

## ПОИСК ИНГИБИТОРОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК НА ОСНОВЕ ФУРАНОНОВ И ПИРРОЛЛИНОНОВ

*Байдамшина Д.Р., Тризна Е.Ю., Гайнутдинова З.Р., Шарафутдинов И.С., Каюмов А.Р.*

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

*e-mail: irwad@yandex.ru*

*поступила в редакцию 25 ноября 2014 года*

### Аннотация

В настоящее время многие патогены приобрели устойчивость к действию антибиотиков, что объясняет необходимость поиска новых антибактериальных препаратов. Стафилококки являются одними из основных внутрибольничных патогенов. В составе биопленок они обладают повышенной устойчивостью к иммунной системе человека и антибиотикам. Сейчас показано, что вещества фуранонового ряда обладают антимикробными свойствами и подавляют микробную колонизацию. В этой работе проведен скрининг и идентифицированы соединения из класса галогенированных фуранонов, способных подавлять образование бактериальных биопленок. Из 103 проанализированных соединений Ф35 не обладал цитотоксичностью для клеток линии MCF7 и фибробластов человека, также не было выявлено их мутагенности в ДНК-повреждающем тесте.

**Ключевые слова:** *биопленки, галогенированные фураноны, антибактериальная активность, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus*

**Введение.** Многие бактерии способны образовывать прочные биопленки (biofilms), в которых клетки погружены в выделяемый ими полисахаридный матрикс. Существование бактерий внутри изолированных биопленок обеспечивает им много преимуществ по сравнению с изолированными клетками. Бактерии в биопленках выживают в присутствии антибиотиков, добавленных в количестве, в 500-1000 раз большем, чем их минимальная подавляющая концентрация *in vitro* [1].

Микроорганизмы образуют биопленки на любых биотических и абиотических поверхностях. В течение долгого времени *Staphylococcus epidermidis* считался безвредным комменсалом кожи и слизистых оболочек организма человека. Тем не менее, в настоящее время известно, что вместе с *Staphylococcus aureus* он является одним из основных внутрибольничных патогенов, вызывающих инфекции на медицинских имплантатах, таких как центральные венозные катетеры, мочевые катетеры, протезы клапанов сердца, ортопедические устройства и контактные линзы. *S. aureus* является возбудителем широкого спектра заболеваний, от кожных до смертельных системных нарушений. Многие из перечисленных заболеваний обусловлены образованием биопленок бактериями *S. aureus* и *S. epidermidis* [2].

Действие антибиотиков, используемых в настоящее время, обладает низкой эффективностью против биопленок [3]. Следовательно, одним из направлений в фармакологии является разработка препаратов, которые бы эффективно подавляли рост и образование ими биопленок. В настоящее время одним из подходов является покрытие поверхностей серебром или ферментами, которые разрушают матрикс биопленки. Альтернативой могут явиться галогенизированные фураноны [4].

В настоящее время показано, что фураноны обладают антимикробным действием в отношении большого числа грамположительных и грамотрицательных бактерий и подавляют образование биопленок. При этом рост грамположительных бактерий замедляется даже в концентрациях фуранонов не токсичных для клеток млекопитающих [5].

Целью работы было идентифицировать соединения из группы фуранонов и пирроллинонов, эффективно подавляющих рост и образование биопленок бактериями *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Micrococcus luteus*.

**Экспериментальная часть.** В Химическом институте КФУ были синтезированы галоген-производные фуранонов. Нами был проведен скрининг соединений эффективно подавляющих рост и образование биопленок бактериями *S. aureus*, *S. epidermidis* и *M. luteus*. Для этого культуры клеток выращивали 24 часа в 96-луночных пластиковых планшетах в присутствии тестируемых соединений в концентрации 10 мкг/мл. Контролем служила культура клеток с добавлением ДМСО, который являлся растворителем тестируемых соединений. После 3 суток инкубирования проводили анализ образования биопленки в присутствии соединений. Анализ основан на способности клеток в составе биопленок окрашиваться красителем и не смываться водой с поверхности. Образование биопленки считали достоверным, когда оптическая плотность превышала значение 0.1. В результате были отобраны соединения, подавляющие рост и образование биопленок клетками хотя бы двух штаммов (*S. aureus*, *S. epidermidis* и *M. luteus*) в 2 раза и более: фураноны 6, 8, 29, 35, 83 и пирролиноны 21 и 22. Эти соединения, а также их предшественник для синтеза всех других соединений – мукохлорная кислота Ф1 в дальнейшей работе.

Критерием активности того или иного препарата выступает минимальная ингибирующая концентрация (МИК). МИК характеризует степень чувствительности возбудителя к антибиотику: чем ниже МИК, тем выше чувствительность. Для определения минимальных ингибирующих концентраций фуранонов и пирролинонов, полностью подавляющих образование биопленок, а также рост клеток, бактерии *S. aureus*, *S. epidermidis* и *M. luteus* выращивали 3 суток без качания при 37°C на среде БМ в лунках по 300 мкл с добавлением веществ в концентрациях 0.1-500 мкг/мл. Результаты исследования приведены в таблице 1.

Таблица 1. – Минимальные концентрации соединений, подавляющие рост и образование биопленок.

№	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>M. luteus</i>	
	Концентрация, мкг/мл					
	Подавление роста	Подавление образования биопленок	Подавление роста	Подавление образования биопленок	Подавление роста	Подавление образования биопленок
Ф1	5	5	2,5	2,5	50	50
Ф6	5	5	5	5	50	50
Ф8	25	5	2,5	2,5	100	100
Ф29	25	25	5	5	50	50
Ф35	25	25	10	10	50	50
Ф83	25	25	5	5	25	25
П21	5	2,5	5	2,5	2,5	2,5
П22	25	2,5	2,5	2,5	50	2,5

Обязательным этапом проверки лекарственных соединений является проверка их мутагенного и цитотоксического действия.

Таблица 2. – Определение мутагенности соединений в тесте Эймса.

Соединение	Превышение над контролем, раз (кол-во клеток)		
	МИК, 1х	МИК, 2х	МИК, 4х
Ф1	0.08 (1±1.5)	0.2 (2±2.1)	0.08(1±0.6)
Ф6	0.2(2±0.6)	0.08(1±0.6)	0.08(1±0.6)
Ф8	0.3(4±3.5)	0.5(6±4.1)	0.7(8±9.1)
Ф29	0.08(1±0.7)	0.2(2±1.5)	0.3(3±2.0)
Ф35	1.3(15±4.0)	1.2(14±4.7)	0.7(9±3.1)
Ф83	0.3(4±3.6)	0.2(2±2.9)	0(0±0.6)
П21	0.08 (1±0.9)	0.08(1±1.1)	0.2(2±1.0)
П22	0.6(7±4.5)	0.3(3±2.3)	0.08(2±2.1)
NaN <sub>3</sub> (положительный контроль)	5.3(63±5.0)	5.3 (63±5.0)	5.3(63±5.0)
Отрицательный контроль	1(12±3.0)	1(12±3.0)	1(12±3.0)

Одним из важнейших тестов на мутагенность веществ является проба на генные мутации в тесте Эймса *Salmonella typhimurium*. Метод основан на регистрации частоты мутаций, приводящих к реверсии ауксотрофных по гистидину штамма *S.typhimurium* к прототрофности. Тестируемое вещество считается мутагенным, если число колоний-ревертантов в опыте достоверно превышает таковое в контроле (растворителе) более чем в 2 раза.

В результате теста было установлено, что ни один из отобранных фуранонов и пирролинонов не продемонстрировал мутагенного действия, что свидетельствует об отсутствии генотоксичности этих соединений. Результаты представлены в таблице 2.

Чтобы проверить полученные данные по генотоксичности, исследовали ДНК-повреждающую активность фуранонов и пирролинонов с помощью SOS-хромотеста. Полученные результаты показали, что ни одно соединение в концентрации, подавляющей образование биопленок у бактерий, не вызывало повышения SOS-ответа в UMU тесте, что говорит об отсутствии повреждения ДНК клеток (таблица 3).

Таблица 3. – ДНК повреждающая активность фуранонов и пирролинонов.

Соединение	Концентрация соединения в ДНК-повреждающем тесте, мкг/мл	Превышение над контролем, раз
Ф1	5	0.54
Ф6	5	0.61
Ф8	5	0.55
Ф29	25	0.68
Ф35	25	0.86
Ф83	25	0.76
П21	2.5	0.96
П22	2.5	0.27
Митомицин С (положительный контроль)	1	22.71
ДМСО (отрицательный контроль)	5	1.00

На следующем этапе исследовали токсичность фуранонов и пирролинонов для клеток зукариот. Для проверки цитотоксичности использовали метаболический МТС – анализ на клетках MCF7 и фибробластах человека. Этот анализ основан на подавлении активности митохондриальной дегидрогеназы в присутствии токсичного соединения и способности окислять субстрат МТС (3-(4,5-диметилт-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил) -2-(4-сульфопенил)-2Н-тетразолиум) с использованием феназинметосульфата в качестве электрон-связывающего реагента. По полученным данным подсчитывали коэффициент цитотоксичности  $CC_{50}$  (концентрация вещества, при которой 50% активности снижается в 2 раза). Из 8 проанализированных соединений фуранон Ф1, Ф29 и Ф35 демонстрировали значение  $CC_{50}$ , которое превышает концентрацию, подавляющую образование биопленок *S.epidermidis*. Остальные соединения приводили к снижению активности дыхания фибробластов. В таблице 4 представлены концентрации соединений, снижающие активность митохондриальной дегидрогеназы на 50% ( $CC_{50}$ ).

Также проводили микроскопирование для выявления негативного эффекта фуранонов и пирролинонов на морфологию клеток на вторые сутки. Было установлено, что фуранон 35 не влияет на морфологию клеток MCF7 при концентрации 10 мкг/мл, при которой образование биопленок снижалось в 3 раза. В случае фибробластов они также не оказывали влияния при концентрациях до 10 мкг/ мл. Следовательно, фуранон 35 можно считать перспективным соединением для использования для подавления образования биопленок клетками бактерий.

Также проверяли способность фуранонов разрушать бактериальную биопленку и усиливать эффект антибиотиков. Для этого клетки выращивали 3 суток на среде ВМ в

присутствии испытуемых соединений до образования стойкой биопленки. Затем в среду культивирования вносили хлорамфеникол до концентрации 10 мкг/мл, и растили в течении суток. Затем клетки окрашивали пропидия йодидом и ФДА и исследовали путем флуоресцентной микроскопии.

Таблица 4. – Минимальная ингибирующая концентрация и СС50.

Соединение	МИК (биопленки), мкг/мл			СС <sub>50</sub> , мкг/мл	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>M. luteus</i>	фибробласты	МСF7
Ф1	5	2.5	50	5.59	73.25
Ф6	5	5	50	0.53	54.8
Ф8	5	2.5	100	0.83	44.2
Ф29	25	5	50	8.9	61.79
Ф35	25	10	50	13.12	74.9
Ф83	25	5	25	1.05	57.8
П21	2.5	2.5	2.5	1.03	54.9
П22	2.5	2.5	2.5	0.99	56.9

По причине наличия биопленки, в отсутствии фуранонов количество мертвых клеток было незначительным. При внесении Ф6, Ф8, Ф35 и П22 наблюдалось значительное снижение количества жизнеспособных клеток, вероятно, благодаря разрушению биопленки и повышению доступности клеток бактерий для антибиотика. Таким образом, внесение фуранонов способствует разрушению биопленок и повышению эффективности антибиотиков.

**Заключение.** Таким образом, можно сделать вывод, что фуранон Ф35 может быть эффективным агентом, подавляющим образование биопленок бактериями *S. aureus*, *S. epidermidis* и *M. luteus*, поскольку он не обладает мутагенными свойствами и цитотоксичностью для клеток эукариот в рабочих концентрациях. Следовательно, Ф35 может быть перспективным соединением в сфере медицины, используемым для обработки поверхностей и медицинского оборудования для предотвращения образования биопленок.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-31635 мол\_а.*

#### Список литературы

- 1) Gilbert P., Maira-Litran T., McBain A.J. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities // *Adv. Microb. Physiol.* 2002. V.46. P.202-256.
- 2) Saising J., Dube L., Ziebandt A.K., Voravuthikunchai S.P., Nega M., Götz F. Activity of gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms // *Antimicrob Agents Chemother.* 2012. P.5804-5810.
- 3) Vuong C., Voyich J.M., Fischer E.R., Braughton K.R., Whitney A.R., DeLeo F.R., Otto M. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system // *Cell Microbiol.* 2004. P.269-75.
- 4) Ren D., Laura A., Bedzyk, Setlow P., Dacre F., Kjelleberg S., Thomas S. M., Ye R. W., Wood T. K. Differential Gene Expression To Investigate the Effect of (5Z)-4-Bromo-5-(Bromomethylene)-3-Butyl-2(5H)-Furanone on *Bacillus subtilis* // *Applied and environmental microbiology.* 2004. P.4941-4949.
- 5) Janssens J.C., Steenackers H., Robijns S. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. // *Appl Environ Microbiol.* 2008. P.6639-6648.