

В. Е. Митько, А. Б. Маргулис, В. Я. Пономарев,
А. И. Колпаков, О. Н. Ильинская

ТОКСИЧЕСКИЕ И ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НОВЫХ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ФУРАНОНОВ И ИХ ГАЛОГЕНИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Ключевые слова: галогенированные фураноны, токсичность, мутагенность, кворум-зависимые процессы.

Исследованы токсические и мутагенные эффекты различных производных фуранонов на бактериальные клетки. Показаны гипертоксические эффекты для фуранона №6 и мутагенные эффекты для фуранона №1 из двух представленных групп соединений. Планируется дальнейшее исследование биологической активности исследуемых производных фуранонов.

Keywords: halogenated furanones, toxicity, mutagenicity, the quorum-sensing processes.

Studied toxic and mutagenic effects of various derivatives of furanones on bacterial cells. Shown hypertoxic effects for furanone № 6 and mutagenic effects of furanone № 1 of the two groups of compounds represented. It is planned to further study the biological activity of the investigated derivatives of furanones.

Введение

В последние 10-15 лет внимание многочисленных исследователей, работающих с микроорганизмами в различных областях биологии и медицины, как в фундаментальных, так и в прикладных направлениях, было обращено на феномен, получивший название Quorum Sensing.

Quorum Sensing (QS) – это особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящей от плотности их популяции. QS системы включают низкомолекулярные сигнальные молекулы (аутоиндукторы), легко диффундирующие из клеток в среду и обратно, и рецепторные регуляторные белки, с которыми взаимодействуют сигнальные молекулы. По мере того, как популяция бактерий увеличивается и достигает критического уровня, аутоиндукторы накапливаются до необходимого порогового значения и связываются с соответствующими рецепторными белками, что приводит к резкой активации (иногда – репрессии) транскрипции определенных наборов генов. С помощью сигнальных молекул QS систем происходит межклеточная коммуникация бактерий в популяциях, обеспечивающая скоординированный ответ бактерий на изменение условий среды.

Тот факт, что QS может быть важнейшим фактором регуляции вирулентности бактерий, обусловил новое направление исследований, связанное с использованием QS регуляции в качестве потенциальной мишени для борьбы с инфекционными заболеваниями. В настоящее время этот подход рассматривается как новая перспективная стратегия антимикробной терапии. В большом количестве лабораторий проводится поиск и изучение веществ, подавляющих QS [1].

Большой научный интерес представляет исследование природных антагонистов аутоиндукторов QS, производных фуранонов, в том числе галогенированных [2]. Отсюда все больше внимания учёных привлекает исследования биологической активности галогенированных фуранонов.

Фураноны – это аналоги гомосеринлактона, вмешивающиеся в процесс развития структуры био-

пленок у микроорганизмов, замещая, молекулы гомосеринлактона и, тем самым, делая эти организмы более восприимчивыми к лечению природными биоцидами.

После обнаружения эффекта фуранонов, образуемых *D. pulchra*, в различных лабораториях провели широкий скрининг природных соединений и химически синтезировали производные фуранонов, ингибиторов QS, в том числе производные фуранонов с ацильными цепями различной длины. Оказалось, что даже производные фуранонов без ацильной цепи с двумя атомами брома ингибировало QS-систему *P. aeruginosa*. Обнаружено, что производные фуранонов продуцируются различными организмами: морскими зелеными, красными и бурными водорослями, грибами, асцидиями, актиномицетами и др. [3].

Изучение механизма действия этих веществ на QS системы показало, что соединения фураноновой природы конкурируют с АГЛ за участок связывания с рецепторными белками LuxR типа. Связывание фуранонов с рецептором влияет на стабильность комплекса белок-лиганд, приводя к быстрому расщеплению рецепторного белка [4].

Действие фуранонов приводит к подавлению различных клеточных процессов, регулируемых QS: билюминесценции *Vibrio fischeri*; продукции факторов вирулентности у *P. aeruginosa*, *Erwinia carotovora*; образования биопленок. Многие химически синтезированные фураноны значительно эффективнее, чем природные. Большой интерес представляет тот факт, что синтетические фураноны были активны против бактерий в составе биопленок в тех же концентрациях, что и против QS-регуляции планктонно размножающихся бактерий. Для подавления инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, растущих в биопленках, требуются существенно более высокие дозы антибиотиков [5].

Приведенные данные показывают, что производные фуранонов перспективны для получения на их основе терапевтических агентов, направленных против патогенности бактерий. Большинство испытанных к настоящему времени соединений, способных подавлять QS-регуляцию, токсичны для

человека [5], для микроорганизмов [6], влияют на активность протеолитических ферментов [7]. Актуальную задачу представляет их модификация и поиски новых, нетоксичных веществ, пригодных для клинического применения.

Целью данной работы было оценить биологические эффекты новых синтезированных фуранонов, модифицированных хлором, и серосодержащих галогенированных фуранонов.

Материалы и методы исследования

На рисунках 1 и 2 представлены две группы фуранонов: серосодержащие (галогенированные хлорсодержащие и негалогенированные) (рис. 1) и галогенированные хлорсодержащие (рис. 2) производные фуранонов, которые применяли в работе. Соединения синтезированы на кафедре Органической химии КФУ под руководством к.х.н., доцента Курбангалиевой А.Р. и предоставлены нам для исследования биологических эффектов.

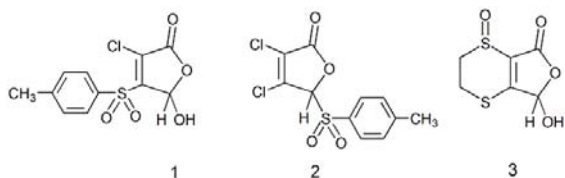


Рис. 1 – Формулы серосодержащих производных фуранонов группы I (условно обозначены 1, 2 и 3)

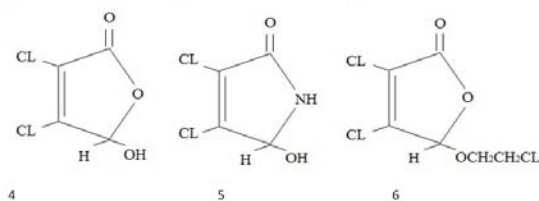


Рис. 2 – Формулы галогенированных производных фуранонов группы II (условно обозначены 4, 5 и 6)

Названия исследуемых соединений в соответствии с условными обозначениями (1-6).

1. 5-гидрокси-4-[(4-метилфенил)сульфонил]-3-хлор-2(5H)-фуранон

2. 5-[(4-метилфенил)сульфонил]-3,4-дихлор-2(5H)-фуранон

3. 7-гидрокси-2,3-дигидро-[1,4]дитиино[2,3-с]фуран-5(7H)-он-4-оксид

4. 5-гидрокси-3,4-дихлор-2(5H)-фуранон (мукохлорная кислота)

5. 5-гидрокси-3,4-дихлор-1,5-дигидро-2H-пиррол-2-он

6. 3,4-дихлор-5-(2-хлорэтокси)-2(5H)-фуранон

Для определения возможных токсических эффектов разных концентраций фуранонов в работе применяли тест на определение токсичности по отношению к микроорганизмам. В тесте использовали тестерный штамм *Salmonella typhimurium* TA 100. Показателем токсического действия было число

колониеобразующих единиц (КОЕ) в опыте (%) по сравнению с контролем [8].

Для определения мутагенных эффектов фуранонов был проведен стандартный тест Эймса без метаболической активации на тестерном штамме *Salmonella typhimurium* TA 100.

Сущность теста заключается в том, что тестерные штаммы бактерий *Salmonella typhimurium* культивируют на специальной среде, на которой могут расти лишь мутанты этих штаммов, у которых произошла мутация от аутокотрофности по гистидину к прототрофности. Без внешних воздействий такие мутации происходят с низкой частотой [8].

Токсические эффекты исследуемых фуранонов

Проверке на мутагенность должна обязательно предшествовать оценка токсичности образца по отношению к тестерным штаммам для исключения возможности получения ложноотрицательных результатов в испытаниях на мутагенность. В тесте использовали мутантный штамм *Salmonella typhimurium* TA100 из набора для теста Эймса.

Предварительно в тесте на токсичность были проверены все исследуемые серосодержащие производные фуранонов. Токсические эффекты не были обнаружены ни для одного из исследуемых соединений в концентрациях от 0.1 до 10 мкг/мл. Превышение числа колоний в опытных вариантах над контрольными отсутствовало.

Данный тест был проведен и со второй группой галогенированных хлорсодержащих производных фуранонов. В результате определения возможных токсических эффектов было выявлено, что ни один из опытных образцов не обладает токсичностью по отношению к тестерному штамму *Salmonella typhimurium* TA100, за исключением растворов образца фуранона №6. В концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл растворы данного фуранона оказали гипертотоксический эффект на тестерный штамм. Однако раствор фуранона №6 в концентрации 0.1 мкг/мл практически не проявил токсического действия на тестерный штамм сальмонеллы.

Исходя из данных эксперимента на токсичность различных концентраций представленных производных фуранонов, было установлено, что исследовать данные концентрации в экспериментах на определение мутагенности можно. Исключение составляют гипертотоксические концентрации фуранона №6.

Определение мутагенных эффектов исследуемых фуранонов

Результаты экспериментов показали, что образцы серосодержащих фуранонов 2 и 3, так же как и образцы галогенированных хлорсодержащих фуранонов, 4, 5 и 6 (в исследуемой концентрации), не проявили мутагенных эффектов по отношению к тестерному штамму *Salmonella typhimurium* TA 100, т.к. превышение числа ревертантов над контролем отсутствовало. Однако остальные образцы фуранонов продемонстрировали несколько иные результаты.

На рис. 3 показано, что серосодержащий фуранон №1 в концентрации 10 мкг/мл обладает слабой мутагенной активностью. Количество колоний-ревертантов превышено над контролем приблизительно в 4.5 раза. На рисунке 4 показаны результаты теста Эймса для фуранонов группы II.

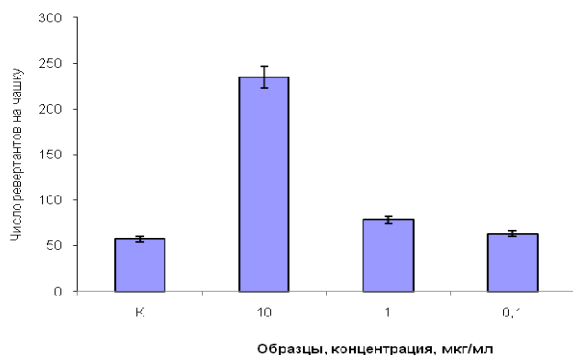


Рис. 3 – Мутагенные эффекты серосодержащего фуранона №1

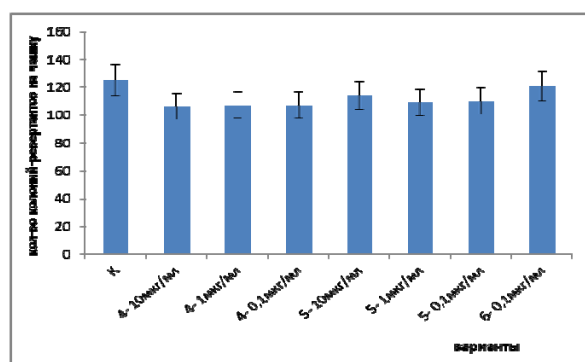


Рис. 4 – Мутагенные эффекты галогенированных хлорсодержащих фуранонов

Аналогичные результаты получены и для фуранонов №№2,3. Таким образом, мутагенные эффекты не были выявлены ни для одного из исследуемых фуранонов, за исключением фуранона №1 в концентрации 10мкг/мл.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что представленные группы фуранонов могут быть использованы в дальнейших исследованиях биологической активности с перспективой синтеза

новых лекарственных препаратов на основе данных соединений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 12-04-01226-а.

Литература

1. *Зайцева, Ю. В.* Молекулярно-генетические особенности Quorum Sensing систем грамотрицательных бактерий (на модели *Serratia*) и изучение их роли в регуляции клеточных процессов [Текст] : автореф. дис. канд. биол. наук / Ю. В. Зайцева ; Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики РАН – Москва, 2012. – 24 с.
2. *Manefield, M.* Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* 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.
3. *Martinelli, D.* Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* [Text] / D. Martinelli, G. Grossmann, U. Sequin, H. Brandl, R. Bachofen // *BMC Microbiology* – 2004. No.4, V.25.
4. *Manefield, M.* Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover [Text] / M. Manefield, T.B. Rasmussen, M. Hentzer, J.B. Anderson, P. Steinberg, S. Kjelleberg, M. Givskov // *Microbiology* – 2002. V.148, P.1119-1127.
5. *Hentzer, M.* Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections [Text] / M. Hentzer, M. Givskov // *J. Clin. Invest* – 2003. V.112, P. 1300-1307.
6. *Гимадеева, Р.М.* Цитотоксичность и генотоксичность новых производных фуранона / Р.М.Гимадеева, Э.В.Бабынин, А.Б.Маргулис // "Вестник Уральской медицинской академической науки" (Тематический выпуск по микробиологии, иммунологии и биотехнологии).- 2011.- №4/1(38).- С. 26.
7. *Маргулис, А.Б.* Влияние хлорпроизводных 2(5H)-фуранона на жизнеспособность бактериальных клеток / А.Б.Маргулис, А.Р.Курбангалиева, Н.В.Белоногова, Л.З.Латыпова, В.Я.Пономарев, Э.Н.Хакимуллина, Е.Ю.Тризна, М.И.Богачев, А.Р.Каюмов // *Вестник Казанского технологического университета.*- 2012.- Т. 15, №15.- С. 220-224.
8. *Маргулис, А.Б.* Методы генетической токсикологии / А.Б. Маргулис, Н.С. Карамова, О.Н. Ильинская // Учебно-методическое пособие.- Казань: КФУ, 2012.- 36 с.

© **В. Е. Митько** - асп. каф. микробиологии К(П)ФУ, unoh@mail.ru; **А. Б. Маргулис** - к.б.н., доц. той же кафедры; **В. Я. Пономарев** - к.т.н., доц. каф. технологии пищевых производств КНИТУ v.u.ponomarev@gmail.com; **А. И. Колпаков** - к.б.н., с.н.с., зав. лаб. НИЛ ББФ К(П)ФУ; **О. Н. Ильинская** - д.б.н., проф., зав. каф. микробиологии К(П)ФУ.