

ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ АНАЛОГОВ ИНГИБИТОРОВ ПЛОТНОСТНО-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ У БАКТЕРИЙ

Белоногова Н.В., Крылова Е.С., Половинкина К.В., Сорина А.А., Хазиев Р.М.

*ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18.*

e-mail: nadezhda-belonogova@yandex.ru

поступила в редакцию 25 октября 2013 года

Аннотация

Авторами проведены реакции синтеза новых производных фуранонов. Охарактеризованы биологические эффекты соединений, такие как токсичность, мутагенность, влияние на пигментообразование у бактерий, на антибиотикорезистентность. Кроме того, показано влияние исследуемых соединений на системы кворума микроорганизмов с использованием тестовых систем, основанных на определении кворум-зависимого фенотипа у репортерных штаммов и уровня экспрессии кворум-зависимых генов.

Ключевые слова: *quorum-sensing, гомосеринлактоны, фураноны, синтез, биологические эффекты, токсичность, мутагенность.*

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 (QS), в котором задействованы молекулы гомосеринлактона. Фураноны – это аналоги гомосеринлактона (АГЛ), вмешивающиеся в процесс развития структуры биопленок у микроорганизмов, замещая молекулы гомосеринлактона и, тем самым, делая эти организмы более восприимчивыми к лечению природными биоцидами. Изучение механизма действия этих веществ на QS системы показало, что соединения фураноной 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 [1]. Действие фуранонов приводит к подавлению различных клеточных процессов, регулируемых QS: биолюминесценции *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 [2].

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 [3], для микроорганизмов [4], влияют на активность протеолитических ферментов [5]. Актуальную и перспективную задачу представляет их модификация и поиски новых, нетоксичных веществ, пригодных для клинического применения. В связи с вышесказанным, целью работы стал синтез новых серосодержащих и галогенированных производных фуранонов и оценка их влияния на плотно-зависимые процессы у бактерий.

Основная часть. Данной работой мы продолжаем исследования в области синтеза, изучения структуры и свойств серосодержащих производных 2(5H)-фуранона, фрагмент которого встречается во многих природных объектах и синтетически полученных веществах

с широким спектром проявляемой ими биологической активности. Ранее в реакциях 5-гидрокси-3,4-дихлор-2(5*H*)-фуранона (мукохлорной кислоты, далее МХК) и ее производных с серосодержащими моно- и бинуклеофильными реагентами был получен целый ряд новых продуктов на базе фуранонового цикла: тиоэфиры, *бис*-тиоэфиры МХК, серосодержащие гетероциклические и ациклические соединения. Потенциальной биологической важностью обладают сульфоксиды и сульфоны подобных полифункциональных соединений. Сочетание в молекуле гетероциклического фрагмента и сульфинильной или сульфонильной групп позволяет существенно расширить области применения данных продуктов и придать молекулам новые виды биологической активности. Сульфинильная группа широко используется в различных асимметрических превращениях. Интерес к химии сульфоксидов и сульфонов вызван также относительной легкостью получения этих соединений и широким использованием их в синтезе более сложных химически и биологически значимых молекул.

В качестве исходных тиоэфиров были выбраны тиозамещенные производные МХК **1**, содержащие SR заместители в пятом (тиоэфиры **2-4**) и четвертом (тиоэфиры **5-10**) положениях лактонного цикла (рисунок 1). Тиоэфиры **2-10** синтезировали по разработанным нами ранее методикам.

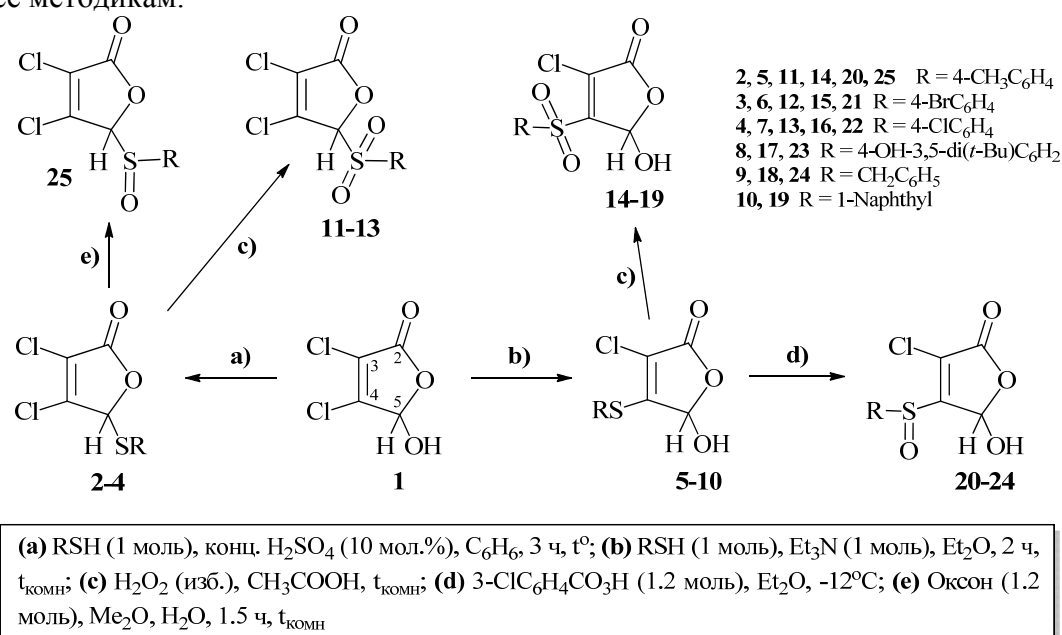


Рисунок 1. – Синтез тиоэфиров, сульфонов и сульфоксидов 2(5*H*)-фуранонового ряда.

В ходе экспериментальной работы было изучено действие различных окислителей (перекись водорода, метапериодат натрия, *m*-хлорнадбензойная кислота, гидроперсульфат калия (Оксон)) на тиопроизводные 2(5*H*)-фуранона. Показано, что на характер продуктов окисления существенное влияние оказывают природа окислителя, условия проведения реакций, а также положение SR заместителя в цикле. Разработаны селективные и препаративные методы окисления моно- и дитиопроизводных фуранонового ряда до соответствующих сульфонов и сульфоксидов, строение которых доказано комплексом физических методов.

Далее мы оценивали токсические и мутагенные эффекты производных фуранонов. На рисунках 2 и 3 представлены серосодержащие (рисунок 2) и модифицированные хлором (рисунок 3) производные фуранонов, которые применяли в работе.

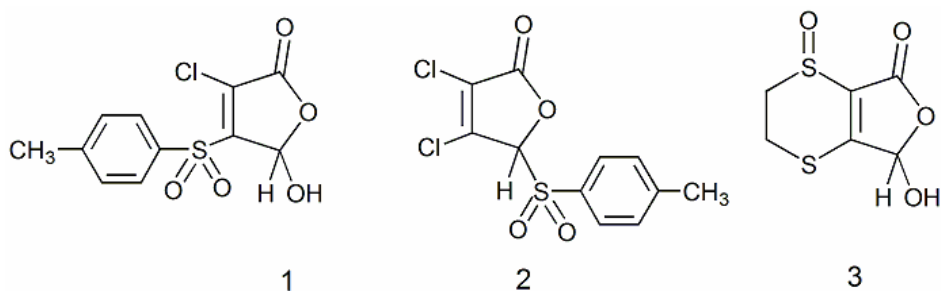


Рисунок 2. – Формулы серосодержащих производных фуранонов (условно обозначены 1, 2 и 3).

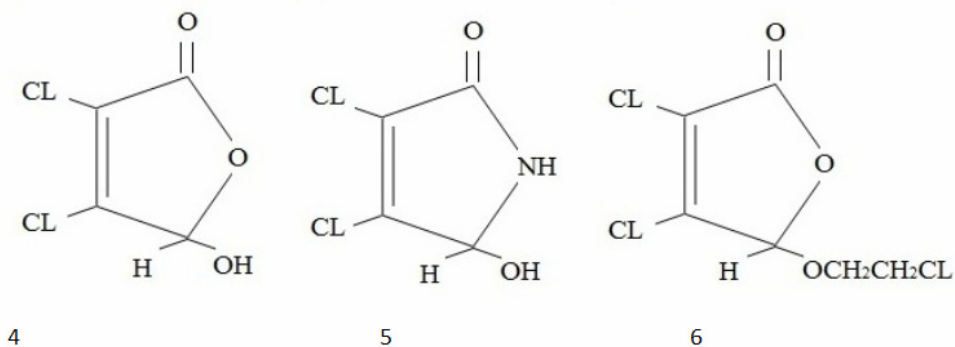


Рисунок 3. – Формулы производных фуранонов, модифицированных хлором (условно обозначены 4, 5 и 6).

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 три исследуемых серосодержащих производных 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 проведён и с новыми синтезированными фуранонами, модифицированными хлором. 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 гипертоксический эффект на тестерный штамм. Однако раствор фуранона №6 в концентрации 0,1 мкг/мл практически не проявил токсического действия на штамм сальмонеллы. Исходя из данных эксперимента на токсичность различных концентраций фуранонов, было установлено, что исследовать данные концентрации в экспериментах на определение мутагенности можно. За исключением гипертоксических концентраций нового фуранона №6. Так же целесообразно исследовать возможные биологические эффекты растворов серосодержащих производных фуранонов на эукариотические клетки. Результаты экспериментов показали, что образцы серосодержащих фуранонов 2 и 3, так же как и образцы фуранонов, модифицированных хлором, 4 и 5, 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. 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. Для фуранонов, модифицированных хлором, мутагенные эффекты не обнаружены.

Далее нами было установлено, что, не оказывая токсического воздействия на клетки *Serratia marcescens*, фураноны №1 и №4 в концентрациях 1 и 10 мкг/мл способны подавлять образование пигмента. Для *Micrococcus lysodeicticus* и *Streptomyces sp.* показано снижение

способности к образованию пигментов при совместном воздействии ацилгомосеринлактона с фураноном.

На следующем этапе работы было обнаружено, что образование антибиотика у исследуемого *Streptomyces sp.* начинается к 6-м суткам. Наибольшую чувствительность к антибиотику к 7-м суткам проявляют клетки *Micrococcus lysodeicticus* в контрольном образце и с обработкой ацилгомосеринлактоном. Клетки *Micrococcus lysodeicticus* более чувствительны к вырабатываемому антибиотику (рисунок 4), по сравнению с *Serratia marcescens*. Обработка *Streptomyces sp.* фураноном 1, а также совместная обработка с ацилированным гомосеринлактоном приводит к снижению антибиотической активности на 30-100% в зависимости от концентрации фуранона.

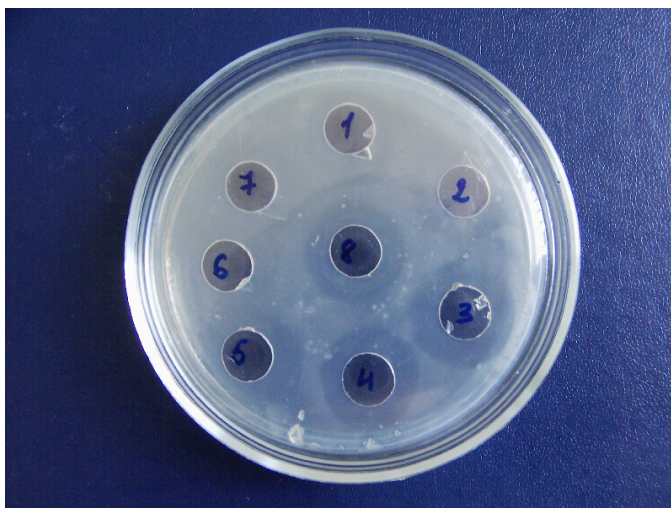


Рисунок 4. – Зоны задержки роста *Micrococcus lysodeicticus*.

Клетки *Serratia marcescens*, обработанные фураноном, в том числе, при совместном инкубировании с ГСЛ, не чувствительны к синтезируемому стрептомицетом антибиотику. Тот же эффект наблюдается и для микрококка, но на более ранних сроках (к 7-м суткам роста стрептомицета), а к 9-м суткам чувствительность к антибиотику клеток *Micrococcus lysodeicticus*, обработанных фураноном, возрастает.

Далее для проверки влияния фуранонов на системы кворума микроорганизмов использовали ряд тестовых систем, основанных на определении кворум-зависимого фенотипа у репортерных штаммов и уровня экспрессии кворум-зависимых генов. Определение уровня ацилгомосеринлактонов (АГЛ) оценивали при помощи штамма *Escherichia coli* JLD271, несущего репортерный вектор pAL103 с генами люциферазной системы. В данной генетической конструкции экспрессия генов люциферазной системы контролируется ДНК-связывающим белком LuxR, индуцирующие свойства которого определяются наличием в среде АГЛ. Поскольку данный штамм не продуцирует АГЛ, индукция люминесценции у клеток этого штамма происходит при экзогенном внесении АГЛ. В качестве отрицательного контроля был использован тот же штамм *E. coli*, но несущий репортерный вектор pAL104, который не содержит гена, кодирующего LuxR белок. Оценивали влияние фуранонов на продукцию АГЛ клетками *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 и влияние фуранонов на экспрессию гена АГЛ-синтазы (*expI*) *P. atrosepticum* SCRI1043. Среди протестированных фуранонов (рисунок 5) обнаружены как соединения, обладающие рост-ингибирующим действием, так и репрессирующие систему кворум-сенсинга. 5-гидрокси-4[(4-Метилфенил)тио]-3-хлор-2(5H)-фуранон на обеих использованных в работе тестовых системах подавлял проявление кворум-зависимых фенотипов.

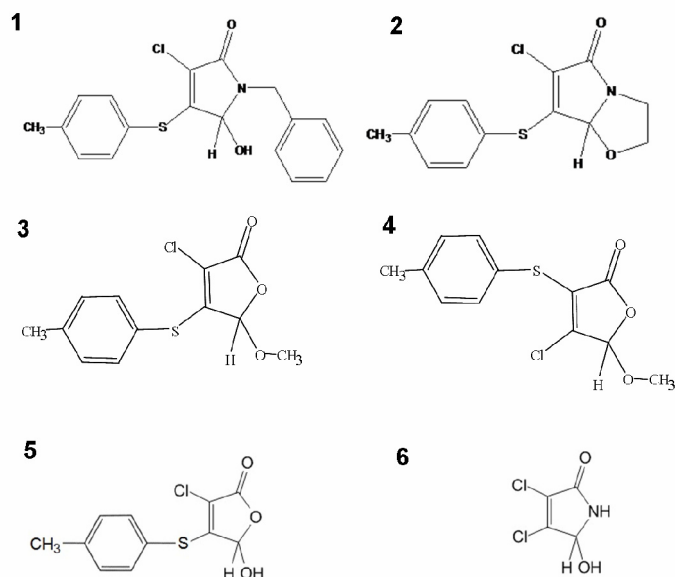


Рисунок 5. – Структурные формулы тестируемых фуранонов: 7-[(4-метилфенил)тио]-6-хлор-2,3-дигидропирроло[2,1-*b*]оксазол-5(7*aH*)-фуранон (1), *N*-бензил-5-гидрокси-4-(4-метилфенил)тио-3-хлор-3-пирролин-2-он (2), фуранон м3с (3), фуранон м4с (4), 5-гидрокси-4[(4-Метилфенил)тио]-3-хлор-2(5*H*)-фуранон (5), 5-гидрокси-3,4-дихлор-3-пирролин-2-он (6).

Заключение. Можно отметить, что галогенированные и серосодержащие фураноны не обладают высокой токсичностью и практически не проявляют мутагенных свойств, обладая при этом иной биологической активностью, что позволяет предположить возможность использования их в медицине. Производные 2(5*H*)-фуранонов и 3-пирролин-2-онов находят самое разнообразное применение. Выявленные фармакологические свойства различного действия целого ряда продуктов, полученных на базе данных гетероциклов, обуславливают важность изучения этих соединений, их реакционной способности, влияния на организм, а также синтеза новых веществ с потенциальной биологической значимостью.

Благодарность. Работа выполнена в рамках «Программы развития деятельности студенческих объединений КФУ на 2012-2013 гг.» (0613/06.13.02292).

Список литературы

- 1) Manefield M., Rasmusen T.B., Hentzer M., Anderson J.B., Steinberg P., Kjelleberg S., Givskov M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover // *Microbiology*. 2002. V.148. P.1119-1127.
- 2) Hentzer M., Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections // *J. Clin. Invest*. 2003. V.112. P.1300-1307.
- 3) Hentzer M., Wu H., Andersen J.B., Riedel K., Rasmussen T.B., Bagge N., Kumar N., Schembri M.A., Song Z., Kristoffersen P., Manefield M., Costerton J.W., Molin S., Eberl L., Steinberg P., Kjelleberg S., Hoiby N., Givskov M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors // *The EMBO J*. 2003. V.22. P.3803-3815.
- 4) Гимадеева Р.М., Бабынин Э.В., Маргулис А.Б. Цитотоксичность и генотоксичность новых производных фуранона // *Вестник Уральской медицинской академической науки* (Тем. выпуск по микробиологии, иммунологии и биотехнологии). 2011. №4/1(38). С.26.
- 5) Маргулис А.Б., Курбангалиева А.Р., Белоногова Н.В., Латыпова Л.З., Пономарев В.Я., Хакимуллина Э.Н., Тризна Е.Ю., Богачев М.И., Каюмов А.Р. Влияние хлорпроизводных 2(5*H*)-фуранона на жизнеспособность бактериальных клеток // *Вестник Казанского технологического университета*. 2012. Т.15, №15. С.220-224.