

УДК 579.246:579.61

Ингибиторы образования биопленок бактериями *Bacillus subtilis* на основе тиопроизводных 2(5H)-фуранона

Е. Ю. Тризна^{1*}, Э. Н. Хакимуллина¹, Л. З. Латыпова¹, А. Р. Курбангалиева¹,
И. С. Шарафутдинов¹, В. Г. Евтюгин¹, Э. В. Бабынин¹, М. И. Богачев², А. Р. Каюмов¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

²Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ», 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 5

*E-mail: trizna91@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2014

После доработки 09.02.2015

РЕФЕРАТ Грамположительные бактерии вызывают широкий спектр инфекционных заболеваний, в том числе и внутрибольничные инфекции. В составе биопленки бактерии становятся устойчивыми к антибиотикам и иммунной системе человека, что вызывает трудности при лечении и определяет необходимость разработки ингибиторов формирования биопленки. Бактерии *Bacillus subtilis* широко используются в качестве модельного организма для изучения образования биопленок. Изучено влияние новых синтезированных 2(5H)-фуранонов на формирование биопленок клетками бацилл. Из 57 проверенных соединений образование биопленки подавляли серусодержащие производные 2(5H)-фуранона F12, F15 и F94, взятые в концентрации 10 мкг/мл. Показано, что F12 и F94 подавляли биосинтез GFP с промотора оперона *eps*, кодирующего гены синтеза экзополисахарида биопленки (EPS). Методом дифференциального флуоресцентного окрашивания установлено, что в присутствии F12, F15 и F94 значительно повышается чувствительность клеток бацилл к воздействию антибиотиков (канамицин и хлорамфеникол). Максимальный эффект оказывал F12. F15 разрушал уже сформированную биопленку и значительно повышал чувствительность бактерий к антибиотикам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антибактериальная активность, биопленки, 2(5H)-фураноны, *Bacillus subtilis*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МПК – минимальная подавляющая концентрация; МБПК – минимальная концентрация, подавляющая образование биопленки.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время показано, что большинство бактерий существуют в природе в виде специфически организованных биопленок. Биопленки представляют собой тесно адгезированное к субстрату сообщество дифференцированных микробных клеток, заключенных в полисахаридный матрикс (EPS). Такая форма существования предоставляет бактериям ряд преимуществ в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина. Это приводит к повышению эффективности биотехнологических процессов, с одной стороны, а с другой, к повышению устойчивости к противомикробным веществам, антисептикам и дезинфектантам, рефрактерности к лечению, что в результате приводит к увеличению частоты внутрибольничных инфекций, создает трудности в микробиологической диагностике инфекционных заболеваний [1–3]. Таким образом, биопленки представляют серьезную проблему и тре-

буют разработки препаратов, разрушающих бактериальные биопленки и подавляющих их образование на предметах медицинского назначения. Бациллы, грамположительные спорообразующие палочки, например *Bacillus anthracis* и *B. cereus*, вызывающие сибирскую язву и тяжелые пищевые токсикоинфекции, также образуют биопленки на различных поверхностях [1]. В качестве модельного объекта для изучения бациллярных биопленок широко используют клетки *B. subtilis* [1].

В настоящее время для борьбы с бактериальными биопленками применяют покрытие поверхностей частицами серебра, иммобилизованными ферментами, разрушающими матрикс биопленки, а также различные низкомолекулярные вещества – ингибиторы генов образования биопленок [4]. Среди таких соединений особое место занимают вещества 2(5H)-фуранонового ряда [5], первоначально выделенные из красной морской водоросли *Delisea pulchra*.

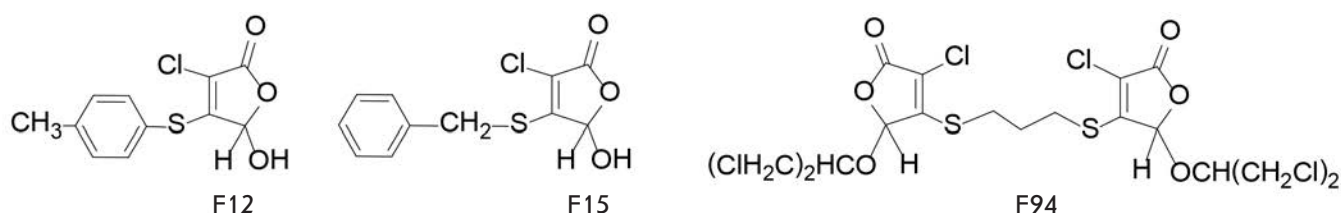


Рис. 1. Структурные формулы фуранонов, подавляющих образование биопленок *B. subtilis* при концентрации 10 мкг/мл

Таблица 1. Минимальные концентрации фуранонов, подавляющие рост и образование биопленок клетками *B. subtilis* 168, цито- и генотоксические свойства соединений

Фуранон	Минимальная подавляющая концентрация (МПК), мкг/мл	Минимальная концентрация, подавляющая образование биопленок (МБПК), мкг/мл	CC ₅₀ для клеток MCF7, мкг/мл	Генотоксичность соединений (превышение над контролем, разы/количество клеток)	
				Тест Эймса*	SOS-хромотест*
F12	25	10	36.9	2.4 (109 ± 25.2)	0.69
F15	25	10	65.7	3.1 (133 ± 25.4)	0.61
F94	50	10	83.9	0.9 (41 ± 4.4)	1.09
Контроль**	–	–	–	1.0 (45 ± 3.5)	1.00
Позитивный контроль***	–	–	–	8.2 (369 ± 15.6)	22.71

*Генотоксичность определяли при концентрации фуранонов 10 мкг/мл, что соответствует их МБПК.

**Диметилсульфоксид в количестве, вносимом в виде раствора фуранона.

***Азид натрия (3 мкг/мл) в тесте Эймса и митомицин С (0.1 мкг/мл) в SOS-хромотесте.

Таблица 2. Влияние фуранонов на толщину биопленки клеток *B. subtilis*

Фуранон	Толщина биопленки, мкм	
	Культивирования с предварительными внесенными фуранонами, 96 ч	Добавление фуранонов к сформированной биопленке с последующей инкубацией в течение 24 ч
Контроль	10 ± 1.6	10 ± 1.3
F12	4 ± 0.4	6 ± 0.3
F15	2 ± 0.3	4 ± 0.2
F94	4 ± 0.6	8 ± 0.7

Показано, что производные фуранонов обладают антимикробным действием в отношении большого числа грамположительных и грамотрицательных бактерий и подавляют образование ими биопленок [5, 6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Фураноны

На рис. 1 представлены структурные формулы исследованных соединений: F12 – 5-гидрокси-4-[(4-

метилфенил)сульфанил]-3-хлор-2(5H)-фуранон [7], F15 – 4-бензилсульфанил-5-гидрокси-3-хлор-2(5H)-фуранон [8] и F94 – 1,3-бис[3-хлор-5-(1,3-дихлорпропан-2-илокси)-2(5H)-фуранон-4-илсульфанил]пропан [9], синтезированы по известным методикам.

Штаммы и условия культивирования

В работе использовали следующие штаммы: *B. subtilis* 168 [10]; *B. subtilis* K511 [11], несущий ген *gfp* под контролем промотора гена *epsA*, активного при образовании биопленок у бацилл.

Для проверки мутагенности соединений использовали штаммы *Salmonella typhimurium* TA100 (*HisG46, rfa, uvr-, pkm 101, bio-*) [12] и *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 [13].

Все бактериальные штаммы культивировали в среде LB (триптон – 1.0 г/л; дрожжевой экстракт – 0.5 г/л; NaCl – 0.5 г/л; pH 8.5) [14]. Образование биопленок бациллами определяли с использованием среды BM (Basal medium), представляющей модифицированную среду SMM [15], с внесением пептона до 7 г/л.

Окрашивание биопленок кристаллическим фиолетовым

Образование биопленок анализировали в 96-луночных пластиковых планшетах (Cellstar Grenier bio-one No. 655 180) методом окрашивания кристаллическим фиолетовым. Бактерии выращивали без качания при 37°C на среде BM в лунках, содержащих по 200 мкл культуры бактерий начальной плотностью 3×10^7 КОЕ/мл. Через 72 ч культивирования удаляли культуральную жидкость, однократно промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) pH 7.4 и просушивали в течение 20 мин. Вносили 150 мкл 0.1% раствора кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich) в 96% этаноле, инкубировали в течение 20 мин. Несвязавшийся краситель смывали PBS. Связавшийся краситель элюировали в 150 мкл 96% этилового спирта и измеряли поглощение при длине волны 570 нм на микропланшетном ридере Tecan infinite 200 Pro (Швейцария). В качестве контроля использовали лунки, в которых клетки не инкубировали, но проводили все манипуляции процесса окрашивания.

Определение минимальной подавляющей концентрации

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) фуранонов определяли методом микро-разведений в среде BM. Концентрации фуранонов после серийных разведений составляли 0.1–500 мкг/мл. Лунки засеивали 200 мкл бактериальной культуры (3×10^7 КОЕ/мл) в среде BM и инкубировали при 37°C. Минимальную подавляющую концентрацию определяли как наименьшую концентрацию фуранона, при которой отсутствовал видимый рост бактерий к 24 ч инкубации. Минимальную концентрацию, подавляющую образование биопленок (МБПК), определяли как наименьшую концентрацию фуранонов, которая полностью подавляла образование биопленок через 72 ч роста.

Определение гено- и цитотоксичности фуранонов

Мутагенность фуранонов в концентрации МБПК оценивали в тесте Эймса [12]. В качестве отрицатель-

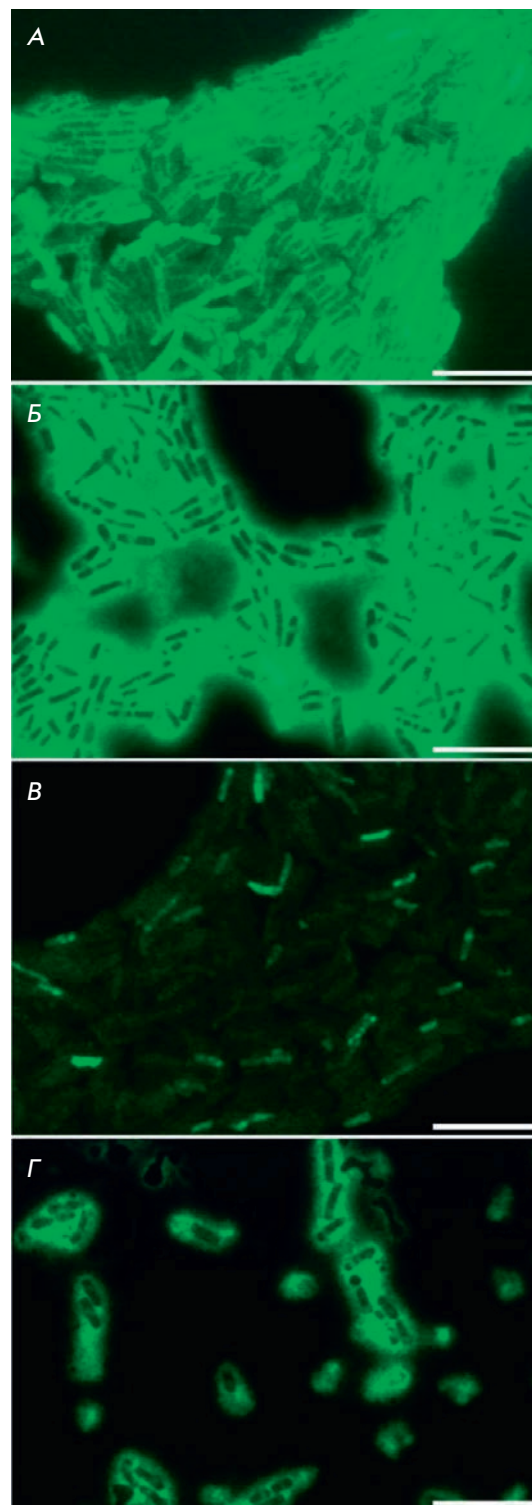


Рис. 2. Влияние фуранонов на интенсивность свечения GFP, экспрессируемого с промотора оперона *eps* в клетках *B. subtilis* K511. Клетки выращивали в течение 72 ч в присутствии F12 (Б), F15 (В), F94 (Г) в концентрации 10 мкг/мл (соответствует МБПК). Контроль (А) – культура, выращенная в отсутствие фуранонов. Масштабная черта 10 мкм

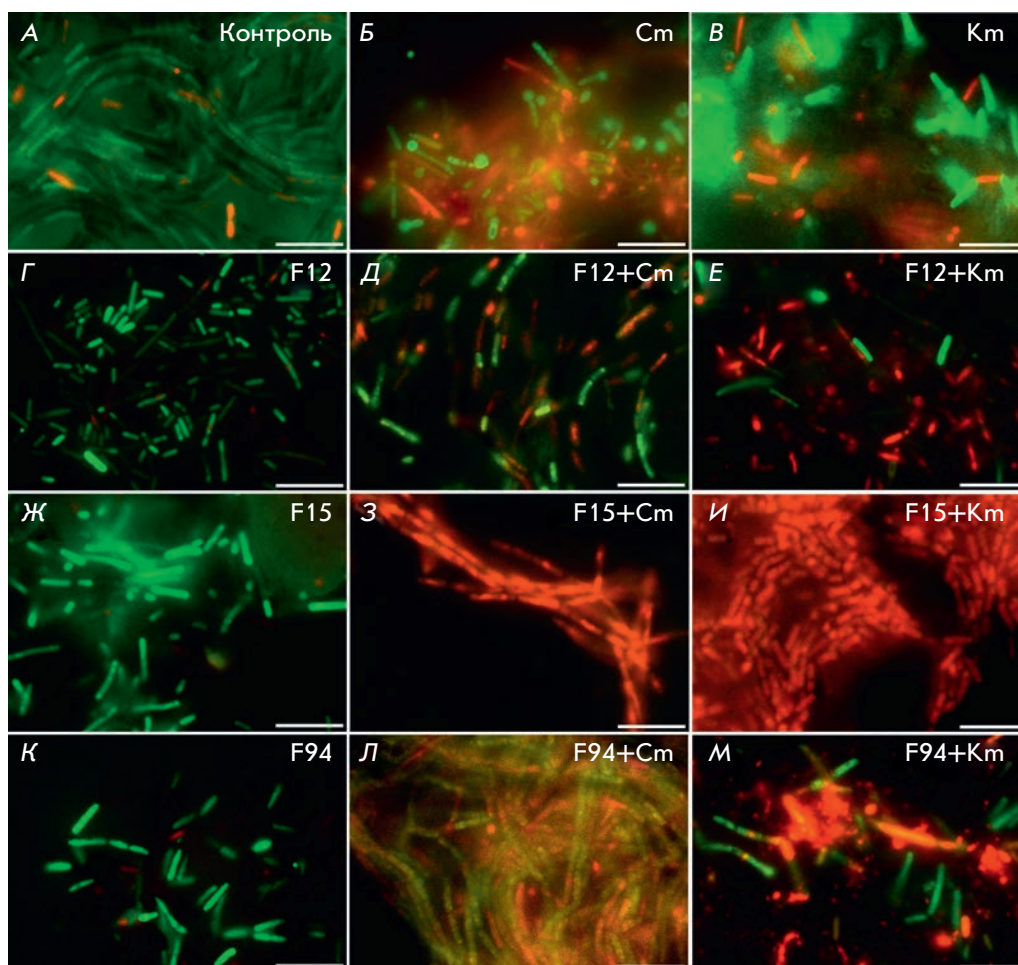


Рис. 3. Влияние фуранонов на образование биопленки бактериями *B. subtilis* и чувствительность к антибиотикам клеток *B. subtilis*, адгезированных на поверхности культуральной чашки. Клетки *B. subtilis* 168 выращивали в течение 72 ч для формирования биопленки (А, Б, В) в присутствии фуранонов (Г, Ж, К) в концентрации 10 мкг/мл (соответствует МБПК), затем вносили хлорамфеникол (См) (Д, З, Л) или канамицин (Км) (Е, И, М). Количество жизнеспособных клеток через 24 ч инкубации с антибиотиком оценивали путем окрашивания клеток йодидом пропидия и флуоресцеиндицетатом. Масштабная черта 10 мкм

ного контроля использовали растворитель диметилсульфоксид (ДМСО), в качестве положительного – азид натрия (NaN_3). Тестируемое вещество считали мутагенным, если число колоний-ревертантов в опыте более чем в 2 раза превышало их число в контроле (растворителе). ДНК-повреждающую активность соединений оценивали в SOS-хромотесте на штамме *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 [13]. Ночную культуру бактерий разводили в среде LB в 10 раз и растили в течение 4 ч в присутствии исследуемых соединений. Затем клетки собирали центрифугированием и определяли в них активность β -галактозидазы согласно [16]. Цитотоксичность веществ определяли на клетках линии MCF7 с помощью метаболического MTS-теста (Promega). Рассчитывали коэффициент цитотоксичности CC_{50} (концентрация вещества, при которой активность снижается в 2 раза).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами ранее были идентифицированы галоген- и серусодержащие производные 2(5H)-фуранона, по-

давливающие образование биопленок *B. subtilis* [6]. Дополнительный скрининг 56 соединений позволил идентифицировать дополнительно два фуранона (F15 и F94), в концентрации 10 мкг/мл подавляющих образование биопленки клетками бацилл (табл. 1). Ф2 и Ф8 (5-гидрокси-4-[(4-метилфенил)-сульфанил]-3-хлор-2(5H)-фуранон и 3,4-дихлор-5-(1,3-дихлорпропан-2-илокси)-2(5H)-фуранон соответственно), охарактеризованные в работе [6], повышали активность системы генетической компетентности бацилл и не были включены в дальнейшее исследование. F15 и F94 не повышали активность фактора транскрипции ComA, активирующего систему развития генетической компетентности бацилл (не показано).

Чтобы установить влияние фуранонов на уровень экспрессии оперона *eps*, кодирующего гены синтеза экзополисахарида биопленки, клетки *B. subtilis* K511, несущие ген *gfp* под контролем промотора гена *epsA*, выращивали в среде ВМ в течение 72 ч в присутствии и в отсутствие фуранонов и анали-

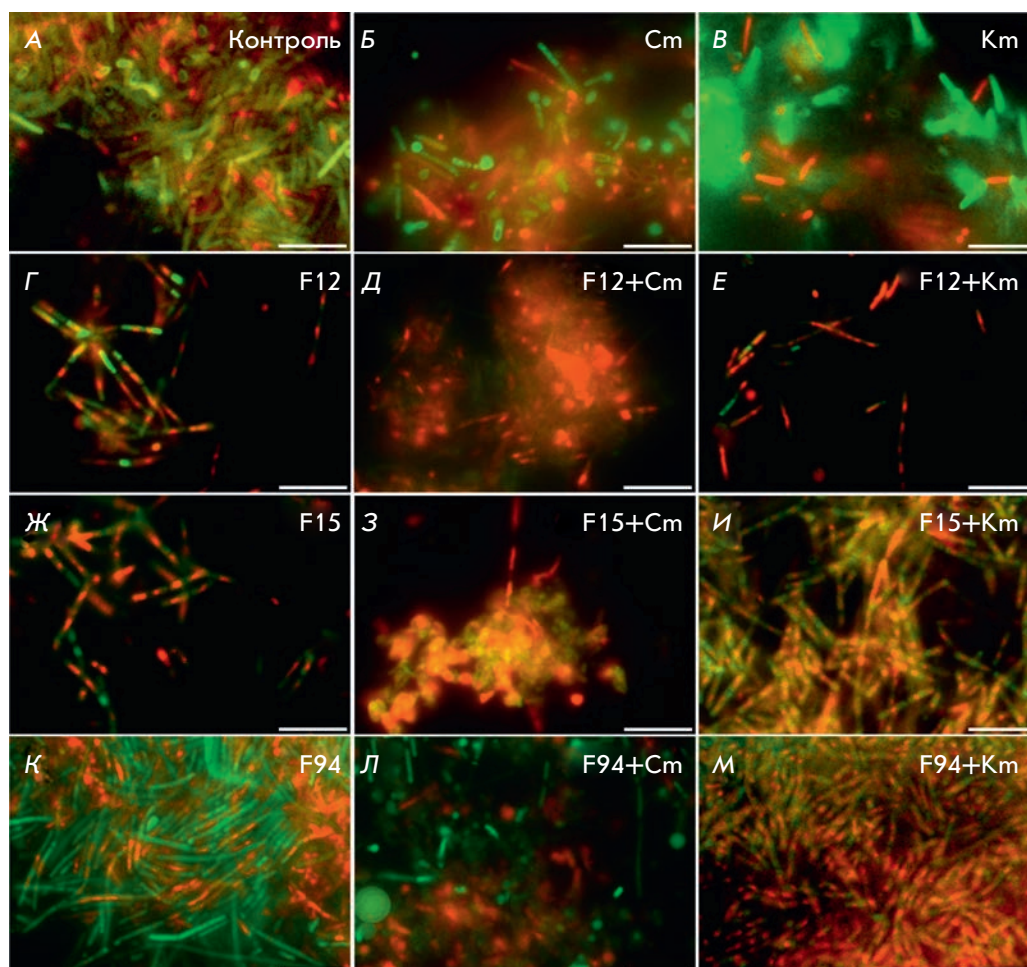


Рис. 4. Фураноны разрушают биопленку и повышают эффективность антибиотиков против клеток *B. subtilis* в составе сформированной биопленки. Клетки *B. subtilis* 168 выращивали в течение 72 ч для формирования биопленки (А, Б, В), затем вносили фураноны до конечной концентрации 30 мкг/мл (трехкратное превышение МБПК) в присутствии хлорамфеникола (См) (Д, З, Л) или канамицина (Км) (Е, И, М). Количество жизнеспособных клеток через 24 ч инкубации с антибиотиком оценивали, окрашивая клетки йодидом пропидия и флуоресцеиндицетатом. Масштабная черта 10 мкм

зировали на флуоресцентном микроскопе (рис. 2). Выявление GFP в клетках в отсутствие фуранонов свидетельствовало об экспрессии оперона *eps* и образовании клетками экзополисахарида – основы матрикса биопленки (рис. 2А). В присутствии фуранонов F12 и F94 GFP не идентифицировался, что говорит о репрессии образования экзополисахарида и, как следствие, о подавлении образования биопленки в присутствии данных соединений (рис. 2Б,Г). По всей видимости, молекулярными мишенями этих соединений являются регуляторные пути адаптации организмов к стрессовым условиям. Так, показано, что F12 ингибирует активность факторов транскрипции *Spo0A* и *TnrA* [6]. Напротив, GFP выявляется и в присутствии F15, но в значительно меньшем количестве по сравнению с контролем, следовательно, подавления оперона *eps* не происходило. Вероятно, соединение F15 ингибирует образование биопленки другим путем, не затрагивая регуляцию оперона *eps*.

Фураноны повышают чувствительность адгезированных клеток к антибиотикам

Известно, что противомикробные средства малоэффективны против бактерий в составе биопленки. Предположительно, подавление образования биопленки должно повышать эффективность антибиотических препаратов. Потенциальный синергизм фуранонов с антибиотиками изучали методом «шахматной доски», где концентрации фуранона и антибиотика (канамицин и хлорамфеникол) варьировали от 0.1 до 2.0 МПК [17]. Однако ни одно соединение не проявило синергизма с противомикробными препаратами в отношении планктонных клеток ($FIC = 1.2 \pm 0.21$).

Чтобы проверить, будут ли фураноны повышать чувствительность к антибиотикам бактерий, адгезированных на поверхностях, бациллы выращивали в среде ВМ в течение 72 ч в присутствии фуранонов в концентрации 10 мкг/мл (МБПК), затем вносили антибиотики (хлорамфеникол и канамицин) до конечных концентраций 10 мкг/мл (установленные

МПЖ составляли 2.5 мкг/мл). После 24 ч культивирования удаляли культуральную жидкость, биопленку промывали PBS и проводили дифференциальное флуоресцентное окрашивание йодидом пропидия и флуоресцеиндиацетатом для выявления соответственно мертвых и живых клеток в слое микробных клеток, адгезированных на поверхности культуральной чашки. Полученные препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axio Imager 2.0 (рис. 3).

В контрольной пробе наблюдали образование биопленки толщиной до 10 мкм (рис. 3А, табл. 2), при этом внесение хлорамфеникола (рис. 3Б) или канамицина (рис. 3В) приводило к гибели лишь незначительной части адгезированных клеток. Напротив, в культуре, выращенной в присутствии F15 (10 мкг/мл), толщина биопленки составляла 2 мкм, и внесение антибиотика приводило практически к полной гибели бактерий (рис. 3З,И), тогда как сам фуранон не вызывал бактерицидного эффекта (рис. 3Ж). В случае F12 и F94 в концентрации 10 мкг/мл эффект был менее выражен. Таким образом, присутствие фуранонов в среде культивирования подавляло образование биопленки на поверхности культуральной чашки и повышало эффективность антибиотиков, по всей видимости, благодаря большей доступности бактериальных клеток для антимикробных соединений.

Также исследовали возможность разрушения бактериальной биопленки в присутствии фуранонов. С этой целью клетки бактерий выращивали в среде ВМ в течение 72 ч, удаляли культуральную жидкость и вносили чистую среду ВМ с добавлением фуранонов (30 мкг/мл), канамицина и хлорамфеникола. Через 24 ч остаточную биопленку промывали PBS и проводили дифференциальное флуоресцентное окрашивание (рис. 4).

В отсутствие фуранонов, как и в предыдущем опыте, антибиотики оказались малоэффективными против клеток, включенных в матрикс биопленки (рис. 4Б,В). Внесение F12 (30 мкг/мл) вызывало значительное разрушение биопленки через 24 ч

(табл. 2), добавление антибиотиков вызывало гибель подавляющего большинства клеток (рис. 4Г–Е). При этом эффект F15 был менее выражен, а F94 практически не повышал чувствительность клеток к антибиотикам и не вызывал разрушения биопленки (рис. 3Ж–М).

Цито- и генотоксические свойства соединений F12, F15 и F94

Определение цитотоксичности F12, F15 и F94 показало, что значения CC_{50} у них в 7 раз превышали концентрации, необходимые для подавления образования биопленок (табл. 1). Хотя SOS-хромотест не выявил ДНК-повреждающей активности у этих соединений, данные теста Эймса свидетельствовали о потенциальной мутагенности F12 и F15.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, серусодержащие фураноны F12 и F15 могут представлять интерес для дальнейшей разработки на их основе ингибиторов бактериальных биопленок. Однако потенциальная мутагенная активность этих фуранонов, выявленная в тесте Эймса, является противопоказанием для прямого использования и требует дальнейшей модификации структуры. ●

Данное исследование выполнено с использованием оборудования Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ID RFMEFI59414X0003).

Работа поддержана государственной программой повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров, Министерством образования и науки РФ (контракт № 2014/187) и РФФИ (грант № 14-04-31635 мол_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vlamakis H., Chai Y., Beaugregard P., Losick R., Kolter R. // Nat. Rev. Microbiol. 2013. № 11. P. 15–168.
- Каюмов А.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Костров С.В., Шарипова М.Р. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 5. С. 557–563.
- Schmidt T., Ziganshin A.M., Nikolausz M., Scholwin F., Nelles M., Kleinstaub S., Pröter J. // Biomass Bioenergy. 2014. V. 69. P. 241–248.
- Ma Y., Xu Y., Yestrepsky B.D., Sorenson R.J., Chen M., Larsen S.D., Sun H. // PLoS One. 2012. P. 1–10.
- Lonn-Stensrud J., Landin M.A., Benneche T., Petersen F.C., Scheiel A.A. // J. Antimicrobial Chemotherapy. 2009. № 63. P. 309–316.
- Kayumov A.R., Khakimullina E., Sharafutdinov I., Trizna E., Latypova L., Hoang L., Margulis A., Bogachev M., Kurban-galiev A. // J. Antibiotics. 2014. № 143. doi:10.1038/ja.2014.143 (epub ahead of print)
- Kurbangaliev A.R., Devyatova N.F., Bogdanov A.V., Berd-nikov E.A., Mannafov T.G., Krivolapov D.B., Litvinov I.A., Chmutova G.A. // Phosphorus, Sulfur, Silicon, Relat. Elem. 2007. V. 182. № 3. P. 607–630.
- Латыпова Л.З., Сайгитбаталова Е.Ш., Чулакова Д.Р., Лодоч-никова О.А., Курбангалиева А.Р., Бердников Е.А., Чмутава Г.А. // Журн. орг. химии. 2014. Т. 50. Вып. 4. С. 532–545.
- Хоанг Т.Л., Хазиев Р.М., Зарипова А.Р., Курбангалиева А.Р., Чмутава Г.А. // Сб. тезисов III Всероссийской научной кон-

- ференции (с международным участием) «Успехи синтеза и комплексообразования». Москва, 21-25 апреля 2014. М.: РУДН, 2014. С. 205.
10. Kayumov A., Heinrich A., Sharipova M., Iljinskaya O., Forchhammer K. // *Microbiology*. 2008. V. 154. P. 2348–2355.
11. Kobayashi K. // *Mol. Microbiol.* 2008. № 69. P. 1399–1410.
12. Ames B.N., McCann J. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1976. № 271. P. 5–13.
13. Oda Y., Nakamura S., Oki I., Kato T., Shinagawa H. // *Mutat Res.* 1985. № 147. P. 219–229.
14. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. P. 4–16.
15. Kayumov A., Heinrich A., Sharipova M., Iljinskaya O., Forchhammer K. // *Microbiology*. 2008. V. 154. P. 2348–2355.
16. Fedorova K., Kayumov A., Woyda K., Ilinskaja O., Forchhammer K. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 1293–1298.
17. Prichard M.N., Jr., Shipman C. // *Antiviral Res.* 1990. № 14. P. 181–206.