

УДК 579.083.13

Н. В. Белоногова, Т. С. Бардина, В. Я. Пономарев,  
А. И. Колпаков, А. Б. Маргулис, О. Н. Ильинская

## ГАЛОГЕНИРОВАННЫЕ ФУРАНОНЫ КАК МОДИФИКАТОРЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

*Ключевые слова:* галогенированные фураноны, *Staphylococcus aureus*, тепловой шок, физиологическая активность.

*Исследовано влияние галогенированного фуранона на устойчивость Staphylococcus aureus к тепловому шоку. Показано, что исследуемый фуранон, предположительно, снижает вирулентные свойства стафилококка и усиливает эффект теплового шока на клетки.*

*Keywords:* halogenated furanones, *Staphylococcus aureus*, heat shock, physiological activity.

*Studied the effect of halogenated furanone on Staphylococcus aureus resistance to heat shock. It is shown that the investigated furanone supposedly reduces virulence of Staphylococcus aureus and enhances the effect of heat shock on the cells.*

### Введение

В последние годы растет количество публикаций, в которых приведены результаты изучения реакции микроорганизмов на различные стрессорные воздействия. Значительная часть этих исследований направлена на изучение так называемого "starvation stress", вызванного влиянием лимита различных факторов питания на жизнедеятельность микроорганизмов. Существуют и другие раздражители, способные вызывать состояние стресса у бактерий. Среди них наиболее известны физические (температурные, радиационные и т.п.), физико-химические (рН, рО<sub>2</sub>, рСО<sub>2</sub>), биологические (бактериофаги, бактериальные токсины и т.п.) [1].

Несмотря на наличие исследований, посвященных реакциям бактерий на разные виды стрессорных воздействий, следует отметить недостаточность сведений о стрессе у микроорганизмов, имеющих значение в медицине. Кроме того, для изучения стресса у бактерий редко используются процессы управляемого культивирования в синтетических питательных средах, что весьма необходимо для создания условий управляемого стресса. Такие исследования могли бы иметь значение не только для углубления знаний о биологии бактериальной клетки, но и быть полезными в практическом отношении — в биотехнологии медицинских иммунобиологических препаратов. В этом направлении весьма перспективно изучение изменений в клетках микроорганизмов — возбудителей инфекционных заболеваний [1].

Порядка 30% населения являются постоянными носителями золотистого стафилококка, который может сохраняться на кожных покровах и слизистых оболочках верхних дыхательных путей [2].

Стафилококк может поражать многие органы и является возбудителем около 120 различных заболеваний. Заболевания кожи и подкожной клетчатки — фурункулы, карбункулы,

абсцессы, флегмоны, пиодермии, фолликулиты, «стафилококковая рожа» и другие. Помимо этого, к поражениям кожи относятся скарлатиноподобные сыпи при других стафилококковых заболеваниях. Поражение костей и суставов чаще происходит при генерализованной инфекции, когда стафилококк циркулирует в крови. Синдром токсического шока возникает при тяжелых формах инфекции, когда в кровь попадает слишком большое количество токсинов. Стафилококковый менингит и абсцесс мозга развиваются в результате стафилококкового сепсиса (заражения крови). Стафилококк также является частым возбудителем ряда воспалительных заболеваний глаз, в первую очередь, ячменей и конъюнктивитов. Золотистый стафилококк часто входит в состав нормальной микрофлоры человека. Подавляющее число стафилококковых инфекций носит эндогенный характер, связанный с активацией аутомикрофлоры [3]. Этот факт подчеркивает безусловную важность исследований, связанных с возможностью направленной регуляции интенсивности жизнедеятельности такого рода бактерий.

Действие неблагоприятных факторов на микробные клетки приводит к синтезу большого количества ростингибирующих соединений и специальных белков. Наиболее известными из них являются так называемые белки теплового шока (БТШ), появляющиеся под воздействием повышенной температуры. БТШ у патогенных микроорганизмов могут действовать как факторы вирулентности, они выполняют роль шаперонов, блокируют образование третичной и четвертичной структуры вновь синтезируемых белков и обеспечивают их транспорт через мембрану. Все гены теплового шока при нормальной температуре экспрессируются на остаточном уровне, при тепловом шоке экспрессия мгновенно возрастает на уровне транскрипции [4]. В ответ на стрессовые условия часто возрастает активность тех же ферментов, которые функционируют в нормальных

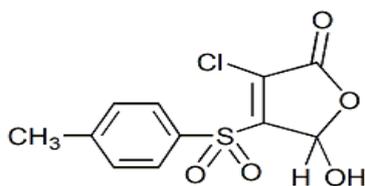
условиях. Пределы этой нормы неодинаковы для различных организмов [5].

Целью настоящей работы являлось оценить изменения физиолого-биохимических параметров клеток *Staphylococcus aureus* при стрессе в присутствии галогенированного фуранона – ингибитора кворум-процессов.

### Материалы и методы исследования

В работе использовали штамм *Staphylococcus aureus* ESh1- клинический изолят, проявляющий высокую гемолитическую активность.

В работе применяли серосодержащее производное фуранона (Ф1) 5-гидрокси-4-(4-метилфенилсульфонил)-3-хлор-2(5H)-фуранон (рисунок 1). Работали со следующими концентрациями: концентрации серосодержащего фуранона 1:0.1 мкг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл. Вещество растворяли в диметилсульфоксиде, конечная концентрация растворителя в среде не превышала 3%.



1

Рис. 1 – Формула серосодержащего производного фуранона (условно обозначен 1)

Условия культивирования *Staphylococcus aureus*: выращивание суточной культуры (24 часа) проводили на L-бульоне при 37°C.

Для определения гемолитической активности использовали кровяной агар с добавлением 5% суспензии эритроцитов барана. О величине общей гемолитической активности судили по размеру зон лизиса вокруг колоний *S. aureus* на кровяном агаре.

Для определения протеолитической активности использовали молочный агар: мясопептонный агар с добавлением 10 % пастеризованного молока. О величине протеолитической активности судили по размеру зон лизиса вокруг колоний *S. aureus* на молочном агаре.

Для определения лецитиназной активности использовали желточно-солевой агар (ЖСА): мясопептонный агар с добавлением 10% NaCl и 10% суспендированного желтка (желток одного яйца суспендируют в 200 мл 0,8% NaCl). О величине лецитиназной активности судили по зонам помутнения среды вокруг колоний *S. aureus* на ЖСА.

Тепловой шок (ТШ) вызывали выдерживанием аликвоты (6 мл) 18-часовой культуры *S. aureus* при 45°C или 60°C в течение 15 минут. После теплового шока проводили высев на плотные среды (кровяной агар, молочный агар, ЖСА) и осуществляли подсчет колоний в счетчике

колоний, сравнивали сохранение колониобразующей способности и различных ферментативных активностей у клеток, подвергнутых тепловому шоку.

### Влияние исследуемого фуранона на физиологическую активность стафилококка в условиях теплового стресса

При совместном действии теплового шока и исследуемого фуранона мы наблюдали снижение роста *S.aureus*. Тепловой шок 45°C индуцировал увеличение числа КОЕ по сравнению с контролем, происходила активизация сил клеток, направленных на выживание (рисунки 2-4). Низкие концентрации фуранона тоже стимулировали рост относительно контроля. Однако с повышением концентрации фуранона уменьшалась возможность ТШ стимулировать рост.

При тепловом шоке 60°C рост не наблюдали.

Для стафилококка образование различных ферментов является ключевым фактором вирулентности. Определение активности этих ферментов осуществляли посредством посева стафилококка на молочный (протеолитическая активность), кровяной (гемолитическая активность) и желточно-солевой (лецитиназная активность) агары. Рост наблюдали во всех вариантах.

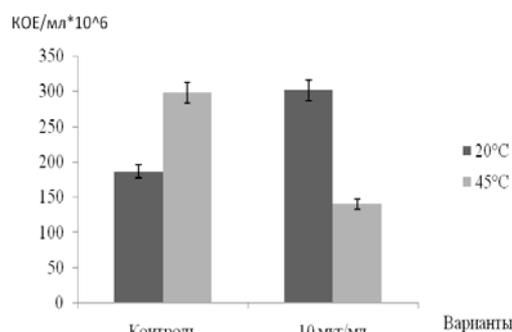


Рис. 2 – Количество КОЕ *S.aureus* на кровяном агаре до и после теплового шока при обработке исследуемым фураноном

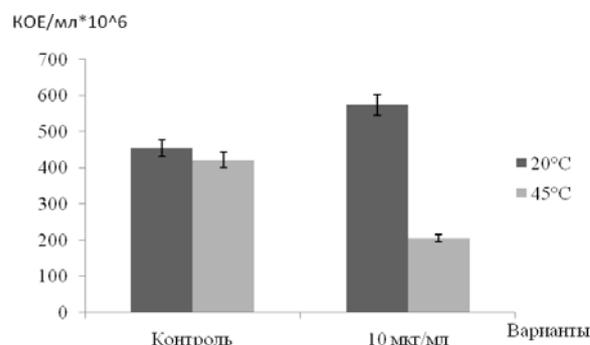
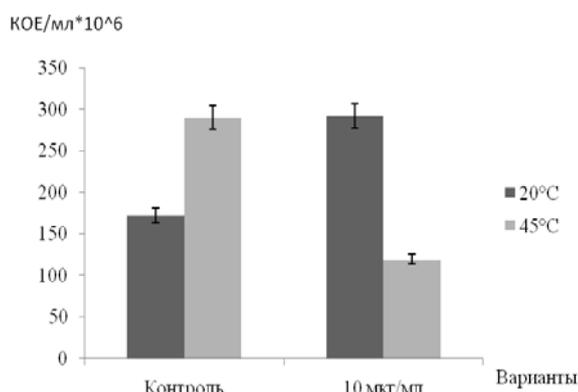


Рис. 3 – Количество КОЕ *S.aureus* на молочном агаре до и после теплового шока при обработке фураноном 1

На кровяном агаре гемолитическая активность оставалась высокая во всех вариантах, наблюдали значительные зоны гемолиза.



**Рис. 4 – Количество КОЕ *S.aureus* на желточно-солевом агаре до и после теплового шока при обработке фураноном 1**

При высева стафилококка на молочный агар наблюдали протеолитическую активность при тепловом шоке 45°C, при 60°C протеолитическая активность также присутствовала, но в меньшей степени.

При высева на желточно-солевой агар наблюдали активность, но в варианте с ТШ 45°C выросли только мелкие колонии, где только 21% КОЕ обладал лецитиназной активностью.

Таким образом, можно заключить, что при тепловом шоке (45°C, 15 мин) и наличии фуранона в низких концентрациях (0.1 мкг/мл) осуществляется стимуляция роста *S.aureus*, а высокая концентрация фуранона 1 (10 мкг/мл) подавляет рост клеток. Тепловой шок (60°C, 15 мин) приводит к замедлению роста культуры и к частичному ее лизису.

В условиях теплового шока 5-гидрокси-4-(4-метилфенилсульфонил)-3-хлор-2(5H)-фуранон в концентрации 10 мкг/мл уменьшает способность к колониеобразованию *Staphylococcus aureus*. В вариантах с обработкой фуранонами перед ТШ у клеток стафилококка гемолитическая активность присутствует во всех вариантах, но происходит ингибирование протеолитической и лецитиназной активности при ТШ 60°C. Лецитиназная активность проявляется только у 21% колоний. Таким образом, исследуемый фуранон, предположительно, снижает вирулентные свойства стафилококка и усиливает эффект теплового шока на клетки.

Ранее нами были показаны совместные эффекты теплового шока и гомосеринлактона на данный штамм *S. aureus* [6]. Кроме того, было показано, что исследования биологических

эффектов производных фуранонов перспективны в направлении поиска их активности в отношении клинически значимых штаммов микроорганизмов [7-9].

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

## Литература

1. Kluytmans, J. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks [Text] / J. Kluytmans, A. van Belkum, H. Verbrugh // Clin Microbiol Rev. - 1997. - P. 503.
2. Servant, P. Negative regulation of the heat shock response in *Streptomyces* [Text] / P. Servant, P. Mazodier // Arch Microbiol. - 2001. - V.176 - P.237-242.
3. Баснакьян, И.А. Стресс у бактерий [Текст] / И. А. Баснакьян // М.: Медицина, 2003. - С.9-14.
4. Ленглер, Й. Современная микробиология. Прокариоты [Текст] : [пер. с англ.] / Й. Ленглер, Г. Дреус, Г. Шлегель. - Москва: Мир, 2005. - 656с. - Перевод изд: Biology of the prokaryotes / Joseph W. Lengeler, Gerhard Drews, Hans G. Schlegel. - Stuttgart: Blackwell Science, 1999.
5. Покровский, В. И. Медицинская микробиология [Текст] / В. И. Покровский, О. К. Поздеев - Москва: ГЕОТАР Медицина, 1998. - 416с.
6. Белоногова, Н.В. Гомосеринлактон как модулятор функциональной активности клеток прокариот [Текст] / Н.В. Белоногова, А.Б. Маргулис, В.Я. Пономарев, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская // Вестник Казанского технологического университета.- 2012.- Т.15, №23.- С.109-113.
7. Митько, В.Е. Производные фуранонов как ингибиторы плотно-зависимых процессов у бактерий [Текст] / В.Е. Митько, А.В. Гарусов, О.Н. Ильинская, А.Б. Маргулис // "Вестник Уральской медицинской академической науки" (Тематический выпуск по микробиологии, иммунологии и биотехнологии).- 2011.- №4/1(38).- С. 41.
8. Маргулис, А.Б. Влияние хлорпроизводных 2(5H)-фуранона на жизнеспособность бактериальных клеток [Текст] / 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.
9. Митько, В.Е. Токсические и генотоксические эффекты новых синтезированных фуранонов и их галогенированных производных [Текст] / В.Е. Митько, А.Б. Маргулис, В.Я. Пономарев, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская // Вестник Казанского технологического университета.- 2013.- Т.16, №11.- С.211-213.

© Н. В. Белоногова - асп. каф. микробиологии К(П)ФУ, nadezhda-belonogova@yandex.ru; Т. С. Бардина – студ. той же кафедры; В. Я. Пономарев - к.т.н., доц. каф. технологии пищевых производств КНИТУ, v.y.ponomarev@gmail.com; А. И. Колпаков - к.б.н., с.н.с., зав. лаб. НИЛ ББФ К(П)ФУ, alexei.kolpakov@kpfu.ru; А. Б. Маргулис - к.б.н., доц. каф. микробиологии К(П)ФУ, anna.margulis@kpfu.ru; О. Н. Ильинская - д.б.н., проф., зав. каф. микробиологии К(П)ФУ, olga.ilinskaya@kpfu.ru.