).**

### 3.3 Оценка результатов SOS-lux теста.

Согласно нашему исследованию, соединение F15 имело существенные уровни влияния в отношении QS на 1 сутки и для него не было обнаружено генотоксичности на бактериальных тест-системах (Рисунки 9-10).



**Рисунок 10. Определение генотоксичности на тест – системе с использованием штамма MGR.**

### 3.4 Оценка мутагенности нового производного фуранона с использованием тест-системы *Alium* сера.

Изменение митотической активности меристематических тканей может рассматриваться как показатель негативного воздействия факторов на эукариотическую клетку. Показателем уровня митотической активности служит митотический индекс, отражающий долю делящихся клеток. Он может свидетельствовать о нормальном протекании митоза, угнетении процесса деления клеток или, напротив, усилении их митотической активности.

Реакция тест-объекта луковицы которого проращивали в присутствии соединения F15 (таблица 2) показала, что уровень митотической активности снизился на 29%, по сравнению с контрольным значением (таблица 1). Соединение подавляет клеточное деление (ингибирует рост клеток).

Поле зрения	Количество клеток в стадии				
	интерфаза	профаза	метафаза	анафаза	телофаза
1	204	6	4	2	1
2	210	2	3	3	2
3	190	3	3	4	2
4	214	4	2	1	2
5	191	9	4	3	3
6	206	8	4	2	4
7	200	2	6	1	3
8	170	7	4	1	3
9	204	5	3	2	2
10	190	5	5	1	4
$\Sigma$ клеток в каждой фазе	1977	54	38	21	26
Сумма делящихся клеток (П+М+А+Т) 139					
MI,% = 7,03					

Таблица 1 – Значения митотического и фазовых индексов в контроле

Поле зрения	Количество клеток в стадии				
	интерфаза	профаза	метафаза	анафаза	телофаза
1	598	17	9	24	21
2	796	36	0	10	10
3	1800	29	4	24	27
4	2243	43	5	21	19
$\Sigma$ клеток в каждой фазе	5437	125	18	69	77
Сумма делящихся клеток (П+М+А+Т) 289					
MI,% = 5					

Таблица 2 - Значения митотического и фазовых индексов в присутствии соединения F15

### **ВЫВОД:**

1) В тесте Эймса было показано, что производный фуранон F15 не обладает мутагенным эффектом.

2) В экспериментах, по определению влияния тестируемого соединения на quorum-sensing, было выявлено то, что соединение F15 влияет на чувство кворума.

3) В SOS-lux тесте было показано, что соединение F15 не обладает ДНК-повреждающей активностью.

4) В Alim-тесте было показано, что соединение F15 подавляет клеточное деление (ингибирует рост клеток).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1) **Похорова, И.П.** Генетическая токсикология [Текст] /Р.Я. Шрам // изд. Генетика: -2005.- №5.-с 56-59.
- 2) **Bassler, B.L.** Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria [Text] / B.L. Bassler // Cell. – 2002. – N.109. – V.4. – P.421-424.
- 3) **Bassler, B.L.** Bacterially speaking [Text] / B.L. Bassler, R. Losick // Cell. – 2006. – V.125. – P.237-246.
- 4) **Bauer, W.D.** Plant responses to bacterial quorum sensing signals [Text] / W.D. Bauer, U. Mathesius // Curr Opin Plant Biol. – 2004. – V.7. – P.429-433.
- 5) **Chhabra, S.** Extracellular communication in bacteria. In: Schulz S, ed. The chemistry of pheromones and other semiochemicals II [Text] / S. Chhabra, B. Philipp, L. Eberl // Springer Berlin Heidelberg. – 2005. – V.240. – P.279-315.
- 6) **Choudhary, S.** Applications of quorum sensing in biotechnology [Text] / S. Choudhary, C. Schmidt-Dannert // Appl Microbiol Biotechnol. – 2010. – V.86. – P. 1267-1279.
- 7) **Costerton, J.W.** Microbial biofilms [Text] / J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell // Annu Rev Microbiol. – 1995. – V.49. – P.711-745.
- 8) **Davies, D.** Understanding biofilm resistance to antibacterial agents [Text] / D. Davies // Nat Rev Drug Discov. – 2003. – V.2. – P.114-122.
- 9) **Dobretsov, S.** Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors [Text] / S. Dobretsov, M. Teplitski, M. Bayer // Biofouling. – 2011. – V.27. – P.893-905.
- 10) **Dong, Y.H.** Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications [Text] / Y.H. Dong, L.H. Wang, L.H. Zhang // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2007. – V.362. – P.1201-1211.
- 11) **Fuqua, W.C.** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators [Text] / W.C. Fuqua, S.C. Winans, E.P. Greenberg // J Bacteriol. - 1994. – N.176. – P.269–275.
- 12) **Fuqua, C.** Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes



- [Text] / C. Fuqua, S.C. Winans // *J Bacteriol.* – 1996. - N.178. – V.2. – P.435-440.
- 13) **George, E.A.** Molecular mechanisms of agr quorum sensing in virulent staphylococci [Text] / E.A. George, T.W. Muir // *Chembiochem.* – 2007. – V.8. – P.847-855.
- 14) **Geske, G.D.** Expanding dialogues: From natural autoinducers to non-natural analogues that modulate quorum sensing in Gram-negative bacteria [Text] / G.D. Geske, J.C. O'Neill, H.E. Blackwell // *Chem. Soc Rev.* – 2008. – V.37. – P.1432-1447.
- 15) **Givskov, M.** Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling [Text] / M. Givskov, R. de Nys, M. Manefield, L. Gram, R. Maximilien, L. Eberl, S. Molin, P.D. Steinberg, S. Kjelleberg // *J Bacteriol.* - 1996. – N.178. – P.6618–6622.
- 16) **Henke, J.M.** Bacterial social engagements [Text] / J.M. Henke, B.L. Bassler // *Trends Cell Biol.* - 2004. – N.14. - V.11. - P.648-656.
- 17) **Hentzer, M.** Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound [Text] / M. Hentzer, K. Riedel, T.B. Rasmussen, A. Heydorn, J.B. Anderson, M.R. Parsek, S.A. Rice, L. Eberl, S. Molin, N. Hoiby, S. Kjelleberg, M. Givskov // *Microbiology.* – 2002. – N.148. – P.87–102.
- 18) **Hentzer, M.** Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors [Text] / M. Hentzer, H. Wu, J.B. Anderson, K. Riedel, T.B. Rasmussen, N. Bagge, N. Kumar, M.A. Schembri, Z. Song, P. Kristoffersen, M. Manefield, J.W. Costerton, S. Molin, L. Eberl, P. Steinberg, S. Kjelleberg, N. Hoiby, M. Givskov // *EMBO J.* – 2003. - N.22. - P.3803–3815.
- 19) **Kaufmann, G.F.** Bacterial quorum sensing: a new target for anti-infective immunotherapy [Text] / G.F. Kaufmann, J. Park, K.D. Janda // *Expert OpinBiolTher.* – 2008. – V.8. – P.719-724.

- 20) **Koch, B.** The LuxR receptor: The sites of interaction with quorum-sensing signals and inhibitors [Text] / B. Koch, T. Liljefors, T. Persson // *Microbiology*. – 2005. – V.151. – P.3589-3602.
- 21) **Kubo, I.** Antioxidant activity of anacardic acids [Text] / I. Kubo, N. Masuoka, T.J. Ha // *Food Chem.* – 2006. – V.99. – P.555-562.
- 22) **Lin, Y.H.** Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes [Text] / Y.H. Lin, J.L. Xu, J.Y. Hu // *MolMicrobiol.* – 2003. – V.47. – P. 849-860.
- 23) **Lowery, C.A.** Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing [Text] / C.A. Lowery, T.J. Dickerson, K.D. Janda // *ChemSoc Rev.* – 2008. – V.37. – P.1337-1346.
- 24) **Manefield, M.** Evidence that halogenated furanones from *Deliseapulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein [Text] / M. Manefield, R. de Nys, N. Kumar, R. Read, M. Givskov, P. Steinberg, S. Kjelleberg // *Microbiology*. – 1999. – V.145. – P.283–291
- 25) **Manefield, M.** Halogenated furanones from the red alga, *Deliseapulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora* [Text] / M. Manefield, M. Welch, M. Givskov, G.P.C. Salmond, S. Kjelleberg. // *FEMS. - 2001. - MicrobiolLett.*205. – P.131–138.
- 26) **Manefield, M.** Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover [Text] / M. Manefield, T.B. Rasmussen, M. Henzter // *Microbiology*. – 2002. – V.148. – P.1119-1127.
- 27) **O’Toole, G.** Biofilm formation as microbial development [Text] / G. O’Toole, H.D. Kaplan, R. Kolter // *Annu Rev Microbiol.* – 2000. – V.54. – P.81-127.
- 28) **Ponnusamy, K.** Inhibition of quorum sensing mechanism and *Aeromonas hydrophila* biofilm formation by vanillin [Text] / K. Ponnusamy, D. Paul, J.H. Kweon // *Environ Eng Sci.* – 2009. – V.26. – P.1359-1363.

- 29) **Ren, D.** Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone [Text] / D. Ren, J.J. Sims, T.K. Wood // *Environ Microbiol.* – 2001. – V.3. – P.731–736.
- 30) **Rice, S.A.** The use of quorum sensing blockers as therapeutic agents for the control of biofilm associated infections [Text] / S.A. Rice, D. McDougald, N. Kumar, S. Kjelleberg // *Curr Opin Invest Drugs.* – 2005. – V.6. - P.178–184.
- 31) **Sanchez-Contreras, M.** Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes [Text] / M. Sanchez-Contreras, W.D. Bauer, M. Gao // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2007. – N.362. – P.1149-1163.
- 32) **Teplitski, M.** Perception and degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals by mammalian and plant cells [Text] / M. Teplitski, U. Mathesius, K.P. Rambaugh // *Chem Rev.* – 2011. – V.111. – P.100-116.
- 33) **Vanderkooi, O.G.** Predicting antimicrobial resistance in invasive pneumococcal infections [Text] / O.G. Vanderkooi, D.E. Low, K. // *Clin Infect Dis.* – 2005. – V.40. – P.1288-1297.
- 34) **Whitehead, N.A.** Quorum-sensing in Gram-negative bacteria [Text] / N.A. Whitehead, A.M. Barnard, H. Slater, N.J. Simpson, G.P. Salmond // *FEMS Microbiol.* – 2001. – N.25. – V.4. – P.365-404.
- 35) **Williams, P.** Quorum sensing: an emerging target for antibacterial chemotherapy? [Text] / P. Williams // *Expert Opin Ther Targets.* – 2002. – V.6. - P.257-274.
- 36) **Williams, P.** Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world [Text] / P. Williams // *Microbiology.* – 2007. – N.153. – P.3923-3938.
- 37) **Winans, S.C.** Mob psychology [Text] / S.C. Winans, B.L. Bassler // *J Bacteriol.* – 2002. – N.184. - V.4. - P.873-883.
- 38) **Yarwood, J.M.** Quorum sensing in *Staphylococcus* infections [Text] / J.M. Yarwood, P.M. Schlievert // *J Clin Investig.* – 2003. – V.112. – P.1620-1625.

**Yarwood, J.M.** Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms [Text] / J.M. Yarwood, D.J. Bartels, E.M. Volper // *J Bacteriol.* – 2004. – N.