

УДК 579.23+579.22+579.083.13+575.224.4

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МИКРОБНОГО СИГНАЛЬНОГО АГЕНТА – ГОМОСЕРИНЛАКТОНА

*А.Б. Маргулис, О.В. Бушманова, И.В. Ожиганова,
А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская*

Аннотация

Показано, что микробный сигнальный агент гомосеринлактон не проявляет токсических и генотоксических эффектов в диапазоне концентраций от 1 до 1000 мкг/мл по отношению как к про-, так и к эукариотам.

Введение

Изучение микробного антагонизма, синтеза и секреции антибиотических веществ, регуляторной роли микробных метаболитов имеет большое практическое значение. Микроорганизмы способны адаптироваться к стрессовым условиям окружающей среды, таким, как недостаток питательных веществ, источников энергии, пространственных возможностей, температурные перепады. Это проявляется не только в спорообразовании или формировании цист, но и в образовании новых морфотипов, утрате токсигенных свойств, образовании так называемых некультивируемых форм, причем как у неспорообразующих, так и у спорообразующих бактерий при репрессии спорообразования [1]. Регулирование процесса перехода микроорганизмов в состояние анабиоза особенно важно для медицины и биотехнологии. Снижение интенсивности обмена веществ вегетативных клеток может быть усилено индукторами гипометаболического состояния. Подтверждено участие в этом процессе ряда химических факторов эндогенного происхождения, например алкилрезорцинов [2]. В пищевой и медицинской промышленности может быть организовано производство ферментов, стабилизированных химическими шаперонами микробного происхождения, каталитически активных в широком диапазоне температур, pH и др. для создания биокапсулированных ферментных лекарственных препаратов, для переработки сельскохозяйственной продукции и создания моющих средств [3]. В химической коммуникации у микроорганизмов принимают участие различные соединения, в частности, ацилированные лактоны гомосерина участвуют в «эффектах кворума» у грамотрицательных бактерий. Многие из плотностно-зависимых систем важны для регуляции поведения симбиотической (паразитической) микрофлоры в ее взаимоотношениях с макроорганизмом [4]. Более того, коммуникация посредством гомосеринлактонов может иметь межвидовой характер [5]. Нами было установлено участие гомосеринлактона в переходе некоторых грамположительных бактерий в гипометаболическое состояние [6].

Механизм действия гомосеринлактона заключается в индукции кворум-эффектов на уровне транскрипции у ряда грамотрицательных бактерий по типу системы luxI-luxR [4, 5], однако участие гомосеринлактона в регуляции экспрессии генов не исключает возможности его геном-повреждающего действия. Поскольку для ряда представителей группы алкилрезорцинов, являющихся непосредственными участниками процесса перехода ряда микроорганизмов в гипометаболическое состояние, установлены мутагенные и ДНК-повреждающие эффекты [7–9], представлялось важным выяснить, насколько возможно повреждение генома при действии гомосеринлактона. Поскольку исследование возможности регуляции гомосеринлактоном физиологических процессов у микроорганизмов, особенно патогенных, представляет несомненный интерес, важно выяснить, что является причиной подобного эффекта. Возможно, что изменение физиологического состояния бактерий и их переход в стадию гипометаболизма под действием гомосеринлактона являются следствием генотоксического действия последнего. В связи с этим, целью настоящей работы явилось исследование возможности индукции бактериальным индуктором кворум-эффекта – гомосеринлактоном, повреждений генетического материала клеток про- и эукариот.

1. Постановка задачи

В работе использовались следующие штаммы микроорганизмов (табл. 1).

Исследовали бактериальный индуктор кворум-эффекта – гомосеринлактон. Разведения готовили в стерильной дистиллированной воде. Работали с концентрациями от 1 до 1000 мкг/мл.

Токсический эффект определяли по выживанию тестерного штамма в опытных вариантах по сравнению с контрольным [10]. Способность веществ вызывать генные мутации оценивали в тесте Эймса с использованием *Salmonella typhimurium TA 100* [11]. Сущность теста заключается в том, что тестерные штаммы бактерий *S. typhimurium* культивируют на специальной среде, на которой могут расти лишь мутанты этих штаммов, у которых произошла мутация от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Без внешних воздействий такие мутации происходят с низкой частотой. Если в среду культивирования ввести химический мутаген, то частота мутаций значительно увеличивается, что регистрируется по числу колоний микроорганизмов, выросших на данной селективной среде.

ДНК-повреждающую активность оценивали по избирательному ингибированию роста мутантных штаммов *Escherichia coli*, дефектных по репарации, в сравнении с ростом «дикого» штамма [11]. Многие повреждения ДНК, которые вызываются веществами, могут быть исправлены защитными механизмами клетки – системами репарации повреждений. Если же клетка дефектна по какому-либо пути репарации, то она чувствительнее к ДНК-повреждающему действию различных веществ, чем клетка с неповрежденной системой репарации. На этом и основан так называемый Рес-тест.

SOS-индуцирующий эффект гомосеринлактона изучали в SOS-хромотесте [11]. SOS-хромотест является дешевым высокоэффективным средством для определения мутагенной и канцерогенной активности практически любых ве-

Табл. 1

Штаммы микроорганизмов, используемые в работе

Штамм	Генотип	Источник
<i>Salmonella typhimurium TA 100</i>	<i>His G46, rfa, uvr-, pkm 101, bio-</i>	НИИ по БИХС г. Купавна
<i>Escherichia. coli WP</i>	<i>Trp E⁻</i>	Институт общей генетики, г. Москва
<i>E. coli polA⁻</i>	<i>Trp 65, sul, mal B, pol A1</i>	Институт общей генетики, г. Москва
<i>E. coli uvrA⁻</i>	<i>Trp 65, sul, uvr A 155</i>	Институт общей генетики, г. Москва
<i>E. coli recA⁻</i>	<i>Trp-65, rec A</i>	Институт общей генетики, г. Москва
<i>E. coli PQ 37</i>	<i>Sfi A::mud (Ap lac) cts, lac A U169, mal⁺, uvr A, gal Y, pho C, rfa</i>	Институт им. Л. Пастера г. Париж

ществ и соединений как органической, так и неорганической природы. Он позволяет оценить как ДНК-повреждающую активность вещества, так и вклад ошибочной репарации в общий мутагенез.

Генотоксический эффект по отношению к эукариотам оценивали в микроядерном тесте на эритроцитах периферической крови мышей *in vivo*. Суть микроядерного теста заключается в выявлении и количественной оценке потенциальной цитогенетической активности исследуемого соединения в полихроматофильных эритроцитах периферической крови млекопитающих. Метод основан на микроскопической регистрации клеток с микроядрами. Спонтанная частота таких клеток составляет 0.2–0.3% [12]. Животным внутрибрюшинно делали инъекции тестируемого соединения в различных концентрациях из расчета 0.05 мл водного раствора вещества на 1 г веса животного. В качестве негативного контроля вводили растворитель. Через 24, 48, 72 ч после введения брали образцы крови из хвостовой вены животного, мазки на предметном стекле фиксировали метанолом (3–5 мин.) и выдерживали в красителе Романовского – Гимза 30–40 мин. В каждом препарате анализировали 1000–2000 нормохромных эритроцитов [12]. Для необработанных животных характерно наличие 1–2 микроядра-содержащих клеток на 1000 нормохромных эритроцитов. Достоверное превышение этого показателя служило индикатором цитогенетической активности исследуемого вещества.

Математическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы “Microsoft Excel”.

2. Результаты и обсуждение

В ходе работы было показано, что гомосеринлактон не обладает токсическими эффектами ни в одной из исследуемых концентраций (табл. 2).

Установлено, что превышение числа индуцируемых гомосеринлактоном ревертантов по сравнению с контролем в концентрациях 1, 10, 100, 1000 мкг/мл составляет, соответственно, 0.85; 1.38; 1.82; 0.97. Так как число колоний-ревер-

Табл. 2

Токсические эффекты гомосеринлактона

Концентрация гомосеринлактона, мкг/мл	Контроль	10	100	500	1000
Число колоний на чашку Петри	48±3	54±6	46±5	57±6	60±6

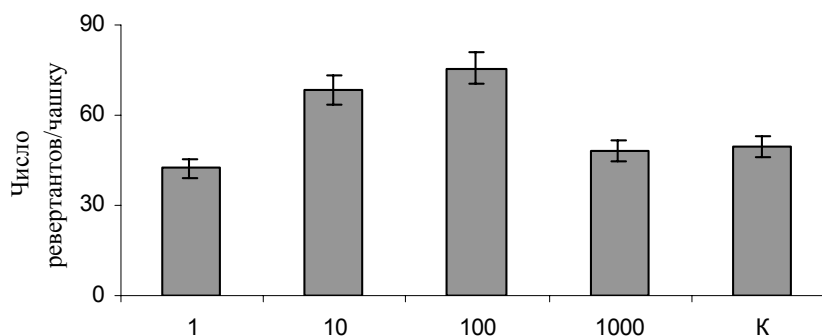


Рис. 1. Число ревертантов *S. typhimurium TA 100*, индуцированных гомосеринлактоном. К – негативный контроль без вещества. Величина разброса в среднем составляет ±7%

тантов в опыте и контроле различаются менее чем в 2.5 раза, то можно считать, что мутагенной активности не выявлено (рис. 1).

В тесте на повреждение ДНК гомосеринлактон не проявил ни токсического, ни генотоксического (прямого ДНК-повреждающего) действия, что было показано по полному отсутствию зоны лизиса как на диком, так и на мутантных штаммах *E. coli*. Фактор индукции SOS-ответа для гомосеринлактона в концентрациях от 10 до 100 мкг/мл был значительно ниже порогового значения, что также указывает на отсутствие генотоксических свойств этого препарата (рис. 2).

Генотоксический эффект гомосеринлактона по отношению к клеткам эукариот оценивали по превышению числа микроядер в опытном варианте по отношению к контролю в микроядерном тесте на эритроцитах периферической крови мышей *in vivo*. Гомосеринлактон не индуцировал микроядра в эритроцитах периферической крови мышей ни в одной из исследуемых концентраций в течение 72 ч. Можно заключить, что гомосеринлактон, являющийся микробным сигнальным агентом системы «кворум-эффект», не вызывает повреждения ДНК прокариот и не проявляет мутагенных эффектов.

Ранее было показано, что ауторегуляторные факторы микроорганизмов группы алкилрезорцинов по-разному проявляли себя по отношению к микроорганизмам. Так, по данным, полученным нами ранее, пара-2-гидроксиэтилфенол – ауторегуляторный фактор дрожжей и метилрезорцин не обладали токсической и мутагенной активностью по отношению к ряду бактерий [7, 8], в то время как аналог бактериального аутоиндуктора гипометаболического состоя-

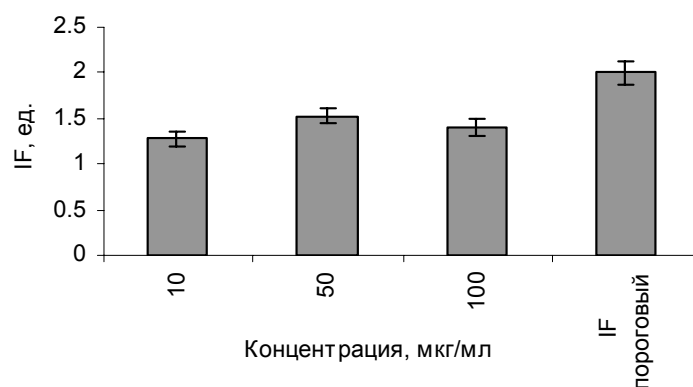


Рис. 2. Величина фактора индукции SOS-ответа гомосеринлактоном. Величина разброса в среднем составляет $\pm 6\%$

ния гексилрезорцин проявил себя как истинный генотоксикант, вызывающий мутагенный эффект даже в нетоксичных концентрациях [7–9]. Однако из описанных ауторегуляторов только гексилрезорцин обладал способностью ускорять переход ряда бактерий в состояние гипометаболизма [13, 14], что, вероятно, непосредственно связано с воздействием молекулы ауторегулятора на геном микробной клетки [7, 8].

Гомосеринлактон также индуцировал ранний переход в гипометаболическое состояние некоторых бактерий, в частности, дефектного по спорообразованию мутантного штамма *Bacillus subtilis spo0E* [6]. Тем не менее, учитывая полученные данные о том, что микробный сигнальный агент гомосеринлактон в исследованном спектре концентраций токсических, мутагенных и прямых ДНК-повреждающих эффектов в тестах на про- и эукариотах не проявил, можно заключить, что регуляция метаболического статуса исследуемым соединением обусловлена взаимодействием с белками, в частности, с активаторами (*LuxR*, *AinR*, *Nod*, *OccR*) и ингибиторами (*LuxO*) транскрипции, характерными для плотностно-зависимых генетических систем микроорганизмов [15], а не с нуклеиновыми кислотами. Особенно важно, что регуляторные свойства гомосеринлактона не связаны с геном-повреждающим действием, а реализуются в ходе каскада опосредованных реакций. Таким образом, гомосеринлактон не является прямым индуктором генотипической изменчивости популяции микроорганизмов, но может опосредованно участвовать в этом процессе.

Работа выполнена в рамках программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (РНП 2.1.1.1005).

Summary

A.B. Margulis, O.V. Bushmanova, I.V. Ozhiganova, A.I. Kolpakov, O.N. Ilinskaya. Genotoxic effects of microbial signal agent – homoserine lactone.

It was shown, that microbial signal agent homoserine lactone doesn't have toxic and genotoxic effects to pro- and eucariotic organisms at concentrations from 1 to 1000 mkg/ml.

Литература

1. Мулюкин А.Л. Образование покоящихся форм у неспорообразующих микроорганизмов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1998. – 26 с.
2. Осипов Г.А., Эль-Регистан Г.И., Светличный В.А., Козлова А.Н., Дуда В.И., Капрельянц А.С., Помазанов В.В. О химической природе ауторегуляторного фактора d *Pseudomonas carboxydoflava* // Микробиология. – 1985. – Т. 54, Вып. 2. – С. 186–190.
3. Гальченко В.Ф. Микробный анабиоз: Индукция и механизм образования покоящихся форм у неспоровых метанотрофных бактерий. – М.: Ин-т микробиологии РАН, 1997.
4. Salmond G.P.C. Buxcroft B.W., Stewart C.S.A.B., Williams P. The bacterial “enigma”: cracking the code of cell-cell communication // Mol. Microbiol. – 1995. – V. 16, No 4. – P. 615–624.
5. Gray K.M. Intercellular communication and group behavior in bacteria // Trends Microbiol. – 1997. – V. 5, No 5. – P. 184–188.
6. Маргулис А.Б., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Муффер К. Индукция гипометаболических форм у неспорообразующих грамположительных бактерий // Уч. зап. Казан. ун-та. Сер. Естественные науки. – 2005. – Т. 147, Кн. 2. – С. 108–114.
7. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Зеленихин П.В., Круглова З.Ф., Чойдаш Б., Дорошенко Е.В., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И. Влияние аутоиндукторов анабиоза бактерий на геном микробной клетки // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 2. – С. 164–168.
8. Маргулис А.Б., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Эль-Регистан Г.И. Индукция SOS-ответа клетки под действием ауторегуляторных факторов микроорганизмов // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 9. – С. 1180–1184.
9. , Ожиганова И.В., Бушманова О.В., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Гексилрезорцин как индуктор микроядер в полихроматофильных эритроцитах периферической крови мышей // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 8. – С. 1045–1048.
10. Фонштейн Л.М., Абилов С.К., Бобринев Е.В. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем. Метод. указания. – М., 1985. – 34 с.
11. Ильинская О.Н., Маргулис А.Б. Краткосрочные тест-системы для определения генотоксичности. Метод. рук. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2005. – 31 с.
12. Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M. Micronucli as an index of citogenetic damage: past, present and future // Environ. Mol. Mutagen. – 1991. – V. 18. – P. 277–291.
13. Маргулис А.Б., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Эль-Регистан Г.И. Гексилрезорцин ускоряет образование гипометаболических форм бактерий в условиях голодания // Тр. Объединенной междунар. научн. конф. «Новая геометрия природы», Казань, 25 авг. – 5 сент. 2003 г. – Казань, 2003. – Т. 2. Биология. Медицина. – С. 219–225.
14. Маргулис А.Б. Бушманова О.В., Ожиганова И.В., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Адаптивный ответ стафилококков на действие микробных факторов индукции анабиоза // Вестник ТО РЭА. – Казань, 2004. – № 1. – С. 41–44.
15. Rosemeyer V., Michiels J., Verreth C., Vanderleyden J. Lux I- and luxR-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris* // J. Bacteriol. – 1998. – V. 180, No 4. – P. 815–821.

Поступила в редакцию
13.12.05

Маргулис Анна Борисовна – младший научный сотрудник НИЛ ББФ Казанского государственного университета.

E-mail: *Anna.Margulis@ksu.ru*

Бушманова Ольга Владимировна – студент кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: *olechka@kzn.ru*

Ожиганова Ирина Владимировна – студент кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: *OIrina@yandex.ru*

Колпаков Алексей Иванович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий НИЛ ББФ

E-mail: *Alexei.Kolpakov@ksu.ru*

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: *Olga.Ilinskaya@ksu.ru*