

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ
И АГРОТЕХНОЛОГИЙ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Инчагова Ксения Сергеевна

**ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ
НА СИСТЕМУ «QUORUM SENSING» LUXI/LUXR-ТИПА
У БАКТЕРИЙ (НА ПРИМЕРЕ *Chromobacterium violaceum*)**

03.02.03 Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор,
Дмитрий Геннадьевич Дерябин

Оренбург – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. СИСТЕМА «QUORUM SENSING» – НОВАЯ ПЕРСПЕКТИВНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ	11
1.1 Молекулярно-генетическая организация систем «quorum sensing» и её участие в функционально-морфологической дифференцировке прокариот ..	11
1.1.1 Принципиальная организация систем «quorum sensing»: автоиндукторы, рецепторы, регулируемые гены.....	11
1.1.2 Варианты систем «quorum sensing»: разнообразие у грам-отрицательных бактерий и особенности у грамположительных бактерий.....	15
1.1.3 Биологические характеристики, находящиеся под контролем систем «quorum sensing», в том числе образование биопленок и синтез факторов вирулентности	32
1.2 Возможные пути ингибирования систем «quorum sensing» у бактерий ...	35
1.2.1 Подавление синтеза автоиндукторов	36
1.2.2 Внеклеточное связывание автоиндукторов	37
1.2.3 Химическая деградация автоиндукторов.....	38
1.2.4 Интерференция с автоиндукторами за связывание с рецепторными белками	40
1.5 Антибиотики как потенциальные регуляторы систем «quorum sensing»..	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
2.1 Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные для исследования модулирующего воздействия антибиотиков на «quorum sensing» у бактерий	47

2.2 Антибиотики и химические соединения, использованные для модулирования систем «quorum sensing» у бактерий	50
2.3 Методы исследования QS-модулирующей активности антибиотиков, химических соединений и их комбинаций	56
2.3.1 Биотесты индукции/ингибирования биосинтеза пигмента виолацеина у <i>C. violaceum</i>	56
2.3.2 Дополнительные биотесты на люминесцирующих штаммах <i>E. coli</i>	60
2.3.3 Методы исследования механизмов QS-регулирующей активности.....	61
2.3.4 Методы исследования комбинированного действия антибиотиков и других химических соединений	63
2.4 Методы статистической обработки результатов исследования	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	66
3.1 Определение направленности воздействия пенициллинов на систему QS у <i>C. violaceum</i> с анализом условий формирования подобного эффекта	66
3.2 Характеристика QS-модулирующего эффекта тетрациклинов и аминогликозидов с исследованием воздействия этих антибиотиков на синтез автоиндуктора C ₆ -АГЛ у <i>C. violaceum</i>	74
3.3 Поиск возможностей усиления QS-модулирующего эффекта антибиотиков при их комбинированном использовании с неорганическими и органическими соединениями различного механизма действия.....	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114

ВВЕДЕНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Обнаружение плотностно-зависимой химической коммуникации у бактерий, обозначенной термином «quorum sensing» (QS), стало одним из наиболее ярких открытий в микробиологии конца XX века [72]. Первоначально этот феномен был описан у морских люминесцирующих бактерий *Aliivibrio fischeri*, где включали синтазу LuxI, образуемые под её контролем низкомолекулярные автоиндукторы – ацилированные гомосерин лактоны (АГЛ), а также воспринимающий их рецепторный белок LuxR, запускающий транскрипцию генов биолюминесценции при достижении высокой плотности бактериальной популяции [204]. В дальнейшем оказалось, что стереотипно устроенные QS системы LuxI/LuxR-типа обнаруживаются у множества других протеобактерий и используется ими в различных процессах функциональной или морфологической дифференцировки [212]. В частности, у почвенной бактерии *Chromobacterium violaceum* синтезируемый белком CviI автоиндуктор N-гексаноил-L-ацилгомосеринлактон (C₆-АГЛ) при накоплении в среде культивирования выше критической концентрации взаимодействует с цитоплазматическим рецепторным белком CviR, что индуцирует транскрипцию ряда ранее молчащих генов (в том числе *vioABCDE*-оперона) и проявляется в образовании сине-фиолетового пигмента виолацеина [184]. На этом фоне принципиально важно, что у многих других фито- и зоопатогенных бактерий под контролем QS также находится синтез факторов вирулентности и образование биопленок, что делает эту систему перспективной мишенью для создания антибактериальных средств нового принципа действия [10, 42].

Степень разработанности темы. В качестве одного из возможных инструментов управления QS рассматриваются антибиотики, современные представления о которых не исчерпываются их оценкой как факторов

межмикробного антагонизма, но предполагают возможную роль данных молекул в процессах межклеточной коммуникации [4, 225]. Однако, имеющиеся публикации об участии антибиотиков в регуляции QS относительно немногочисленны, а представленные в них данные часто противоречивы. Так в работе Liu с соавт. [127] субингибиторные концентрации канамицина, амикацина, гентамицина, тетрациклина и эритромицина не подавляли, но напротив, активировали QS-регулируемый биосинтез виолацеина у *C. violaceum*. Аналогичное исследование эффектов ванкомицина, тетрациклина и азитромицина на модели *Pseudomonas aeruginosa* PA01 также показало стимуляцию экспрессии ряда QS-регулируемых факторов вирулентности [176]. С другой стороны, хорошо документированной является анти-QS активность субингибиторных концентраций азитромицина [189], цефтазидима и ципрофлоксацина [181]. При этом для некоторых антибиотиков (в частности, тобрамицина) удалось связать подобную активность с подавлением биосинтеза автоиндуктора, в условиях дефицита которого система QS переставала функционировать [21]. Кроме того, в ряде исследований для потенцирования анти-QS активности антибиотиков предлагается их комбинирование с химическими соединениями иного принципа действия, однако принципы формирования подобных композиций пока не определены.

Целью работы стало исследование воздействия субингибиторных концентраций антибиотиков из групп пенициллинов, аминогликозидов и тетрациклинов на систему «quorum sensing» (QS) LuxI/LuxR-типа (на примере *Chromobacterium violaceum*) и разработка на данной основе возможных подходов к усилению их QS-модулирующей активности.

Основные задачи работы:

1. Определение направленности воздействия пенициллинов на систему QS у *C. violaceum* с анализом условий формирования подобного эффекта.
2. Характеристика QS-модулирующего эффекта тетрациклинов и аминогликозидов с исследованием воздействия этих антибиотиков на синтез автоиндуктора C₆-АГЛ у *C. violaceum*.

3. Поиск возможностей усиления QS-модулирующего эффекта антибиотиков при их комбинированном использовании с неорганическими и органическими соединениями различного механизма действия.

Научная новизна работы. Впервые обнаружена способность антибиотиков из группы пенициллинов при субоптимальных температурах культивирования индуцировать QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у *C. violaceum* в отсутствие его естественного аутоиндуктора C₆-АГЛ. Показано, что разрушение пенициллинов под действием экзогенных бета-лактамаз I и II типа ведет к совместному исчезновению антибактериального и виолацеин-индуцирующего эффектов, в то время как ингибирование собственных бета-лактамаз *C. violaceum* с использованием сульбактама и клавулановой кислоты сопровождается сочетанным изменением рост-ингибирующей и виолацеин-индуцирующей активностей пенициллинов. Совокупность полученных результатов предполагает возможность функционирования пенициллинов в качестве АГЛ-мимикрирующих молекул.

Установлено, что аминогликозиды и тетрациклины в широком диапазоне субингибиторных концентраций ингибируют QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у *C. violaceum*. Продемонстрировано, что у антибиотиков из группы аминогликозидов подобный эффект связан с подавлением биосинтеза аутоиндуктора C₆-АГЛ, в то время как у тетрациклинов определяется иными, неидентифицированными в рамках настоящего исследования механизмами. Подавление образования аутоиндукторов при воздействии субингибиторных концентраций аминогликозидных антибиотиков подтверждено в отношении АГЛ-продуцирующего клинического изолята *P. aeruginosa*.

Показано, что последовательное применение аминогликозидного антибиотика амикацина, ингибирующего образование аутоиндуктора C₆-АГЛ в культуре *C. violaceum*, и активированного угля, сорбирующего остаточные концентрации C₆-АГЛ из среды культивирования, обеспечивает аддитивное подавление QS, в то время как их одновременное использование не ведет к формированию подобного эффекта, вероятно, за счет частичной сорбции

антибиотика на частицах активированного угля. Впервые продемонстрирована возможность супераддитивного усиления анти-QS эффекта амикацина в комбинации с малыми молекулами растительного происхождения (пирогаллолом и кумарином), нарушающими процессы восприятия C_6 -АГЛ. Новизна подобной композиции защищена патентом РФ на изобретение № 2616237.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты расширяют представления об антибиотиках как природных молекулах, вовлеченных не только в феномен межвидового антагонизма, но в субингибиторных концентрациях участвующих в процессах межвидовой химической коммуникации. При этом биологическая целесообразность действия пенициллинов в качестве индукторов системы QS для воспринимающих их микроорганизмов может определяться запуском защитных реакций при низкой численности популяции в неоптимальных условиях существования. В свою очередь анти-QS активность тетрациклинов и аминогликозидов может сообщать их продуцентам дополнительные селективные преимущества, предотвращая у соседствующих с ними бактериальных популяций возможность QS-регулируемого образования биопленок и биосинтеза «ответных» факторов межмикробного антагонизма.

Практически-ориентированный аспект полученных результатов заключается в определении дополнительных показаний и противопоказаний к использованию антибиотиков для борьбы с бактериальными патогенами растений, животных и человека, обладающими стереотипно устроенными QS-системами LuxI/LuxR-типа. При этом выраженная анти-QS активность аминогликозидных антибиотиков с идентификацией лежащего в основе этого механизма, а также успешный опыт усиления подобного эффекта при сочетании аминогликозидов с рядом неорганических и органических соединений определяет перспективу разработки и использования подобных композиций для совершенствования лечения и профилактики бактериальных инфекций, возбудители которых используют системы QS при образовании биопленок и индукции своего патогенного потенциала.

Методология и методы исследования. Оригинальность использованного методического подхода определяется разнообразием использованных природных и генно-инженерных штаммов с компонентами QS-системы LuxI/LuxR-типа, в том числе *C. violaceum* ATCC 31532 и *C. violaceum* NCTC 13274 (CV026), позволяющих оценить как общую направленность QS-модулирующего эффекта антибиотиков (индукция или ингибирование), так и расшифровать отдельные элементы механизма подобного воздействия, в том числе связанные с нарушением образования автоиндуктора C₆-АГЛ.

Возможность получения развернутых представлений о воздействии субингибиторных концентраций антибиотиков на систему QS и возможностях модуляции подобной биоактивности определялась использованием химически чистых субстанций пенициллинов, аминогликозидов и тетрациклинов, коммерчески доступных ферментов (бета-лактамаз), а также химических аналогов малых молекул растительного происхождения и фармакопейного препарата активированного угля.

Исследование QS-модулирующей активности антибиотиков и других химических соединений выполнено в контролируемых сериях экспериментов по индукции/ингибированию биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum* или биолюминесценции у рекомбинантных штаммов *E. coli* pAL101 и *E. coli* pAL103 с количественным инструментальным учетом результативных параметров.

Выбор использованных статистических методов соответствовал поставленным задачам и позволял охарактеризовать выявленные различия и тенденции с достаточной степенью достоверности.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Антибиотики пенициллинового ряда в субингибиторных концентрациях стимулируют QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у LuxI-дефицитного штамма *C. violaceum* CV026, что проявляется при субоптимальных температурах культивирования и может быть усилено в присутствии ингибиторов бета-лактамаз.

2. Антибиотики, ингибирующие синтез белка (тетрациклины и аминогликозиды) в субингибиторных концентрациях подавляют QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у *C. violaceum* ATCC 31532 с полноценной системой LuxI/LuxR-типа, что у аминогликозидных антибиотиков определяется подавлением биосинтеза автоиндуктора C₆-АГЛ.

3. Ингибирующий эффект аминогликозидов (на примере амикацина) на систему QS у *C. violaceum* ATCC 31532 может быть усилен путем их последовательного использования с активированным углем, сорбирующим C₆-АГЛ из среды культивирования, или при совместном использовании с малыми молекулами растительного происхождения (пирогаллолом и кумарином), нарушающими процесс восприятия C₆-АГЛ.

Связь автора с выполнением научных программ и собственный вклад автора. Автором самостоятельно осуществлена постановка цели и определены основные задачи диссертационной работы, выбраны и обоснованы необходимые для их достижения методы исследований. Автором самостоятельно выполнена основная часть экспериментов, проведена их математическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов. Подготовка к печати научных работ, отражающих результаты диссертационного исследования, осуществлена автором самостоятельно или при участии соавторов.

Основной объем работ проведен в 2015-2019 годах на базе ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН. Исследования выполнялись при финансовой поддержке Государственного задания Министерства образования и науки РФ по проекту №148 «Антибактериальные и бактерио-регуляторные соединения, основанные на новых принципах действия», гранта РФФИ № 16-44-560692 p_a «Выявление и исследование регуляторных эффектов антибиотиков в отношении системы «чувства кворума» LuxI/LuxR-типа у бактерий», и гранта Правительства Оренбургской области для аспирантов № 18 «Способы усиления кворум-ингибирующей активности антибиотиков».

Степень достоверности и апробация работы. Научные положения и выводы обоснованы и базируются на воспроизводимых экспериментальных

данных, степень достоверности которых доказана путем использования методов статистического анализа.

Отдельные фрагменты работы доложены и обсуждены на VIII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2016), научной конференции «История и методология физиолого-биохимических и почвенных исследований» (Пермь, 2017), а также XXI Международном конгрессе МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии (Москва, 2019).

Апробация работы состоялась 18.06.2020 г. на заседании Ученого совета ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в международные системы научного цитирования *Web of Science* и *Scopus*, а также 2 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований, получен 1 патент РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 137 страницах, содержит 11 таблиц и иллюстрирована 29 рисунками. Список литературы включает 230 наименований, из них 219 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. СИСТЕМА «QUORUM SENSING» – НОВАЯ ПЕРСПЕКТИВНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ

Для координации изменения своего поведения, зависящего от плотности популяции, многие бактерии используют систему межклеточной коммуникации, называемую QS. QS включает в себя синтез сигнальных молекул, которые могут существенно различаться у разных типов бактерий, и ответ на них [13, 206].

За последние полвека произошло значительное накопление знаний о молекулярных механизмах, сигнальных молекулах, генных регулонах и поведенческих реакциях, связанных с системами QS у различных бактерий. Исследования роли QS в кооперативных и конкурентных микробных сообществах показали, как оно координирует взаимодействия как внутри вида, так и между видами. У многих видов бактерий под контролем QS находится синтез факторов вирулентности, что играет важную роль в патогенезе.

Знания, полученные в результате исследования QS, могут помочь понять механизмы взаимодействия между организмами в естественных условиях их обитания и разработать новые лекарства и методы лечения бактериальных инфекций, нацеленные на ингибирование QS-зависимых процессов.

1.1 Молекулярно-генетическая организация систем «quorum sensing» и её участие в функционально-морфологической дифференцировке прокариот

1.1.1 Принципиальная организация систем «quorum sensing»: автоиндукторы, рецепторы, регулируемые гены.

QS представляет собой особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, функционирующий в условиях критически высокой плотности их популяции. Ключевыми компонентами этой системы являются низкомолекулярные

сигнальные молекулы (автоиндукторы, АИ), которые легко диффундируют через клеточную мембрану, и взаимодействующие с ними рецепторные белки. Концентрация АИ в среде пропорциональна количеству присутствующих в ней бактерий [85].

Бактерии при низкой плотности своей популяции синтезируют базальный уровень АИ, которые диффундируют в окружающую среду и в ней накапливаются. С увеличением клеток в бактериальной популяции до определенного критического уровня концентрация АИ в среде повышается и, когда их содержание достигает порогового значения, необходимого для взаимодействия с рецепторными белками, приводит к формированию комплекса «рецепторный белок-АИ», который уже взаимодействует с промоторными областями оперонов, тем самым запуская экспрессию целевых генов у бактерий [149] (Рисунок 1).

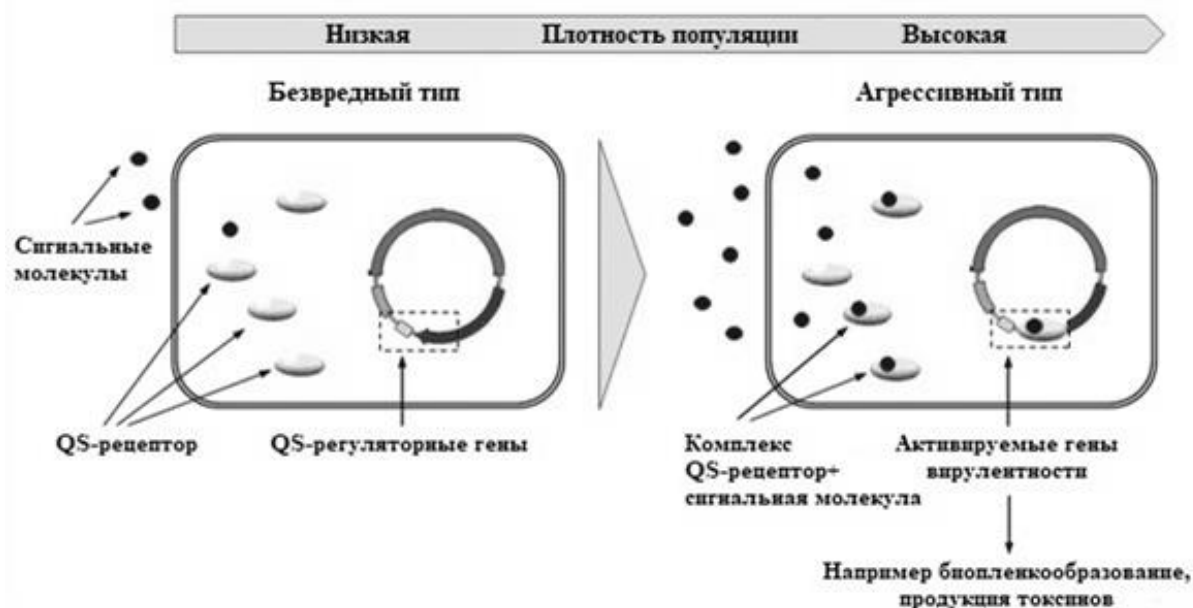


Рисунок 1 – Принцип организации системы QS

Изучение QS началось в 1960-х годах, при исследовании морской биолюминисцирующей бактерии *Vibrio fischeri* (*A. fischeri*) [73]. Эта бактерия живет у кальмара в специальных органах – криптах. В течение дня кальмар

отдыхает, зарывшись в песок морского дна, а ночью отправляется на охоту. В лунном свете темное тело кальмара становится заметным для хищников, однако бактерии, покрывающие его кожу, продуцируют голубоватое свечение, похожее на лунный свет, маскируя животное [130, 131].

Чтобы понять причину описанного явления, были проведены следующие исследования. Колонии *V. fischeri* выращивали в жидкой питательной среде. В ходе эксперимента было обнаружено, что бактерии начинают люминесцировать только тогда, когда культура достигает определенной плотности популяции [80, 99]. Изначально данное явление объяснялось тем, что культуральная жидкость содержит ингибитор биолюминесценции, который разлагается при достаточно высокой численности бактерий [56]. Доказательством полученного результата послужило то обстоятельство, что при их выращивании с веществом, удаляющим предполагаемый ингибитор, свечение могло быть восстановлено даже при низкой плотности клеток. Позже установили, что люминесценция запускалась не в результате удаления ингибитора, а в ходе накопления молекул активатора, или автоиндуктора [55]. Бактерии продуцировали сигнальные молекулы и активировали биолюминесценцию тогда, когда их концентрация в среде была достаточно высока. Изучаемый микроорганизм был способен координировать плотность популяции, контролируя продукцию автоиндуктора. Данный механизм получил название QS.

Молекула, синтезируемая *V. fischeri*, впервые была выделена и описана в 1981 году группой ученых во главе с Eberhard и названа N-(3-оксо-гексаноил)-гомосерин лактоном (C₆-оксо-АГЛ). Анализ генов, вовлечённых в QS *V. fischeri*, впервые осуществили Engebrecht совместно с коллегами. Это открытие привело к созданию базовых моделей для исследования QS, которые сейчас используются для изучения подобных QS-систем у бактерий [164].

В течение многих лет после этих открытий считалось, что QS присущ только морским люминесцирующим бактериям. Однако изучение синтеза антибиотиков привело к получению данных о том, что система QS распространена гораздо шире, чем было показано ранее.

В начале 1990-х годов Bycroft, Williams и Salmond исследовали мутантов *Erwinia carotovora*, которые были не в состоянии продуцировать карбапенемовые антибиотики. Идея состояла в том, чтобы выяснить какие гены были дефектными у различных мутантов и по полученным данным построить генетическую карту всех генов, участвующих в биосинтезе антибиотиков. Первая группа мутантов не могла продуцировать антибиотики самостоятельно, но при наличии второй, начинала проявлять к этому способность. Исследования показали, что вторая группа мутантов снабжает первую сигнальными молекулами, вследствие чего, запускается синтез антибиотиков. Изучение этих сигнальных молекул показало, что они были такими же, как и у морской бактерии *V. fischeri*, отвечающими за биолюминесценцию [22].

Примерно в тоже время, в 1991 году, Gambello и Iglewski обнаружили, что патогенный микроорганизм *P. aeruginosa* также имеет идентичную систему QS *V. fischeri*. Она задействована в регуляции выработки эластазы, которая является одним из важных факторов вирулентности этого микроорганизма. Участвовавшие в данном процессе АГЛ были идентифицированы как N-(3-оксо-додеканоил)-L-гомосеринлактон (C₁₂-оксо-АГЛ) [153, 214].

Вторая система QS, участвующая в регуляции рамнолипидов, гемолизина и других факторов вирулентности у *P. aeruginosa* была описана Latifi и коллегами в 1995 году. В том же году Winson показал, что эта система отвечает за продукцию N-бутаноил-L-гомосеринлактона (C₄-АГЛ). Эта же система была независимо открыта Ochsner с соавторами в 1994 году.

Получение данных о том, что QS присущ не только морским бактериям привело к разработке биосенсоров, способных обнаруживать АГЛ других бактерий [114, 147]. Эти сенсоры были использованы для обнаружения QS-систем родов *Enterobacter*, *Serratia* [70, 208].

Таким образом, на сегодняшний день описано множество микроорганизмов с подобной системой регуляции, однако, данный механизм является не единственной моделью осуществления QS [89]. Так у грамположительных бактерий широко изучаются автоиндуцирующие пептиды (АИП), которые

участвуют в QS. АИП специфичны для каждого вида и штаммов бактерий, и были описаны для *Staphylococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus spp.* [140].

Также было идентифицировано большое разнообразие других сигнальных молекул [82]: жирные кислоты, используемые *Xanthomonas spp.*, *Burkholderia spp.*, *Xylella spp.* [229], кетоны *Vibrio spp.* и *Legionella spp.* [194], гормоны адреналин и норэпинефрин у энтерогеморрагических бактерий [103] и хинолоны у *P. aeruginosa* [84] и наконец, диэфир фуранозилбората (АИ-2), используемый как грамотрицательными, так и грамположительными бактериями [34].

Большинство грамотрицательных бактерий объединяют несколько систем QS для иерархической интеграции различных сигналов, например *P. aeruginosa*, в которой четыре системы QS (*las*, *rhl*, *iqs* и *pqs*) действуют совместно [118] или параллельно, как у бактерии *Vibrio harveyi*, в которой три системы интегрированы в один регуляторный каскад [156] (подробнее системы этих организмов описаны ниже).

1.1.2 Варианты систем «quorum sensing»: разнообразие у грам-отрицательных бактерий и особенности у грамположительных бактерий

Обнаруженные к настоящему времени системы QS можно разделить на несколько типов, различающихся в зависимости от химической природы АИ, а также характера и локализации воспринимающих их рецепторных белков (Рисунок 2):

- 1) системы QS **I типа** (LuxI/LuxR-типа) – в качестве индукторов выступают ацилированные гомосеринлактоны;
- 2) системы QS **II типа**, АИ – производные фураноносов;
- 3) системы QS **грамположительных микроорганизмов** – преимущественно в качестве сигнальных молекул выступают АИ олигопептидной природы (АИП);
- 4) системы QS, использующие АИ **иной природы** [24, 163].

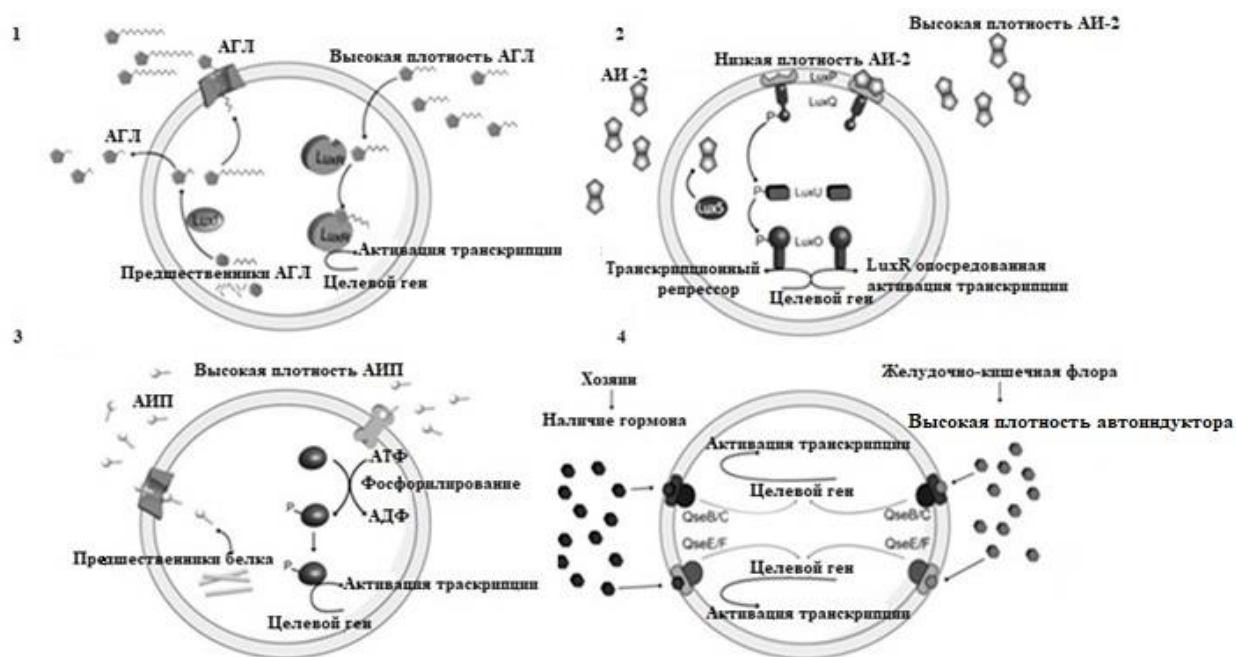


Рисунок 2 – Схематическое изображение организации систем QS

(описание в тексте)

1. Система QS I типа (LuxI/LuxR-типа) присуща грамотрицательным бактериям. Наиболее изученными являются QS-системы, функционирующие с участием АИ ацилированных гомосерин лактонов (АГЛ, или АИ-1). Синтез данных молекул обусловлен работой *luxI*-подобных генов [164].

Молекулы АГЛ состоят из гомосеринлактонного кольца и боковых ацильных групп различной длины (4-18 атомов углерода). Специфичность действия АГЛ зависит от количества ацильных групп, а также наличия дополнительных группировок. Так АГЛ с короткими ацильными цепями, свободно проходят сквозь мембрану бактериальной клетки, в то время как АГЛ с длинными цепями для выхода во внешнюю среду нуждаются в активном транспорте. При этом важной функциональной особенностью этой молекулы, является амфифильность, что определяет ее способность к свободной диффузии через клеточную мембрану как в окружающую среду, так и в обратном направлении по градиенту концентрации [1].

При увеличении плотности бактериальной популяции до необходимого уровня численности и накоплении АИ в среде до определенного порогового значения, происходит взаимодействие АИ с рецепторными регуляторными белками семейства LuxR. Структурно эти белки включают в себя два домена, отвечающие за связывание белка с АГЛ – С-концевой домен и с ДНК – N-концевой домен. Присоединившаяся молекула АГЛ изменяет конфигурацию LuxR-подобного белка, что определяет его связывание с ДНК и функционирование в качестве активатора транскрипции [149].

В биосинтезе АГЛ участвует S-аденозилметионин (SAM) (образование гомосеринлактонного кольца) и белок ACP (ацил-ацил переносящий белок), переносчик ацильных групп [28].

Представленная система QS присуща многим грамотрицательным бактериям: *Burkholderia spp.*, *Chromobacterium spp.*, *Agrobacterium spp.*, *Erwinia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Rhizobium spp.*, *Vibrio spp.* и т.д., среди которых большое количество микроорганизмов является патогенами растений, животных и человека (Таблица 1) [209, 212].

Таблица 1. Особенности организации систем QS у микроорганизмов

Микроорганизм	Quorum sensing		Литературная ссылка
	Система	Сигнальная молекула	
<i>Vibrio fischeri</i>	LuxI/LuxR	3-оксо-С ₆ -АГЛ	[57, 68]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasI/LasR	3-оксо-С ₁₂ -АГЛ	[97, 118, 153]
	RhlI/RhlR	С ₄ -АГЛ	
	QscR и VqsR	3-оксо-С ₁₂ -АГЛ	
	pqsABCD	2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон (PQS)	
	ambBCDE	2-(2-гидроксифенил)-тиазол-4-карбальдегид (IQS)	
<i>Burkholderia cepacia</i>	CepI/CepR	С ₈ -АГЛ	[19]

Продолжение таблицы 1

<i>Burkholderia pseudomallei</i>	BpmI2/BpmR2 BpmI3/BpmR3 PmlI1/PmlR1	C ₈ -АГЛ, C ₁₀ -АГЛ ОН-C ₈ -АГЛ, ОН-C ₁₀ - АГЛ, 3-оксо-C ₁₄ -АГЛ C ₈ -АГЛ, C ₁₀ -АГЛ, 3-ОН- C ₈ -АГЛ, 3-ОН-C ₁₀ -АГЛ	[19]
<i>Erwinia carotovora</i>	ExpI/ExpR, CarI/CarR	3-оксо-C ₆ -АГЛ	[22]
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CviI/CviR	C ₆ -АГЛ	[28, 47]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TraI/TraR	3-оксо-C ₈ -АГЛ	[81]
<i>Rhizobium leguminosorum</i>	RhiI/RhiR, CinI/CinR	ОН-C ₆ -АГЛ, 3-оксо-C ₆ - АГЛ, C ₇ -АГЛ, 3-ОН-C ₁₄ - АГЛ	[127, 216]
<i>Vibrio harveyi</i>	NAI-1 (для конкретных видов) CAI-1 (межродовое общение) LuxS (Межвидовая связь)	ОН-C ₄ -АГЛ (S)-3-гидрокситридекан- 4-1 фуранозил борат диэфир	[156] [89]
<i>Salmonella typhimurium</i>	lsg-оперон	(2R, 4S)-2-метил-2,3,3,4- тетрагидрокситетра- гидрофуран	[138]
<i>Escherichia coli</i> (EHEC) <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> и др.	QseB/QseC QseE/QseF	адреналин/норадреналин, аспарагиновая кислота	[208]
<i>Staphylococcus aureus</i>	AgrABCD	Олигопептид	[33]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ComABCDEX	Олигопептид	[137]
<i>Bacillus cereus</i>	PlcR	Пептид PapR	[17, 74]

Наиболее подробно изучена QS-регуляция оперона *luxCDABEG V. fischeri*. В ней участвуют два основных регуляторных компонента:

- низкомолекулярный регулятор (АИ) C₆-оксо-АГЛ – продукт гена *luxI*;

- рецепторный белок LuxR (транскрипционный активатор) – продукт гена *luxR* [111].

Данная реакция протекает в несколько этапов (Рисунок 3), первый из которых предусматривает формирование ацил-LuxI интермедиата, а последующие заключаются в установлении амидной связи между 3-оксо-гексаноилом и метиониновой группой, «лактонизации» остатка метионина с замыканием пятичленного кольца, освобождению вновь синтезированного С₆-оксо-АГЛ и окончательным отщеплением 5'-метилтиоаденозина. По современным представлениям специфичность ацил-синтазы LuxI, не очень высока. Поэтому продукты ее реакции представляют смесь ацильных производных лактона L-гомосерина, среди которых С₆-оксо-АГЛ, тем не менее, является доминирующим соединением [1, 152].

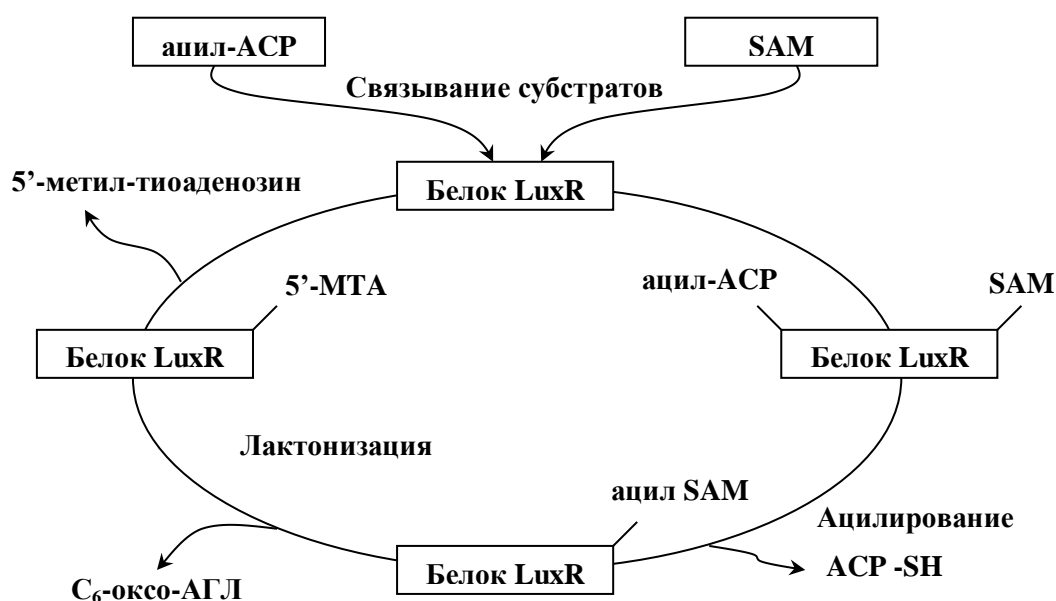


Рисунок 3 – Биохимические реакции, катализируемые продуктом гена *luxI* и ведущие к образованию АИ С₆-оксо-АГЛ [1]

На ранних стадиях роста бактериальной культуры базовый уровень экспрессии *lux*-оперона ведет и к появлению АИ, так как ген *luxI* в его составе транскрибируется первым. При этом в отсутствии АИ во внешней среде С₆-оксо-

АГЛ свободно диффундирует через цитоплазматическую мембрану по градиенту концентрации (из клетки). Когда его содержание во внешней среде начинает превышать определенные критические значения, он поступает обратно в цитозоль бактериальной клетки, где обратимо связывается с регуляторным белком LuxR – продуктом гена *luxR*, димеризуя его и, как следствие, активируя транскрипцию *lux*-оперона [99]. Соответственно, минимальной концентрацией АИ, необходимой для образования стабильного комплекса LuxR-АИ, является 2 молекулы на клетку.

Причину нахождения на данный момент в цитозоле белка LuxR можно объяснить тем, что кодирующий его ген транскрибируется в противоположном от *luxCDABEG* оперона направлении. Надо отметить, что при низкой плотности бактериальной популяции этот процесс инициируется комплексом циклического аденозинмонофосфата (сАМФ) и соответствующего ему белка-рецептора CRP. Образующийся комплекс сАМФ-CRP первоначально взаимодействует с консенсусной последовательностью, расположенной в центре межгенного участка ДНК на расстоянии около 159 н.п. выше гена *luxI* и 60 н.п. перед геном *luxR*, что запускает слева от этого места процесс сборки фермента РНК-полимеразы (Рисунок 4) [1].

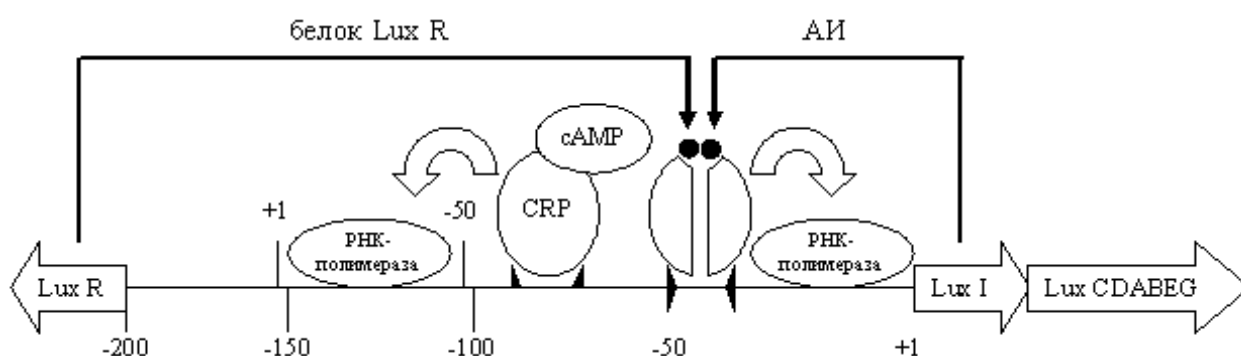


Рисунок 4 – Регуляторная область из 218 н.п., отвечающая за контроль транскрипции *lux*-генов *V. fischeri* [1]

Описанный механизм объясняет и существование так называемой «катаболической репрессии». Под данным термином понимают подавление биолюминесценции при помещении бактерий в среды богатые глюкозой. Это происходит вследствие формирующегося в подобных условиях дефицита сАМР, обусловленного подавлением активности фермента аденилатциклазы, как раз катализирующего превращение АТФ в сАМР. Нарушение образования активного комплекса сАМР-CRP, в свою очередь, приводит к подавлению экспрессии гена *luxR* [1].

Белок LuxR представляет собой структуру, состоящую из 250 аминокислотных остатков с молекулярным весом 28556 Da [73, 100]. В строение представленного белка входят два функционально различных домена, расположенных на N- и C-терминальных участках данного полипептида соответственно. Из них карбоксильный домен (аминокислоты 157-250) взаимодействует с богатыми А-Т-парами участками ДНК и, в связи с чем, имеет сходство с другими белками, участвующими в регуляции генной экспрессии. С другой стороны, N-концевой домен взаимодействует с АИ [56, 72]. Обозначенные особенности строения и определяют функцию белка LuxR как QS-зависимого положительного регулятора (активатора) транскрипции *lux*-оперона [1].

Среди бактериальных патогенов наиболее изучены системы QS *P. aeruginosa*. Данный микроорганизм является одним из главных объектов исследований QS для многих ученых-микробиологов. *P. aeruginosa* – это оппортунистическая патогенная бактерия, вызывающая у человека тяжелые заболевания дыхательных путей [75, 142]. За вирулентные свойства *P. aeruginosa* отвечает широкий спектр экзопродуктов, включая эластазу, протеазу, экзотоксины А и S, рамнолипидные биосурфактанты и фосфолипазу [63, 107].

Регуляция генов, кодирующих эти экзопродукты, находится под контролем трехкомпонентной системы QS. Каждая система включает в себя специфический АИ и зависимый от его наличия активатор транскрипции. Так при связывании C₁₂-оксо-АГЛ с рецепторным белком LasR, а C₄-АГЛ с RhlR образуются активные комплексы, которые комплексы связываются с консервативными боксами *las/rhl*,

находящимися в промоторах генов-мишеней, тем самым активируя их транскрипционную экспрессию [169, 211, 213]. Транскриптомные исследования, основанные на мутациях в генах *lasI* и *rhlI*, показали, что регулоны находятся в связке, причем некоторые гены хорошо реагируют на C₁₂-оксо-АГЛ (например, *lasA*), некоторые обладают специфичностью к C₄-АГЛ (например, *rhlAB*), а некоторые одинаково хорошо реагируют на оба сигнала [168, 170]. Эти гены составляют почти 10% генома *P. aeruginosa* и, следовательно, отвечают за большинство физиологических процессов, включающих и факторы вирулентности (Таблица 2) [168].

Таблица 2 – Примеры факторов вирулентности *P. aeruginosa*, находящихся под контролем QS и их воздействие на организм хозяина

Гены, отвечающие за QS	Белок или фактор вирулентности	Воздействие на хозяина в период инфекции	Преимущества для <i>P. aeruginosa</i>	Ссылка
<i>lasB</i>	Эластаза	Разрушение эластина, коллагена и других матричных белков	Внеклеточное усвоение железа из хозяйских белков	[217, 222]
<i>lasA</i>	Протеаза	Нарушение эпителиального барьера	Стафилолитическая активность, уклонение от иммунитета, колонизация	[104, 150]
<i>toxA</i>	Экзотоксин А	Клеточная смерть	Запуск инфекционного процесса; усиленная колонизация	[40, 134]
<i>aprA</i>	Алкалиновая протеаза	Деградация системы комплемента хозяина и цитокинез	Уклонение от иммунитета и постоянная колонизация	[112]

Продолжение таблицы 2

<i>rhlAB</i>	Рамнозил- трансфераза (рамнолипид)	Некроз макрофагов хозяина и полиморфноядер- ных лимфоцитов	Уклонение от иммунитета; биоопленкообразо- вание	[96, 120, 147]
<i>lecA</i>	Лектин (галактофиль- ный лектин)	Паралич ресничек дыхательных путей	Запуск инфекционного процесса; усиленная колонизация	[14]
<i>hcnABC</i>	Гидроген цианид	Остановка клеточного дыхания; недостаточное функционировани- е легких	Усиленная колонизация	[166, 182]
<i>phzABCDEFGF</i> <i>phzM</i>	Пиоционин	Окислительный стресс; Паралич ресничек дыхательных путей; Задержка воспалительного ответа на инфекции <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> через повреждение нейтрофилов	Запуск инфекционного процесса; усиленная колонизация; уклонение от иммунитета	[45, 93, 115]

LasR также запускает экспрессию белка RsaL, транскрипционного репрессора гена *lasI*. Присоединение RsaL к двунаправленному промотору *rsaL-lasI* ингибирует экспрессию обоих генов, что создает петлю отрицательной обратной связи, которая противодействует петле обратной связи положительного сигнала, упомянутой ранее, тем самым балансируя уровни C₁₂-оксо-АГЛ. Хотя LasR/C₁₂-оксо-АГЛ и RsaL не конкурируют за один и тот же сайт связывания в области промотора *lasI*, репрессия с помощью RsaL сильнее, чем активация с

помощью LasR. RsaL также ингибирует экспрессию некоторых генов-мишеней QS, таких как биосинтетические гены пиоцианина и цианида [161]. Впоследствии был идентифицирован ряд положительных и отрицательных регуляторных белков, которые контролируют системы *las* и *rhl* различными способами [64].

Примечательно регуляторное действие белков QscR и VqsR, которые являются гомологами белка LuxR: QscR образует гетеродимеры с LasR/C₁₂-оксо-АГЛ и RhIR/C₄-АГЛ и предотвращает их связывание с промоторной ДНК нижестоящих чувствительных генов, тем самым ослабляя эффекты передачи QS-зависимых сигналов *las* и *rhl* [116, 121]. QscR также связывается с C₁₂-оксо-АГЛ и использует его для активации своего собственного регулона [37, 62, 168]. VqsR является положительным регулятором системы *las* и сам подвержен регуляции комплексом LasR/C₁₂-оксо-АГЛ [122]. Совсем недавно был идентифицирован анти-активатор QslA, который связывается с LasR посредством белок-белкового взаимодействия и предотвращает связывание последнего с промоторным участком ДНК генов, реагирующих с *las*. Ингибирующий эффект QslA на LasR не зависит от концентрации C₁₂-оксо-АГЛ. Нарушая способность LasR запускать экспрессию нижестоящих генов и вызывать QS-ответ, QslA контролирует общий уровень активации QS [172]. Существует довольно много других суперрегуляторов систем QS на основе АГЛ. Кроме того, ферменты, подавляющие QS, которые расщепляют сигнальные молекулы (АГЛ-ацилазы PvdQ и QuiP) также участвуют в поддержании базального уровня АГЛ у *P. aeruginosa* [91, 180].

Третья сигнальная молекула *P. aeruginosa* – PQS – была выделена и охарактеризована в 1999 году Pesci и его коллегами, когда они обнаружили, что отработанные питательные среды после дикого типа PAO1 вызывают резкую индукцию экспрессии гена *lasB* у *lasR*-мутанта *P. aeruginosa*, QS которого не могло быть запущено C₁₂-оксо-АГЛ или C₄-АГЛ [154]. PQS структурно идентифицирован как 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон, и он химически уникален из сигнальных молекул систем *las* и *rhl*. Первоначально у этой молекулы была

выявлена только антибактериальная активность [38, 124], однако в последствие было показано, что она обладает и QS-модулирующим действием.

Белок PqsR является регулятором транскрипции, связывающимся с промоторной областью оперона *pqsABCDE* и напрямую контролирующим его экспрессию [32, 65]. Экспрессия *pqsR*, в свою очередь, контролируется комплексом LasR/C₁₂-оксо-АГЛ [31]. PqsR является родственным рецепторным белком автоиндуктора PQS, а также его коиндуктором, поскольку активность PqsR в индукции экспрессии *pqsABCDE* резко возрастает, когда PQS с ним связывается [203, 219]. Также было обнаружено, что 2-гептил-4-хинолон (HNQ) способен связываться и индуцировать синтез белка PqsR, хотя он делает это с ~100-кратной меньшей эффективностью, чем PQS [203, 220]. Было показано, что мутация в гене *pqsR* приводила к непроизводству каких-либо факторов вирулентности и пиоцианина [32, 65, 202], что указывает на необходимость белка PqsR в выполнении передачи сигнала PQS.

Недавно была обнаружена четвертая сигнальная молекула межклеточной коммуникации, отвечающая за запуск QS-зависимых процессов у *P. aeruginosa* – IQS, относящаяся к новому классу сигнальных молекул системы QS и структурно охарактеризованная как 2-(2-гидроксифенил)-тиазол-4-карбальдегид. Гены, которые участвуют в синтезе IQS, представляют собой кластер генов нерибосомальной пептидсинтазы *ambBCDE*. При нарушении этой системы происходило снижение продукции сигнальных молекул PQS и C₄-АГЛ, а также факторов вирулентности, таких как пиоцианин, рамнолипиды и эластаза. После добавления 10 нмоль/л IQS к мутантам эти фенотипы могут быть полностью восстановлены, что указывает на то, что IQS является мощным межклеточным коммуникационным сигналом по сравнению с его аналогами. Кроме того, было показано, что IQS вносит существенный вклад в полную вирулентность *P. aeruginosa* на четырех различных моделях животных-хозяевах (мыши, рыбки данио, плодовые мухи и нематоды), подчеркивая важную роль этой новой системы QS в модуляции бактериального патогенеза. Важно отметить, что в

условиях стресса, вызванного истощением фосфатов в среде культивирования, IQS может частично брать на себя функции центральной системы *las* [117].

Нужно сказать, что системы QS у *P. aeruginosa* организованы иерархически. На вершине иерархической сигнализации находится система *las*. При активации C₁₂-оксо-АГЛ комплекс LasR/C₁₂-оксо-АГЛ мультимеризуется и активирует транскрипцию генов *rhlR*, *rhlI*, *lasI* (первая петля положительной обратной связи) и других генов вирулентности, которые являются частью этого регулона [106, 113, 155]. Комплекс RhlR/C₄-АГЛ также димеризуется и аналогичным образом активирует экспрессию своего собственного регулона и *rhlI*, образуя вторую петлю положительной обратной связи [201, 214]. Комплекс LasR/C₁₂-оксо-АГЛ также положительно регулирует PqsR, регулятор транскрипции оперона биосинтеза HHQ/PQS *pqsABCD*, а также экспрессию *pqsH*, гена, кодирующего конечный конвертирующий фермент PQS из HHQ [48, 65, 220]. Обнаружено, что PQS, в свою очередь, способен усиливать транскрипцию гена *rhlI*, влияя на продукцию C₄-АГЛ и общую экспрессию *rhl*, тем самым косвенно модулируя зависимые от этой системы фенотипы [135, 154]. Интересно, что экспрессия *pqsR* и *pqsABCDE* ингибируется комплексом RhlR/C₄-АГЛ, позволяя предположить, что соотношение концентраций между C₁₂-оксо-АГЛ и C₄-АГЛ играет решающую роль в доминировании сигнальной системы *pqs* [32].

Поскольку система *las* выступает первой и управляет запуском остальных систем, её часто описывают как вершину иерархической цепи QS у *P. aeruginosa*. С другой стороны, система *rhl* находится под контролем как системы *las*, так и *pqs*, однако синтез многих QS-зависимых факторов вирулентности преимущественно активируется при помощи комплекса RhlR/C₄-АГЛ [114, 169, 171, 211, 215]. Поэтому систему *rhl* можно назвать «рабочей лошадкой» в реализации QS у *P. aeruginosa*. Поскольку комплекс LasR/C₁₂-оксо-АГЛ контролирует начало и активацию цепей QS *pqs* и *rhl*, эти системы представляют собой поэтапный каскад реакций, который запускается при достижении «кворума» в культурах *P. aeruginosa*. Также было установлено, что недавно идентифицированный автоиндуктор IQS строго контролируется системой *las* в

условиях богатой среды. Нарушение в генах либо *lasR*, либо *lasI* полностью отменяет экспрессию оперона *ambBCDE* и продукцию АИ IQS (Рисунок 5) [117].

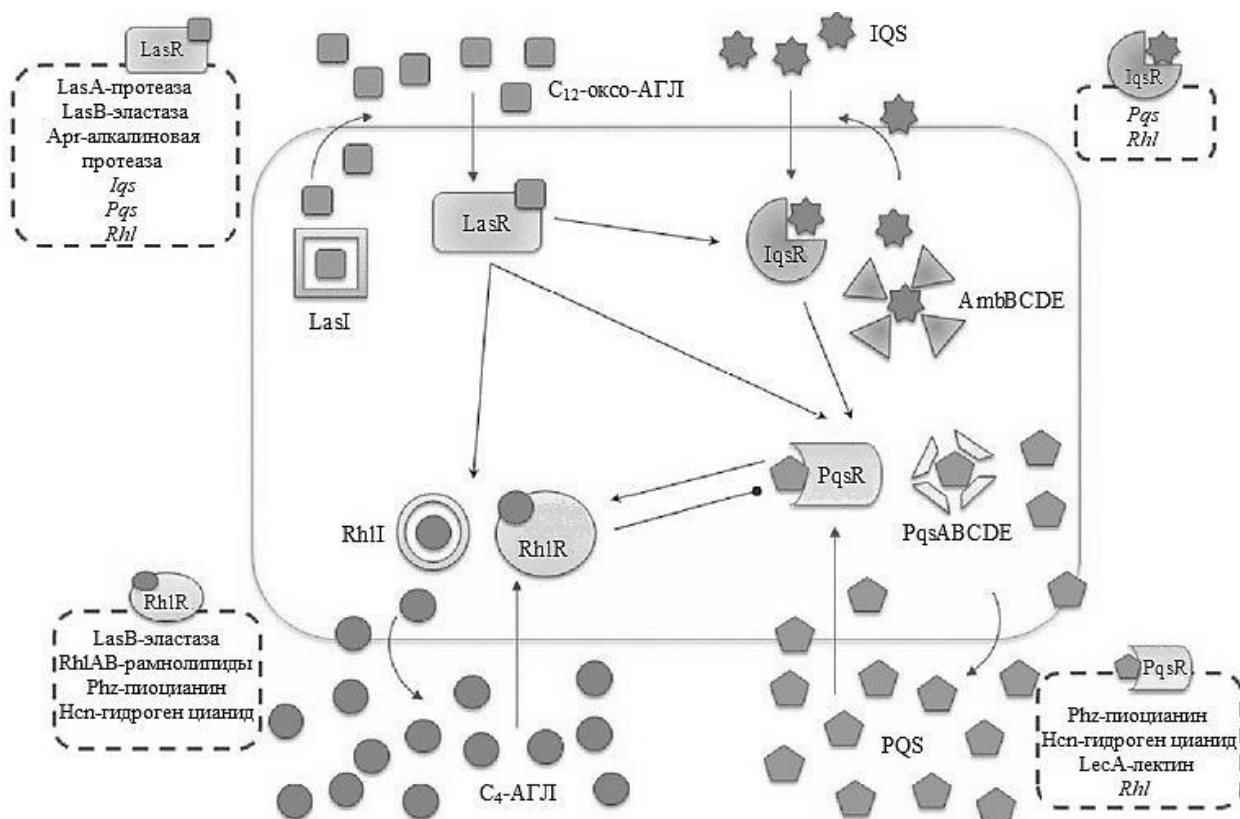


Рисунок 5 – Схематическое изображение четырех сигнальных систем QS у *P. aeruginosa* и их регулонов

Однако бывают исключения. Обнаружено, что при мутации в гене *lasR* бактерии могут иметь отсроченную продукцию АИ PQS вместо отмены его синтеза, как предполагалось ранее. Также PQS может преодолевать контроль системы *las* при активации экспрессии генов системы *rhl* и продукции нижестоящих факторов вирулентности [50]. Впоследствии было обнаружено, что данное обстоятельство может быть связано с действием белка RhIR, поскольку двойной мутант *lasR* и *rhIR* практически не реагировал на PQS, но при избыточной экспрессии *rhIR* мог синтезироваться. Также было показано, что RhIR усиливает экспрессию *lasI*, наиболее специфичного LasR-регулируемого гена, и,

следовательно, продуцирование C₁₂-оксо-АГЛ [44]. Это указывает на то, что система *rhl* в некоторых случаях может переопределить эту иерархию и поддерживать экспрессию QS-зависимых факторов вирулентности, несмотря на не функциональность центральной системы *las*. Похожий эффект игнорирования системы *las* происходит при продукции АИ IQS, при фосфатном стрессе *P. aeruginosa*. В этом случае система *iqs* может повышать экспрессию систем *pqs* и *rhl* и продукцию QS-зависимых факторов вирулентности *lasI* или мутанта *lasR* [117]. Эти результаты подчеркивают важность влияния факторов окружающей среды на функционирование и пластичность систем QS у бактерий.

Из других бактериальных патогенов, у которых идет активное исследование участия QS в патогенезе бактерий, можно выделить *Burkholderia cepacia*. Ее QS-система CerI-CerR участвует в синтезе факторов вирулентности (экзопротеаз, сидерофоров). Продукция АИ – N-октаноил-ацилгомосеринлактона (C₈-АГЛ) и N-гексаноил-гомосеринлактона (C₆-АГЛ) у этой бактерии достаточно слабая. Однако инфицирование больных с кистозным фиброзом легких одновременно *B. cepacia* и *P. aeruginosa*, может приводить к усилению патогенности первого микроорганизма. Данное обстоятельство указывает на возможность существования коммуникации не только внутри и межвидовой, но и между разными родами бактерий. Об этом свидетельствуют данные, полученные в ходе исследований [49]. Так, добавление культуральной жидкости *P. aeruginosa* к культуре *B. cepacia* вело к существенному увеличению экзопротеазной активности и продукции сидерофоров. Описанное указывает на то, что бактерии способны регулировать индукцию своего патогенного потенциала за счет других бактерий, продуцирующих нужные им АИ. Изучение данных особенностей поведения бактерий в природных условиях открывает новые аспекты, важные для эпидемиологии. На сегодняшний день эти моменты в терапии бактериальных инфекций не учитываются, однако существование взаимодействия непатогенных бактерий – продуцентов АГЛ и слабо патогенных бактерий (или практически непатогенных в данных условиях) могут приводить к серьезным последствиям [49]. Поэтому изучение коммуникации разных бактерий в природных условиях

является важным объектом исследований для улучшения эпидемиологической ситуации у населения.

2. Система QS II типа была обнаружена у морской биолюминесцирующей бактерии *V. harveyi*. Наблюдения основаны на том, что бактерии, испытывающие дефицит АГЛ, также были способны к биолюминесценции. Данное обстоятельство указывало на наличие другой системы QS, которая, как было выявлено, находится под контролем *luxS*- генов и родственных гомологов. При этом в качестве АИ выступает молекула, уже не принадлежащая к производным гомосеринлактонам, но по своей химической природе являющаяся фуранозил борат диэфиром АИ-2 (полное название: (2S,4S)-2-метил-2,3,3,4-тетрагидрокси-тетрагидрофуран) [66, 186].

Непосредственным же продуктом гена *luxS* является фермент S-рибозилгомоцистеинлиаза с молекулярной массой 19012 Da, имеющий в своем составе один ион железа и катализирующий отщепление гомоцистеина от исходной молекулы S-(5-дезоксид-5-рибозил)-L-гомоцистеина с превращением последней в 4,5-дигидрокси-2,3-пентандион (ДПД) [186, 228].

Данный фермент является ключевым, но не единственным на пути биосинтеза АИ-2. На ранних этапах этого процесса превращение S-аденозилметионина в S-(5-дезоксид-5-рибозил)-L-гомоцистеин действуют еще два фермента – метилтрансфераза и нуклеозидаза, а превращение ДПД в собственно фуранозил борат диэфир включает еще три дополнительных этапа, в процессе которых ДПД самостоятельно реарранжируется с замыканием пятичленного кольца и при участии бората превращается в биологически активный АИ-2 [167].

Гомологи гена *luxS* были обнаружены и у бактерий видов *V. fischeri* и *Photobacterium luminescens* [46, 53], что позволяет рассматривать производные фуранозил борат диэфира в качестве второй важной группы молекул, наряду с производными гомосеринлактона играющих роль в процессе контроля люминесцентной реакции.

Последующие же исследования заставили констатировать, что АИ-2 и контролирующий его биосинтез ген *luxS* присутствуют не столько у люминесцирующих, сколько более чем у сотни видов патогенных и условно-патогенных нелюминесцирующих бактерий, в том числе *B. anthracis*, *E. coli* O157, *S. typhimurium* и *V. cholera* [218]. При этом у последнего из них под контролем АИ-2 и опосредованного им QS находится более 70 генов вирулентности. В силу указанных обстоятельств система АИ-2 оказалась значительно менее специфичной, чем АИ-1, и в настоящее время рассматривается в качестве своеобразного «универсального сигнала», опосредующего межклеточную коммуникацию между представителями различных бактериальных видов [179].

3. У **грамположительных микроорганизмов** в качестве сигнальных молекул выступают короткие олигопептиды. В подавляющем большинстве случаев функционирование QS-систем этой группы бактерий происходит за счет двухкомпонентного механизма фосфорилирования. При достижении бактериальной популяцией стационарной фазы роста, происходит запуск системы QS. Именно в этот момент можно обнаружить сигнальные молекулы, с помощью которых происходит контакт между клетками.

Общая схема индукции QS у грамположительных бактерий включает в себя несколько этапов:

- синтез предшественника в клетке;
- его модификация в зрелый олигопептид;
- экспорт олигопептида наружу с помощью посредника;
- накопление олигопептидных молекул в межклеточном пространстве;
- передача сигнала в клетку посредством двухкомпонентной сенсорной киназы путем каскадного фосфорилирования;
- взаимодействие олигопептида с целевым геном (генами) [140, 196].

Классическая QS-система пептидной природы присуща таким бактериям как *S. aureus*, *S. pneumoniae* и др. (Таблица 1) [69, 105, 109, 137, 230].

В дополнение к выше сказанному нужно отметить, что использование грамположительными бактериями в качестве сигнальных молекул олигопептидов

не является единственно возможным вариантом функционирования QS-систем. Так, для представителей порядка *Actinomycetales* наряду с пептидными сигнальными молекулами характерны вещества низкомолекулярной природы, большинство из которых содержит лактонную группировку [148, 151].

4. Системы QS, использующие АИ **иной природы** присущи многим грамотрицательным бактериям и отличаются большим разнообразием сигнальных молекул [82], включающих жирные кислоты, используемые *Xanthomonas spp.*, *Burkholderia spp.*, *Xylella spp.* [229], кетоны *Vibrio spp.* и *Legionella spp.* [194], адреналин, норэпинефрин и аспарагиновая кислота энтерогеморрагических бактерий [103] или хинолоны *P. aeruginosa* [84].

Эта система автоиндукции была первоначально описана на примере *V. cholerae*, в связи с чем вовлеченные в нее гены и кодируемые ими белки получили название Cqs (от англ. – cholerae quorum sensing), а опосредующий подобный эффект низкомолекулярный фактор был назван CAI-1 (от англ. - cholerae autoinducer). В дальнейшем же было установлено, что многие другие бактерии, в том числе *V. harveyi*, также имеют ген *cqsA*, кодирующий синтазу CqsA, ответственную за синтез автоиндуктора CAI-1 [86]. При этом изучение химической природы CAI-1 позволило охарактеризовать его как (S)-3-гидрокситридекан-4-один, по своей структуре достаточно сильно отличающийся как от АИ-1, так и от АИ-2 [87].

У энтерогеморрагической *E. coli* (ЕНЕС) в качестве АИ выступает аспарагиновая кислота. Периплазматическими рецепторами этой системы является комплекс QseBC. QseC представляет собой киназу, воспринимающую АИ, а QseB – регулятор ответа, изменяющий транскрипцию генов образования жгутиков [20]. Было показано, что комплекс QseBC воспринимает АИ также как гормоны человека – адреналин и норадреналин [190]. Также была описана еще одна двухкомпонентная система, получившая название QseEF, отвечающая за регуляцию генов вирулентности и агрегации [60]. Ферментные пары QseBC и QseEF также взаимодействуют с катехоламиновыми гормонами, которые в совокупности активируют транскрипцию целевых генов.

1.1.3 Биологические характеристики, находящиеся под контролем систем «quorum sensing», в том числе образование биопленок и синтез факторов вирулентности

Под контролем QS находится ряд различных фенотипов, таких как синтез антибиотиков, пигментов, биолюминесценция, перенос плазмид и т.д., способствующих адаптации к изменяющимся условиям среды, как у грамотрицательных, так и у грамположительных бактерий (Таблица 3) [49].

Таблица 3. Биологические характеристики микроорганизмов, находящиеся под контролем QS

Микроорганизм	Система QS	Регулируемые свойства	Источник литературы
<i>V. fischeri</i>	LuxI/LuxR	Биолюминесценция	[55, 68]
<i>C. violaceum</i>	CviI/CviR	Синтез виолацеина, образование биопленки	[47]
<i>E. carotovora</i> ,	ExpI/ExpR,	Синтез экзоферментов и других факторов вирулентности	[19]
	CarI/CarR	Производство антибиотика карбопенема	
<i>P. aeruginosa</i> ,	LasI/LasR	Синтез факторов вирулентности, синтез пигмента пиоцеонина, образование биопленки	[118]
	RhlI/RhlR		
	QscR		
	PqsABCD		
<i>S. aureus</i>	PqsABCD	Синтез факторов вирулентности	[33]
	AgrABCD		
<i>A. tumefaciens</i>	TraI/TraR	Перенос Ti-плазмид	[81]
<i>R. leguminosorum</i>	RhiI/RhiR, CinI/CinR	Конъюгативный перенос плазмид	[61]
<i>B. subtilis</i>	ComP / ComA ABC	Спороляция и поглощение ДНК	[17]

Образование факторов вирулентности у патогенных микроорганизмов (*P. aeruginosa*, *E. carotovora*, *B. cenocepacia*, *S. aureus* и т.д.) также является QS-зависимым процессом [163]. Так, у оппортунистического патогена *P. aeruginosa* контролю QS подвергается выработка целого арсенала факторов вирулентности, включающих эластазу, пиоцианин и лектины [118]. Было показано, что ингибирование QS снижает вирулентность штамма у некоторых животных-хозяев: нематод и мышей. Тем не менее, интересно отметить, что многие клинические штаммы *P. aeruginosa*, выделенные из мокроты хронически инфицированных пациентов с муковисцидозом, имеют дефекты в регуляции QS. Данное обстоятельство свидетельствует о недостаточности знаний в области изучения взаимодействия бактерий с хозяином и роли QS в данных отношениях, что может стать конкурентной областью исследования исследователей [49].

Известно также, что QS играет важную роль в развитии биопленок. При их формировании клетки группируются вместе, образуя организованные слизистые образования. Биопленки часто обладают высокой устойчивостью к ультрафиолетовому облучению, высыханию и обработке антибактериальными средствами, такими как антибиотики. Эти структуры часто содержат каналы для импорта питательных веществ и утилизации отходов, они могут также содержать специализированные клетки, которые, по-видимому, играют специфическую роль в данном образовании. Некоторые исследователи описывают биопленки как схожие социальные сообщества насекомых, таких как муравьев. Было показано, что у некоторых видов бактерий нарушение работы систем QS влияет на формирование и дифференциацию биопленки. Например, у *P. aeruginosa* ингибирование QS приводит к образованию более плоских, менее структурированных биопленок, чем у дикого типа. Кроме того, при ингибировании QS образующиеся биопленки часто более восприимчивы к лечению биоцидами и антибиотиками [118].

Первоначальные исследования по изучению QS были сосредоточены на роли сигнальных систем в отдельных бактериальных популяциях [22, 214]. Однако открытие того факта, что различные грамотрицательные бактерии могут

образовывать очень схожие, если не идентичные сигнальные молекулы, натолкнуло на мысль, что эти АИ могут использоваться для регуляции QS-процессов между разными видами, а также родами, живущими в одной среде. Подобным примером являются ранее описанные системы QS *P. aeruginosa* и *B. cepacia*, которые сосуществуют в легких у пациентов с муковисцидозом. В этом конкретном случае АГЛ, продуцируемые *P. aeruginosa*, могут восприниматься *B. cepacia*, но не наоборот, что позволяет предположить, что здесь коммуникация является однонаправленной [49]. Кроме того, между грамотрицательными и грамположительными бактериями могут также происходить перекрестные реакции с использованием сигнальных молекул. Это было показано на *P. aeruginosa* и *S. aureus*, которые также сосуществуют в легких пациентов с муковисцидозом, где АГЛ первых могут влиять на экспрессию детерминант вирулентности у последних, а 2-алкил-4-хинолоны могут вызывать образование небольших вариантов колоний и повышать устойчивость к антибиотикам. В более сложных средах обитания, такие как ризосфера, сосуществует множество различных бактерий, продуцирующих разнообразные сигнальные молекулы, что позволяет предположить существование очень сложной сигнальной сети, которая находится под контролем QS, и позволяет этим полимикробным сообществам поддерживать экологический баланс [163].

В дополнение к контролю экспрессии генов в бактериальных популяциях, было также установлено, что АГЛ непосредственно распознаются эукариотическими клетками и влияют на поведение эукариотических организмов. Так АГЛ, как было показано во многих исследованиях, имеют иммуномодулирующие эффекты, влияющие на выработку цитокинов, которые, в свою очередь, определяют тип иммунного ответа, вызываемого при инфекции. Кроме того, АГЛ могут также влиять на работу сердечно-сосудистой системы, вызывая расслабление кровеносных сосудов. Если мы поместим эти два аспекта в контекст инфекции, станет очевидным, что бактерии способны влиять на иммунные реакции, возможно, в свою пользу, и стимулировать доставку питательных веществ для их выживания путем увеличения кровоснабжения [49].

Всё вышеизложенное позволяет говорить о перспективности создания антибактериальных средств нового принципа действия, основанных на ингибировании QS-системы у бактерий-патогенов, использующих QS для реализации своего патогенного потенциала.

1.2 Возможные пути ингибирования систем «quorum sensing» у бактерий

На сегодняшний день особое внимание научной общественности все больше занимает проблема быстрого распространения антибиотикорезистентности, в связи с чем, традиционно применяемые лекарственные средства теряют свою былую эффективность. В частности, иллюстрацией описанной проблемы является частое появление госпитальных инфекций, регистрируемых в отделениях интенсивной терапии более чем у 20 % пациентов [9]. Данное обстоятельство определяет интерес к поиску новых средств и методов борьбы с бактериальными патогенами, реализация патогенного потенциала у которых связана не с прямым воздействием на бактериальную клетку, а на специфическую регуляцию биохимических путей микроорганизмов. К подобной регуляции, как раз и относят QS, так как, как уже было отмечено выше, данный феномен играет основную роль в патогенезе бактерий, затрагивающий синтез факторов вирулентности и образование биопленок [49].

Ингибиторы QS-систем, в сравнении с традиционно применяемыми лекарственными препаратами, в частности с антибиотиками, не обладают бактерицидным или бактериостатическим воздействием на микроорганизмы, в связи с чем, не оказывают селективного давления, приводящего к формированию нечувствительных к антибактериальным средствам форм бактериальных патогенов. На сегодняшний день за рубежом все чаще появляются биотехнологические компании, целью которых является разработка антибактериальных средств, механизм действия которых связан с ингибированием QS-зависимых процессов, вследствие чего, происходит уменьшение образования антибиотикорезистентных форм бактерий [16, 95].

Сегодня известно несколько путей ингибирования систем QS (Рисунок 6):

- 1) подавление синтеза АИ;
- 2) внеклеточное связывание АИ;
- 3) химическая деградация АИ;
- 4) интерференция с АИ за связывание с рецепторными белками.

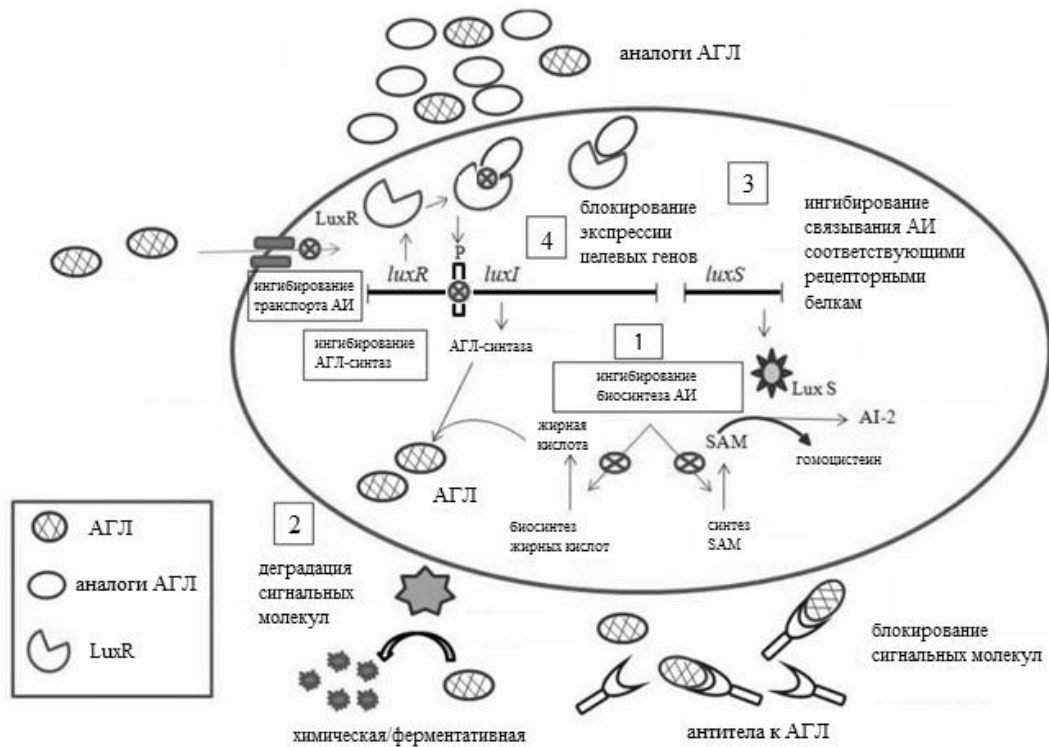


Рисунок 6 – Возможные пути ингибирования систем QS у бактерий

1.2.1 Подавление синтеза аутоиндукторов

Как уже упоминалось, SAM участвует в биосинтезе АГЛ и АИ-2, являясь их субстратом. Установлено, что у *P. aeruginosa* разные аналоги SAM, в частности, S-аденозилгомоцистеин и S-аденозилцистеин способны действовать, как мощные ингибиторы биосинтеза АГЛ. Важно отметить, что взаимодействие АГЛ-синтазы с SAM, совершается достаточно специфично, несмотря на то, что SAM является обычным предшественником во многих биохимических путях прокариот и эукариот. Данный факт наталкивает на мысль о том, что аналоги

SAM могут быть использованы в качестве специфических ингибиторов синтеза АИ, не оказывающих воздействия на ферменты эукариот [52, 80].

Еще одним вариантом ингибирования QS через подавление синтеза АИ можно назвать воздействие на образование белков АСР, играющих роль в продукции жирных кислот, которые являются предшественниками ацильных радикалов АГЛ [207].

Показано, что фитохимические экстракты, выделенные из различных фруктов, трав и специй, оказывали модулирующее действие на систему плотностно-зависимой химической коммуникации, путём неспецифического ингибирования синтеза АГЛ [200]. В работе Norizan с соавт. выявлено, что кофеин может ингибировать продукцию N-ацилгомосеринлактона у патогенного штамма *P. aeruginosa* PA01 [146].

1.2.2 Внеклеточное связывание автоиндукторов

Ещё одним способом ингибирования QS-зависимых процессов у бактерий является иммунофармакотерапевтический подход. Так антиавтоиндуцирующее моноклональное антитело AP4-24H11 показало анти-QS активность в отношении рационально сконструированного гаптена и эффективно ингибировало QS *in vitro* посредством секвестрации автоиндуцирующего пептида АИП-4, продуцируемого *S. aureus* RN4850. Важно отметить, что AP4-24H11 подавлял патогенность *S. aureus* на мышинной модели с образованием абсцесса *in vivo* и обеспечивал полную защиту от летального исхода при заражении *S. aureus* [109].

Аналогичное исследование было проведено на *S. epidermidis*. Лечение пептидом, ингибирующим QS, сильно снижало колонизацию при трансплантат-ассоциированной инфекции этого патогена [23].

Полученные данные обеспечивают прочную основу для дальнейших исследований в иммунофармакотерапии для лечения бактериальных инфекций, в которых QS контролирует экспрессию генов, ответственных за синтез факторов вирулентности.

Ещё одними «перехватчиками» бактериальных АИ являются циклодекстрины (CD). Так как многие бактерии имеют систему QS для регуляции экспрессии генов, перехват сигнальных молекул QS на CD может быть общим подходом для контроля их транскрипции. Подобный механизм наблюдается у оппортунистического патогена *Serratia marcescens*. Так, после культивирования этого штамма в присутствии 10 мМ 2-гидроксипропил- β -CD (HP- β -CD) относительная продукция пигмента продигиозина может быть снижена примерно до 0,86. Неспецифическая адсорбция АГЛ на гелевых пластинах из целлюлозного эфира была очень незначительной, поскольку относительная продукция продигиозина после погружения гелевых пластин в жидкую среду оставалась на уровне 0,95–1,00. Добавление анионных листов геля карбоксиметилцеллюлозы и 10 мМ HP- β -CD в культуральную среду эффективно снижало относительную продукцию продигиозина примерно до 0,56. Этот результат позволяет предполагать, что ионное взаимодействие, существующее между молекулами акцептора и АГЛ, стабилизирует образовавшийся комплекс, тем самым блокируя QS, что выражается в эффективном контроле синтеза продигиозина [101].

Ещё один пример ингибирования QS путем захвата сигнальных молекул циклодекстринами обнаружен у *P. aeruginosa*. Так ингибирование транскрипции *rhlA* приводило к выработке меньшего количества пиоцианина в присутствии 5 мМ растворимого α - или β -CD в жидкой среде. Кроме того, продуцирование репортерного фермента β -галактозидазы значительно уменьшалось у исследуемого штамма *P. aeruginosa*, когда иммобилизованный гель HP- β -CD погружали в культуральный раствор для захвата АГЛ из жидкой среды. Было показано, что при добавлении искусственных рецепторов АГЛ в культуральную среду, экспрессия QS-регулируемых генов может контролироваться дистанционно вне клетки [102].

1.2.3 Химическая деградация аутоиндукторов

Химическая деградация АИ является достаточно перспективным направлением поиска ингибиторов QS. Она может осуществляться посредством

воздействия специфических ферментов бактерий и высших организмов – лактоназ, ацилаз и оксидоредуктаз. Помимо этого, разрушение АИ также может происходить и за счет повышения рН среды, воздействия высоких температур культивирования, а также в результате щелочного гидролиза. На сегодняшний день ведется скрининг ферментов, способных разрушать АИ [193, 224].

Лактоназы, обладающие способностью к деградации АГЛ, характерны для бацилл. Соответствующий белок имеет название AiiA. Отмечено, что наличие у этих бактерий данного фермента способствует значительному подавлению синтеза QS-зависимых факторов вирулентности у фитопатогенных бактерий, которые в качестве сигнальных молекул используют АГЛ. Также показано, что при переносе гена рекомбинантной АГЛ-лактоназы в клетки *P. fluorescens* увеличивается способность штамма к биоконтролю заболеваний растений, вызванных фитопатогенными бактериями. Кроме того, установлено, что трансгенные растения, содержащие введенный ген *aiaA*, были в значительной степени менее чувствительны к инфекции, вызываемой *E. carotovora*, а введение этого гена в клетки данного фитопатогена понижало синтез АИ, в результате чего происходило снижение активности пектолитических ферментов, а также проявление других симптомов гнили растений [9, 51, 79].

Ацилазы являются биокатализаторами, способными расщеплять амидную связь АГЛ, высвобождая лактон L-гомосерина и жирные кислоты, которые вызывают значительное снижение активности QS [199]. Ацилазная активность АГЛ широко распространена у бактерий и проявляет каталитическую активность от умеренной до высокой по отношению к большому количеству субстратов, начиная от короткоцепочечных до длинноцепочечных АГЛ с 3-оксо или 3-гидрокси-заменами или без них у C₃-АГЛ [144].

Третья группа ферментов включает оксидоредуктазы, которые специфически не расщепляют молекулы АГЛ, а просто модифицируют некоторые функциональные группы. Однако они могут менять свою биологическую активность при QS. Активность оксидоредуктазы в отношении АГЛ была впервые обнаружена в неочищенных клеточных экстрактах *Rhodococcus erythropolis* W2

[198]. Экстракт способен восстанавливать 3-оксо-С₁₄-АГЛ в гидроксильное производное, но в отношении 3-гидрокси-С₁₄-АГЛ и других незамещенных АГЛ ферментативная активность не обнаружена. Другая окислительно-восстановительная активность против АГЛ была зарегистрирована у монооксигеназы P450 BM3 в *Bacillus megaterium* [35]. Однако специфичность реакции вызывает сомнения, поскольку ферментативная активность этого фермента обычно связана с жирными кислотами.

1.2.4 Интерференция с аутоиндукторами за связывание с рецепторными белками

Ингибирование QS-систем может быть получено путем использования молекул-антагонистов АИ, ограничивающих связывание АГЛ с рецепторными белками. Подобные ингибиторы могут быть как конкурентными, так и неконкурентными. Особенностью первых является близкая структурная организация к АИ, что делает возможным его присоединение к сайту связывания АГЛ на рецепторном белке, однако не активирует его. Вторые, в свою очередь, имеют либо слабое сходство с АИ, либо не сходны совсем. Подобные соединения связываются с разными сайтами на рецепторном белке. На сегодняшний день многие исследования посвящены изучению этих ингибиторов, в частности поиск конкурентных ингибиторов проводится с использованием компьютерного дизайна [98].

Известно, что аналоги АГЛ, модифицированные в ацильных цепях и гомосериновом кольце, способны ингибировать QS у бактерий. Также следует сказать, что для активности АГЛ, длина ацильной цепи имеет особое значение. Так аналоги АГЛ с более длинными ацильными цепями, обладают более высокой QS-ингибирующей активностью в сравнении с нативной АГЛ. И напротив, замена в молекуле АГЛ 3-оксо-групп на 3-гидроксильные или метильные, а также введение ненасыщенных связей в ацильные цепи существенно снижает активность данной сигнальной молекулы [131].

Как уже было сказано, на активность АИ значительно влияет структурная модификация АГЛ в гомосеринлактонном кольце. Природные АГЛ по своей природе являются L-изомерами. D-изомеры, в свою очередь, либо не проявляют биоактивности, либо проявляют ее в незначительной степени [131]. Так замена гомосеринлактонного кольца на гомоцистеинлактонное вызывало снижение активности АИ на порядок, а замена на гомосеринлактаманное кольцо приводило к исчезновению активирующих или антагонистических свойств у данной сигнальной молекулы. Однако, сигнальные молекулы, в которых была замена гомосеринлактона на гомосеринтиолактон, могли сохранять активность при функционировании некоторых QS-систем.

У *P. aeruginosa* аналоги АГЛ системы *las*, имеющие замены в гомосеринлактонном кольце, показали разную активность при взаимодействии с белками RhlR и LasR. Полученный факт может указывать на то, что два рецепторных белка *P. aeruginosa* имеют значительные различия в сайтах связывания с АИ [177].

Перспективным подходом, направленным на изучение ингибирования QS у бактерий, является поиск природных антагонистов АИ, в частности производных фуранонов, в том числе галогенизированных. В литературе представлены данные о способности австралийской красной водоросли *Delisea pulchra* синтезировать различные виды этих веществ [159]. Это явление имеет определенный биологический смысл: таким образом водоросль защищает себя от колонизации морскими бактериями, у которых под контролем QS находится ряд метаболических процессов.

Фураноны *D. pulchra* имеют в своем составе фурановое кольцо с замещенной в С-3 положении ацильной цепью и атомами брома в С-4 положении. Замещения в С-5 положении могут варьировать. Фураноны из природных источников могут быть галогенизированы в разных положениях атомами брома, иода или хлора [159].

После открытия QS-ингибирующей активности фуранонов, продуцируемых *D. pulchra*, интерес ученых-исследователей пал на скрининг веществ природного

происхождения с целью получения химически синтезированных производных фуранонов, обладающих QS-ингибирующей способностью. В спектр подобных соединений вошли производные фуранонов с ацильными цепями различные по длине цепи. В ходе исследования было выявлено, что даже производное фуранона без ацильной цепи с двумя атомами брома обладало QS-ингибирующим действием в отношении *P. aeruginosa*. Также было показано, что к синтезу производных фуранонов способны различные организмы: морские зеленые, красные и бурые водоросли, грибы, асцидии, актиномицеты и другие [142].

Подробное изучение механизма QS-ингибирующего действия данных соединений показало, что производные фуранонов конкурируют с АГЛ за сайт связывания с рецепторным белком LuxR-типа. Присоединение фуранонов к белку-рецептору влияет на стабильность комплекса белок-лиганд, что приводит к быстрому расщеплению рецепторного белка [159].

Приведенные выше данные свидетельствуют о перспективности применения производных фуранонов для получения на их основе лекарственных препаратов, направленных на угнетение QS-зависимых процессов у бактериальных патогенов. Однако, испытанные на данный момент соединения фуранонової природы в качестве ингибиторов QS оказались токсичными для их применения в медицинской практике. Актуальной задачей на сегодняшний день является их модификация и поиск новых, нетоксичных веществ для антибактериальной терапии.

Бактерии и эукариотические организмы также синтезируют вещества иной природы, так называемые циклические дипептиды (дикетопиперазины) (CDP). Однако данные о QS-ингибирующей активности этих соединений часто противоречивы. Так анти-QS активность циклического дипептида (L-лейцил-L-пролил) (CLP) морского происхождения была зарегистрирована в отношении *S. marcescens*. CLP мастерски ингибировал контролируемую QS продукцию продигиозина. Кроме того, анализ *in vivo* с использованием свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans* выявил нетоксичность этого соединения. Таким образом, данное исследование иллюстрирует возможность использования CLP в

качестве средства при лечении инфекционных процессов, как ингибиторов QS [70]. Та же QS-ингибирующая активность была показана в другой работе, иллюстрирующей способность дикетопиперазинов, продуцируемых штаммом *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426, ингибировать образование биопленки, образованной на границе раздела газ-жидкость [205].

Примечательно, что некоторые виды бактерий наоборот используют CDP в качестве сигнальных молекул, запускающих реакции QS [25]. Наконец, CDP, синтезируемые в ассоциациях морских губок *Dysidea avara* и *Ircinia variabilis* и бактерий *Vibrio spp.* и *Bacillus spp.* соответственно, также проявляли про-QS активность [12]. Приведённые выше аргументы говорят о необходимости дальнейшего глубокого изучения этой группы соединений как ингибиторов/стимуляторов QS.

Ингибирующим эффектом в отношении бактерий, использующих QS для реализации своего патогенного потенциала, обладают вещества, идентифицированные во многих растительных экстрактах, применяемых как в медицинской, так и в пищевой промышленности. Так QS-ингибирующая активность показана для 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида (ванили) из *Vanilla planifolia* [160], анакардиевых кислот, извлеченных из *Pimpinella anisum* (аниса) [15], *Anacardium occidentale* (кешью), эвгенола из *Syzygium aromaticum* (гвоздики), лаврового листа и других растений [71]. Все эти молекулы имеют общее фенольное кольцо, содержащее в основном пара- или метаалифатические боковые цепи различной длины, в основном с некоторыми дополнительными группами, такими как кетогруппы или двойные связи, или ароматическое кольцо. Эти данные на сегодняшний день являются перспективным подходом для решения проблемы ингибирования QS.

1.5 Антибиотики как потенциальные регуляторы систем «quorum sensing»

Антибиотики долгое время рассматривались исключительно как ингибиторы роста микроорганизмов. Однако на настоящий момент накоплен

значительный объём данных о том, что антибиотики в субингибиторных концентрациях проявляют способность и к регуляции QS, что соответствует современному взгляду на них как на «информбиотики», ориентированные не столько на угнетение роста бактерий-конкурентов, сколько на регуляцию профиля их генной экспрессии (Таблица 4) [4].

Таблица 4. Известные эффекты антибиотиков на систему QS LuxI/LuxR-типа

Антибиотик	Микроорганизм Система QS	Результат	Источник литературы
Азомакролиды	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> TraI/TraR	Нарушение взаимодействия АИ с рецепторным белком TraR	[226]
Цефтазидим, тобрамицин		Подавление образования АИ (C ₁₂ -АГЛ и C ₄ -АГЛ)	[67]
Цефтазидим, азитромицин, ципрофлоксацин		Подавление образования АИ (C ₁₂ -АГЛ и C ₄ -АГЛ)	[181, 189]
Ципрофлоксацин	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LasI/LasR RhlI/RhlR	Угнетение образования биопленок и QS-зависимой экспрессии факторов вирулентности	[78]
Тобрамицин		Индукция образования бактериальных биопленок	[88]
Ванкомицин, тетрациклин, ампициллин, азитромицин		Активация синтеза факторов вирулентности (рамнолипиды, феназин, экзоферменты, протеазы), находящихся под контролем QS	[176]
Канамицин, амикацин, гентамицин, тетрациклин, эритромицин	<i>Chromobacterium violaceum</i> CviI/CviR	Стимуляция синтеза пигмента виолацеина и фермента хитиназы, находящихся под контролем QS	[128]
Левовфлоксацин, меропенем	<i>Acinetobacter baumannii</i> AbaI/AbaR	Усиление образования бактериальной биопленки	[83]

Вместе с тем полученные результаты до сих пор не систематизированы, а в ряде случаев противоречивы. Так у некоторых аминогликозидных антибиотиков показана способность индуцировать образование бактериальных биопленок [8, 88]. В работе Shen с соавт. субингибиторные концентрации азитромицина и тетрациклина не подавляли, но напротив, активировали экспрессию QS-зависимых секретируемых факторов вирулентности *P. aeruginosa* [176]. Активирующее действие канамицина, амикацина, гентамицина, тетрациклина и эритромицина продемонстрировано в отношении QS-зависимого образования биопленки и биосинтеза фермента хитиназы у *S. violaceum* [128]. Сообщалось, что в клинических изолятах *Acinetobacter baumannii* присутствие левофлоксацина или меропенемных антибиотиков индуцирует сверхэкспрессию эффлюксного насоса, который стимулирует высвобождение АГЛ и, таким образом, усиливает образование QS-опосредованной биопленки, повышая устойчивость к антибиотикам [83]. Кроме того, на фоне отсутствия зависимости обнаруживаемых эффектов от природы тестируемых антибиотиков, в большинстве случаев невыясненными остаются механизмы их воздействия на системы QS у бактерий.

Связь между плотностно-зависимой регуляцией и антибиотикорезистентностью также весьма значительна. Например, добавление АГЛ при логарифмической фазе роста культуры *P. aeruginosa* увеличивает количество персистирующих клеток в популяции после обработки карбенициллином и ципрофлоксацином [139]. Кроме того, транскриптомный анализ с использованием регулятора транскрипции QS PqsR *P. aeruginosa* PA14 показал, что QS индуцирует экспрессию пероксидаз, которые обеспечивают защиту от активных форм кислорода (H_2O_2) и бета-лактамных антибиотиков [132]. В другом исследовании с использованием регулятора VqsM, который индуцирует QS у *P. aeruginosa* PAO1, было показано, что его воздействие обеспечивает устойчивость к антибиотикам, индуцируя экспрессию гена *nfxB*, регулятора антибиотикорезистентности, повышая устойчивость к хинолонам, тетрациклину и канамицину [123, 157].

С другой стороны, во многих исследованиях показано, что высокоэффективным методом воздействия на систему QS является применение комбинированной терапии с ингибиторами QS. Так у *P. aeruginosa* применение фармакологического соединения бензамид-бензимидазол, ингибирующего регулятор QS PqsR, снижает образование биопленки и восстанавливает восприимчивость к антибиотикам [133, 183]. Байкалиновый гидрат и гамамелитанин, АГЛ-ориентированный и пептидный ингибиторы, усиливали разрушение биопленки как у грамотрицательных (*P. aeruginosa* и *B. cepacia* в совокупности), так и у грамположительных (*S. aureus*) бактерий и показали синергетический эффект при совместном лечении с тобрамицином и клиндамицином или ванкомицином соответственно как *in vitro*, так и *in vivo* [27]. Эффективность аминогликозидов [94, 185], хинолонов [76], полипептидов [29, 63], цефалоспоринов [133] и гликопептидов [41] повышалось за счет добавления ингибиторов QS.

Обобщая имеющиеся данные, можно сказать, что использование QS-ингибиторов является потенциальным способом повышения чувствительности к антибиотикам и, следовательно, снижения их активных доз. Кроме того, аналогичная тенденция и эффективность также наблюдаются при совместном применении фермента лактоназы и антибиотика ципрофлоксацина на мышинной модели [77]. Было показано, что комбинация противомикробных препаратов и QS-ингибиторов имеет обнадеживающий синергетический эффект, подчеркивая, что QS-ингибиторы являются хорошей стратегией для снижения использования антибиотиков и борьбы с растущей проблемой устойчивости к ним. Тем не менее, надо сказать, если данный подход может помочь в профилактике и лечении инфекций, их нельзя использовать для лечения острых инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные для исследования модулирующего воздействия антибиотиков на «quorum sensing» у бактерий

В качестве основного инструмента исследования влияния антибиотиков на QS у бактерий стали два генетически связанных штамма *C. violaceum* (Таблица 5), система QS которых состоит из гена *cvil* (функциональный аналог гена *luxI*), кодирующего синтазу АИ N-гексаноил-L-ацилгомосеринлактона (C₆-АГЛ); а также гена *cvrR* (аналог гена *luxR*), кодирующего рецепторный регуляторный белок. *C. violaceum* ATCC 31532 представляет собой дикий штамм с полноценной системой CviI/CviR, контролирующей образование доступного для визуальной и аппаратной регистрации сине-фиолетового пигмента виолацеина с максимумом поглощения при 570-600 нм (Рисунок 7).

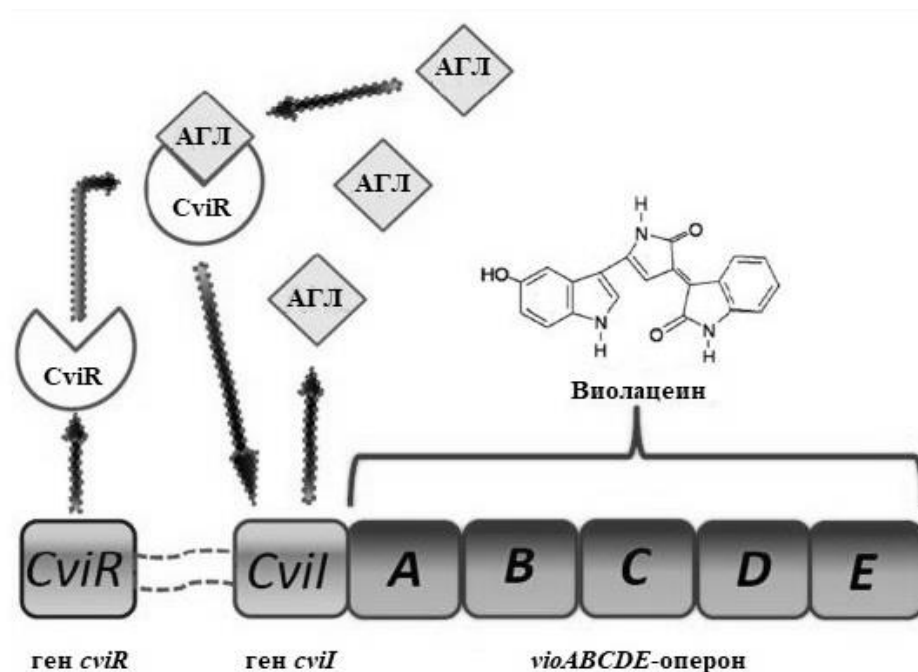


Рисунок 7 – QS-зависимый синтез виолацеина у *C. violaceum* ATCC 31532

Таблица 5 – Характеристика штаммов, используемых для оценки системы QS LuxI/LuxR-типа

Характеристики использованных штаммов	<i>C. violaceum</i> ATCC 31532	<i>C. violaceum</i> CV026	<i>E. coli</i> pAL101	<i>E. coli</i> pAL103
Компоненты системы QS				
Синтаза АИ	CviI	инсерция транспозона mini-Tn5 в гене <i>cviI</i>	-	-
Рецепторный белок	CviR	CviR	RhlR (из <i>P. aeruginosa</i>)	LuxR (из <i>V. fischeri</i>)
Воспринимаемый АИ	C ₆ -АГЛ	C ₆ -АГЛ	C ₄ -АГЛ	C ₆ -оксо-АГЛ/ C ₆ -АГЛ
Признаки, находящиеся под контролем системы QS				
Индуклируемый оперон	<i>vioABCDE</i>	<i>vioABCDE</i>	<i>luxCDABE</i>	<i>luxCDABE</i>
Фенотипическое проявление	Пигмент виолацеин	Пигмент виолацеин	Биолюми-несценция	Биолюми-несценция
Дополнительные характеристики				
Генетические детерминанты резистентности	-	Km ^r (в транспозоне mini-Tn5)	Tet ^r (в плазмиде pAL101)	Tet ^r (в плазмиде pAL103)
Устойчивость	-	Аминогликозиды	Тетрациклины	Тетрациклины

В свою очередь производный от него штамм *C. violaceum* NCTC 13274 (CV026), имеет инсерцию транспозона mini-Tn5 в ген *cviI*, ведущую к необратимой утрате способности биосинтеза АИ C₆-АГЛ и блокирующей самостоятельный синтез пигмента виолацеина. Данная способность может быть восстановлена при внесении в среду культивирования экзогенного C₆-АГЛ [184] или иных АГЛ-мимикрирующих химических соединений [26]. Дополнительным основанием использования *C. violaceum* CV026 для заявленных целей являлось присутствие в составе транспозона mini-Tn5 генетической детерминанты K^{mr}, контролирующей устойчивость к антибиотикам из группы аминогликозидов, что

В использованном экспериментальном контексте исключает возможность искажающего воздействия аминогликозидов на результат детекции C₆-АГЛ.

В экспериментах, направленных на исследование механизмов анти-QS активности активированного угля, пирогаллола и кумарина, а также в исследованиях продукции C₆-АГЛ культурой *S. violaceum* ATCC 31532 при воздействии тетрациклинов, использован сенсорный штамм *E. coli* JLD271 с плазмидой *pAL103; luxR+luxI_luxCDABE; TetR p15A* [125]. Клонированный в её составе ген *luxR* кодирует рецепторный белок, воспринимающий АГЛ с шестью атомами углерода в боковой цепи, и на этой основе обеспечивает дозозависимое развитие биолюминесценции как следствие транскрипции *luxCDABE*-оперона (Таблица 5). Наличие генетической детерминанты резистентности к тетрациклинам у данного биосенсора позволило исключить искажающее воздействие последних на результат биотестирования в случае одновременного присутствия в среде АИ и антибиотика. Исследование способности к образованию C₄-АГЛ, контролирующего биопленкообразование и синтез факторов вирулентности *P. aeruginosa* проводили с использованием другого люминесцирующего штамма *E. coli* JLD271, *pAL101; rhlR+ rhlI_luxCDABE; TetR p15A*, отличием которого от описанного выше *E. coli pAL103* является наличие воспринимающего C₄-АГЛ рецепторного белка RhlR (Таблица 5).

В отдельной серии экспериментов использовали четыре клинических изолята *P. aeruginosa* с экспериментально доказанной способностью к продукции АГЛ, выделенных из патологического материала в одном из родовспомогательных учреждений г. Оренбурга.

В эксперименте по инактивации антибиотиков с использованием экзогенной пенициллиназы, а также при исследовании сорбции амикацина на частицах активированного угля дополнительно использовали штамм *S. aureus* subsp. *aureus* FDA 209P (ATCC 6538P), проявляющий высокую чувствительность к широкому кругу антибиотиков и в этой связи рекомендуемый для оценки их биоактивности.

2.2 Антибиотики и химические соединения, использованные для модулирования систем «quorum sensing» у бактерий

Объектом исследования являлись природный антибиотик бензилпенициллин (CAS 61-33-6), а также полусинтетические аминопенициллины (ампициллин, CAS 69-53-4; амоксициллин, CAS 26787-78-0), изоксазолилпенициллин (оксациллин, CAS 66-79-5), карбоксипенициллины (карбенициллин, CAS 4697-36-3; тикарциллин, CAS 34787-01-4) и уреидопенициллины (азлоциллин, CAS 37091-66-0; пиперациллин, CAS 66258-76-2), имеющие варьирующий по строению радикал (R), присоединённый к бета-лактамному кольцу (Рисунок 8), наличие которого определяет бактерицидную способность данной группы антибиотиков (Таблица 6).

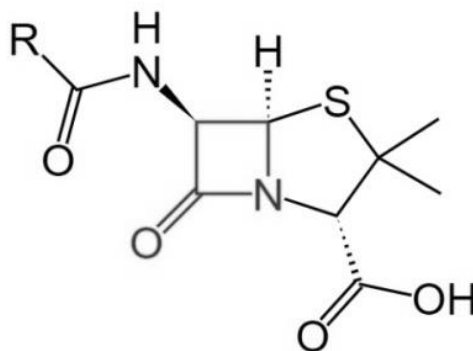
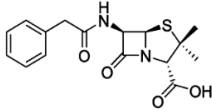
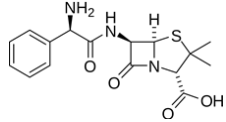
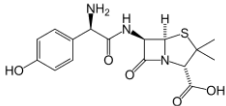
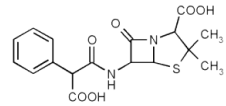
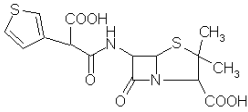
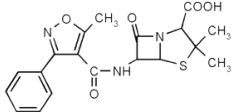


Рисунок 8 – Структурная формула бета-лактамных антибиотиков

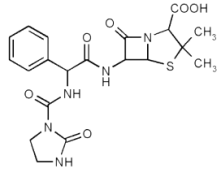
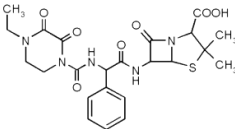
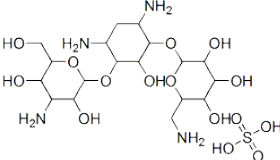
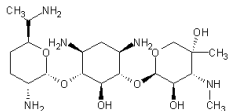
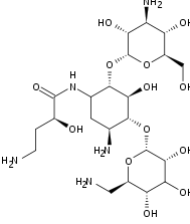
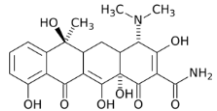
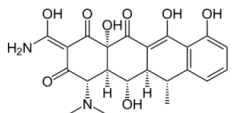
В исследование были включены диски производства компании HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия) с содержанием данных антибиотиков от 1 до 100 мкг/диск.

В отдельной серии экспериментов проводили инактивацию антибиотиков с использованием бета-лактамаз I (пенициллиназа) и II типа (цефалоспориназа) с широким спектром активности, образуемых *B. cereus*. Активность данного препарата составляет 1,500-3,000 U/мг по бензилпенициллину и 10-30 U/мг по цефалоридину (Sigma-Aldrich, США).

Таблица 6 – Классификация и особенности антибиотиков, применяемых для модулирования систем QS у *C. violaceum*

Классы антибиотиков	Подклассы антибиотиков	Используемые антибиотики	Концентрация	Структурная формула	Производитель
β-лактамы пенициллинового ряда	Природные пенициллины	Бензилпенициллин	2 у. ед./диск		HiMedia, Индия
		Бензилпенициллин	10 у. ед/диск		
	Аминопенициллины	Ампициллин	10 мкг/диск		
		Ампициллин	25 мкг/диск		
		Амоксициллин	10 мкг/диск		
		Амоксициллин	25 мкг/диск		
	Карбоксипенициллины	Карбенициллин	100 мкг/диск		
		Тикарциллин	75 мкг/диск		
	Изоксазолилпенициллины	Оксациллин	1 мкг/диск		
Оксациллин		5 мкг/диск			

Продолжение таблицы 6

β-лактамы пенициллинового ряда	Уреидопенициллины	Азлоциллин	75 мкг/диск		HiMedia, Индия
		Пиперациллин	100 мкг/диск		
Аминогликозиды	-	Канамицин	100 мкг/мл		Sigma, США
		Гентамицин	100 мкг/мл		
		Амикацин	100 мкг/мл		
Тетрациклины	-	Тетрациклин	100 мкг/мл		
		Доксициклин	100 мкг/мл		

Для воздействия на рост и систему плотностно-зависимой коммуникации *C. violaceum* ATCC 31532 использовали химически чистые субстанции антибиотиков (Sigma, США) группы тетрациклинов, представленные тетрацилина гидрохлоридом (CAS 64-75-5) и полусинтетическим производным окситетрацилина – доксицилина гидрохлоридом (CAS 100929-47-3). Использованные в исследовании аминогликозиды относились к I (канамицина сульфат, CAS 25389-94-0), II (гентамицина сульфат, CAS 1405-41-0) и III (амикацина сульфат, CAS 37517-28-5) поколениям этой группы антибиотиков (Таблица 6).

В качестве потенциального сорбента C_6 -АГЛ использован фармакопейный препарат активированного угля (CAS 16291-96-6) производства ОАО «Фармстандарт-Лексредства» (Россия) с показателем зольности менее 1% и значением йодного индекса 800-900 мг/г.

Активированный уголь (АУ) традиционно используют для очистки воды, органических и биологических жидкостей [6, 165]. Важным условием для проявления данного варианта активности являются наличие микро- (до 2 нм), мезо- (от 2 до 50 нм) и макро- (более 50 нм) пор общим объемом до 0,7 см³/г, в совокупности увеличивающих удельную поверхность АУ до 500-1500 м² на 1 грамм веса. Кроме того, особые свойства данного соединения определяются качественными характеристиками поверхности (Рисунок 9), в том числе присутствием на ней активированных двойных связей [30]. В результате активированный уголь может быть охарактеризован как поливалентный физико-химический антидот, удаляющий органические соединения путем их адсорбции, а окислители – с участием механизма каталитического окисления [175].

Спектр органических молекул, сорбируемых АУ, включает алкалоиды, гликозиды, барбитураты, производные фенола, а также токсины бактериального и растительного происхождения [5, 7], что определяет его использование в качестве дезинтоксикационного и противодиарейного средства.

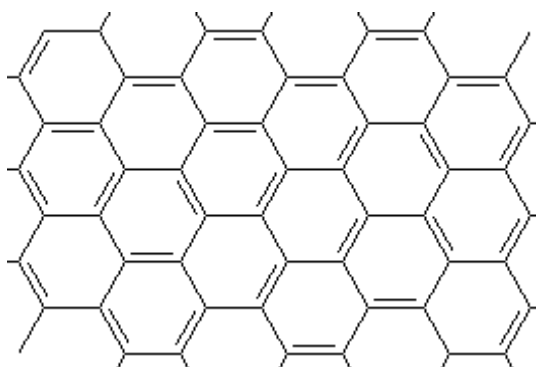


Рисунок 9 – Структурная формула поверхности активированного угля

Перед проведением исследований данный препарат измельчали с использованием электрической мельницы, отбирали гранулометрическую фракцию 130-250 мкм, которую высушивали до постоянной массы при +120 °С.

Малые молекулы растительного происхождения (ММРП) пирогаллол (1,2,3-тригидроксибензол; CAS 87-66-1) и кумарин (2H-хромен-2он; CAS 91-64-5) были представлены их химически синтезированными аналогами, произведенными компаниями «TCI EUROPE N.V.» (ЕС) и «Enamine Ltd» (Украина) (Таблица 7).

Таблица 7 – Малые молекулы растительного происхождения, используемые при сочетании с амикацином для подавления системы QS *C. violaceum* ATCC 31532

№	Названия по ИЮПАК / тривиальное	№ CAS	Структурная формула
1	1,2,3-benzenetriol / Пирогаллол	87-66-1	
2	2H-1-benzopyran-2-one / Кумарин	91-64-5	

Пирогаллол – соединение, обладающее высокой способностью к окислению, благодаря чему применяется как проявитель в фотографии, для

анализа газовой смеси (щелочной раствор пирогаллола избирательно поглощает кислород), для производства некоторых красителей [178]. Ранее пирогаллол использовали и в качестве лекарственного средства для лечения некоторых кожных заболеваний, однако позднее выяснилось, что данное соединение токсично. Так, попадание 2 г пирогаллола в желудок приводит к летальному эффекту для человека [136].

Производные пирогаллола широко распространены в природе: их обнаруживают в буковой смоле, в некоторых антоцианах, в качестве компонента эллаготанинов (составной части некоторых дубильных веществ) и т. д. [178].

Температура плавления пирогаллола $+133^{\circ}\text{C}$, температура кипения – 309°C . Как и все многоатомные фенолы, пирогаллол является бесцветным кристаллическим веществом, которое растворяется в воде, спирте, в меньшей степени – в эфире [173].

Кумарин представляет собой лактон о-оксикоричной кислоты. Данное вещество имеет вид бесцветных кристаллов со специфическим запахом. Его температура плавления равна 70°C , а температура кипения – 291°C . Кумарин хорошо растворяется в спирте и эфире, однако плохо растворим в воде. В свою очередь, 4-гидрокси замещение наделяет молекулу кумарина слабокислыми свойствами, что делает ее растворимой в слабощелочной среде [108].

Кумарин входит в состав многих растений в виде гликозидов. Растения, содержащие в себе кумарин, представлены семействами Астровые (герберы, ромашка, тысячелистник), Бобовые (донник), Мятликовые (зубовка) и другие [108].

Физиологическое действие кумарина в отношении человека и животных человека является крайне незначительным. Однако его производные могут оказывать выраженное воздействие на живой организм. Так производные кумарин-3-карбоновых кислот обладают снотворным действием. Дикумарол (3,3-метилен-бис-4-оксикумарин) препятствует свертыванию крови, в следствие чего могут возникать болезненные кровотечения у крупного рогатого скота при поедании сладкого клевера [195, 221].

Перед экспериментами образцы пирогаллола и кумарина растворяли в стерильной дистиллированной воде и делали двукратные разведения с целью выявления полного спектра антибактериальных и анти-QS эффектов.

Для контрольной индукции *C. violaceum* CV026 и *E. coli* pAL103 использовали химически синтезированный АИ C₆-АГЛ (CAS 147852-83-3), а для *E. coli* pAL101 – C₄-АГЛ (CAS 67605-85-0) с чистотой $\geq 95\%$ (Cayman Chemicals, США) (Рисунок 10).

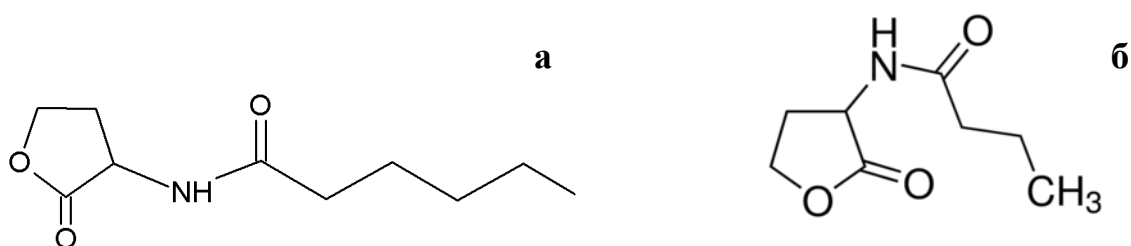


Рисунок 10 – Структурные формулы N-гексаноил-L-гомосеринлактона (а) и N-бутирил-L-гомосеринлактона (б)

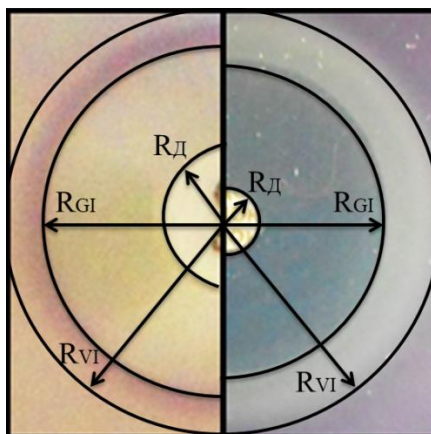
2.3 Методы исследования QS-модулирующей активности антибиотиков, химических соединений и их комбинаций

При проведении данной работы использовались методы, позволяющие произвести оценку влияния исследуемых антибиотиков на QS у биосенсорных штаммов, которое проявлялось либо через синтез или ингибирование пигмента виолацеина либо через активацию или тушение биолюминесценции.

2.3.1 Биотесты индукции/ингибирования биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum*

Определение способности антибиотиков стимулировать либо ингибировать QS проводилось методом диффузии в агар. Суть этого метода заключается в способности анализируемого вещества диффундировать из зоны его внесения в

питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара. По мере удаления от зоны внесения концентрация антибиотика снижается. Про-QS либо анти-QS эффекты проявлялись при субингибиторных концентрациях действующего вещества (Рисунок 11).



R_d – радиус диска; R_{GI} – радиус подавления роста;

R_{VI} – наружный радиус пигментированной/депигментированной зоны

Рисунок 11 – Схематическое изображение метода диффузии в агар

При проведении исследования по влиянию антибиотиков на QS *C. violaceum* 200 мкл суточной культуры вносили в 5 мл 0,5% LB-агара (Sigma, США) с 0,4% глюкозы и после тщательного перемешивания наслаивали на предварительно подготовленный плотный слой из 10 мл 1,5% LB-агара. На поверхность инокулированного агара накладывали диски с исследуемыми антибиотиками (по 6 дисков одного наименования на чашку Петри); при оценке биоактивности бета-лактамных антибиотиков с использованием мутантного штамма *C. violaceum* CV026 в центр чашки помещали диск, пропитанный C_6 -АГЛ в качестве положительного контроля. Чашки культивировали при +17°C, 22°C, 27°C, 32°C и 37°C в течение 1-4 суток.

Антибактериальный эффект регистрировали по формированию прозрачных зон с полным отсутствием роста, а QS-индуцирующий или QS-ингибирующий эффекты – по окрашенным (с пигментом виолацеином) либо белым ореолам

вокруг дисков или зон подавления роста тест-штамма, которые выражали значениями площадей соответствующих зон (мм²), рассчитываемых по формулам:

$$S_{GI} = \pi \times R_{GI}^2 - S_{д},$$

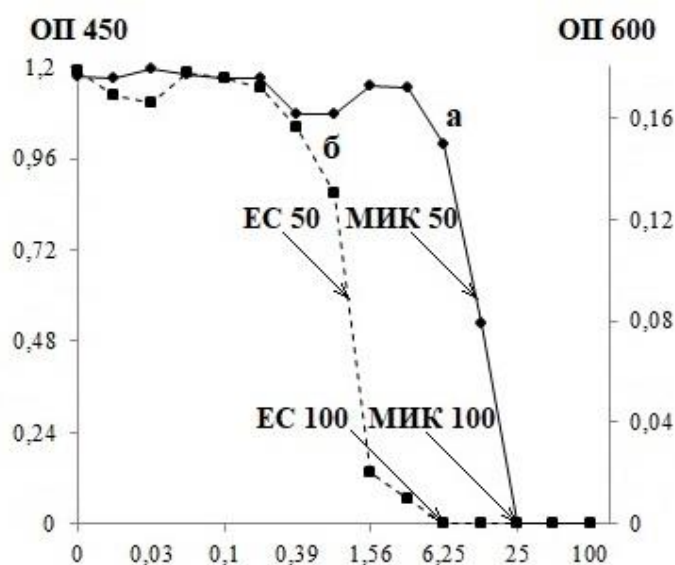
$$S_{VI} = \pi \times R_{VI}^2 - S_{GI} - S_{д},$$

где R_{GI} – радиус зоны подавления роста, R_{VI} – наружный радиус пигментированной/депигментированной зоны [197].

Анализ анти-QS активности антибиотиков, блокирующих синтез белка (тетрациклинов и аминогликозидов), а также АУ и ММРП (пирогаллола и кумарина) на дикий штамм *S. violaceum* ATCC 31532 проводили с помощью метода серийного разведения. Принцип метода заключается в последовательном разведении антибиотического вещества с известной концентрацией и внесением микробной взвеси известной оптической плотности (обычно 0,5 ед. мутности по стандарту McFarland), дальнейшем её культивировании и определении способности подавлять рост исследуемого микроорганизма при разных разведениях действующего вещества. В нашем случае определялась не столько бактерицидная активность антибиотика, сколько его способность ингибировать синтез виолацеина.

При проведении экспериментальной серии исследования в LB-бульоне (Sigma, США) готовили двукратные разведения антибиотика (в диапазоне концентраций 0,05-100 мкг/мл); АУ (навески от 1000 до 30000 мкг/мл); пирогаллола (0,15-157,64 мкг/мл) или кумарина (1,43-1461,52 мкг/мл). В каждое исследование включали дополнительные пробы LB-бульона, не содержащие названных компонентов и используемые в качестве положительного (рост тест-штамма) и отрицательного (стерильного) контролей. В стеклянные емкости, содержащие по 2 мл приготовленных подобным образом опытных и контрольных проб, вносили по 20 мкл суточной культуры *S. violaceum* ATCC 31532,

дополнительно подращивали при $+27^{\circ}\text{C}$ в течении суток. Оценку результатов эксперимента проводили с использованием микрострипового фотометра STAT FAX 303 VIS+ (Awareness Technology, США), последовательно регистрируя оптическую плотность бактериальной биомассы при 450 ± 5 нм, а количественное присутствие пигмента виолацеина после его этанольной экстракции при 600 ± 5 нм (Рисунок 12). Значения поглощения отрицательного контроля вычитали. Антибактериальный эффект выражали значениями МИК₁₀₀ и МИК₅₀ – минимальными ингибирующими концентрациями, вызывающими 100%-ое и 50%-ое подавление роста тест-штамма относительно положительного контроля. В свою очередь интенсивность подавления системы QS выражали величинами ЕС₁₀₀ и ЕС₅₀, соответствующими аналогичным интенсивностям ингибирования биосинтеза пигмента виолацеина.



а – оптическая плотность биомассы (ОП₄₅₀), ось ординат слева;

б – оптическая плотность пигмента (ОП₆₀₀), ось ординат справа;

значения МИК₅₀ и МИК₁₀₀, характеризующие подавление роста бактериальной культуры на 50% и 100% от контрольных значений, а также ЕС₅₀ и ЕС₁₀₀, характеризующие аналогичное по выраженности подавление биосинтеза пигмента виолацеина, указаны стрелками

Рисунок 12 – Расчет МИК и ЕС в эксперименте серийных разведений исследуемых веществ

В отдельной серии экспериментальных исследований дополнительным инструментом для определения биоактивности исследуемых соединений стал мутантный штамм *S. violaceum* CV026. Оценку его чувствительности к С₆-АГЛ в эксперименте по влиянию аминогликозидов на QS проводили следующим образом. В ячейки 96-луночного планшета из прозрачного пластика вносили по 50 мкл разведений химически синтезированного С₆-АГЛ в диапазоне концентраций от 10⁻⁴ до 10⁻⁸ М, которые смешивали с равными объемами LB-бульона или растворов антибиотиков в LB-бульоне. Затем в приготовленные пробы С₆-АГЛ и его смеси с антибиотиками вносили в качестве инокулята по 20 мкл суточной культуры *S. violaceum* CV026 и культивирования в статическом режиме при 27°C в течении 24 ч. Оптическую плотность выросших популяций определяли с использованием микрострипового фотометра, как описано выше.

2.3.2 Дополнительные биотесты на люминесцирующих штаммах *E. coli*

В качестве дополнительных биотестов в некоторых сериях экспериментальных исследований использовали штаммы *E. coli* *pAL101* и *E. coli* *pAL103* [125]. Используемые *lux*-биосенсоры выращивали в течение 18-24 часов при 37 °С на LB-агаре (Sigma, США) в присутствии 15 мкг/мл доксициклина, являющегося селективным фактором плазмид *pAL101* и *pAL103*. Непосредственно перед постановкой эксперимента культуру переносили в LB-бульон и дополнительно подращивали в течение 2-3 часов для достижения оптической плотности 0,5 ед. при 450 нм.

При оценке чувствительности *E. coli* *pAL103* к С₆-АГЛ в ячейки 96-луночного планшета из непрозрачного пластика вносили по 50 мкл разведений химически синтезированного С₆-АГЛ в диапазоне концентраций от 10⁻⁴ до 10⁻⁸ М, которые смешивали с равными объемами LB-бульона или растворов антибиотиков группы тетрациклинов в LB-бульоне. Затем в приготовленные пробы С₆-АГЛ и его смеси с антибиотиками вносили в качестве инокулята по 100 мкл суточной культуры *E. coli* *pAL103*. Реакцию тест-штамма на С₆-АГЛ и его смеси с антибиотиками оценивали через 60 мин после внесения бактериальной

культуры, регистрируя интенсивность развивающегося свечения с использованием биолюцинометра LM 01T (Immunotech, Чехия), проводя оценку и архивирование полученных данных с использованием программного обеспечения KILIA. Степень индукции биолюминесценции определяли как отношение интенсивности свечения исследуемого образца на 60 мин к исходной точке, пересчитывая относительные значения светимости на количество биомассы, учитываемое по величине ОП₄₅₀ и выражая результат в относительных единицах свечения (RLU).

При исследовании продукции С₄-АГЛ клиническими изолятами *P. aeruginosa* предварительно подготовленные супернатанты этого штамма вносили в ячейки 96-луночного планшета из непрозрачного пластика (Thermo, США) по 100 мкл, а затем закапывали такое же количество предварительно подготовленной культуры *E. coli pAL101*. Отрицательными контролями являлись пробы сенсорного штамма с добавлением аналогичного объема LB-бульона, положительными – его смеси с химически чистым препаратом С₄-АГЛ (Sigma, США) в концентрации 10⁻⁶ М. Динамическую регистрацию развития биолюминесценции в опытных и контрольных пробах производили по методике, описанной выше.

2.3.3 Методы исследования механизмов QS-регулирующей активности

Доказательство роли пенициллинов как индукторов АГЛ-зависимой реакции *S. violaceum*. Эксперимент проводили в двух вариантах: первый включал обработку антибиотиков экзогенной пенициллиназой; второй подразумевал использование антибиотика совместно с ингибиторами пенициллиназ.

В эксперименте по инактивации пенициллинов использовали препарат бета-лактамаз I (пенициллиназа) и II типа (цефалоспориноза), который в объеме 25 мкл наносили на диски с антибиотиками и выдерживали во влажной камере при 25°C в течение 60 мин. Эффективность инактивации контролировали с использованием тест-штамма *S. aureus* 209 P (ATCC 6538P).

В другой экспериментальной серии защиту антибиотиков от воздействия собственных бета-лактамаз *S. violaceum* CV026 осуществляли сульбактамом и клавулановой кислотой, используя для этого соответствующие диски.

Определение количественного содержания внеклеточного C_6 -АГЛ в культурах *S. violaceum* ATCC 31532. Выращенные в присутствии субингибиторных концентраций антибиотиков и контрольные 24-ч культуры *S. violaceum* ATCC 31532 центрифугировали (6000 g 15 мин), супернатанты в объеме 100 мкл переносили в ячейки 96-луночных планшетов. Определение содержания C_6 -АГЛ в супернатантах проводили с использованием тестерных штаммов *S. violaceum* 026 (в экспериментах с аминогликозидами) или *E. coli* *pAL103* (в экспериментах с тетрациклинами), как описано выше. Количество АИ в супернатантах (мкМ) определяли графическим методом с использованием калибровочных кривых, построенных для химически чистого C_6 -АГЛ и его смесей с антибиотиками. Продуктивность C_6 -АГЛ определяли, пересчитывая полученные значения на 1 ед. оптической плотности соответствующих культур *S. violaceum* ATCC 31532 (при 450 нм).

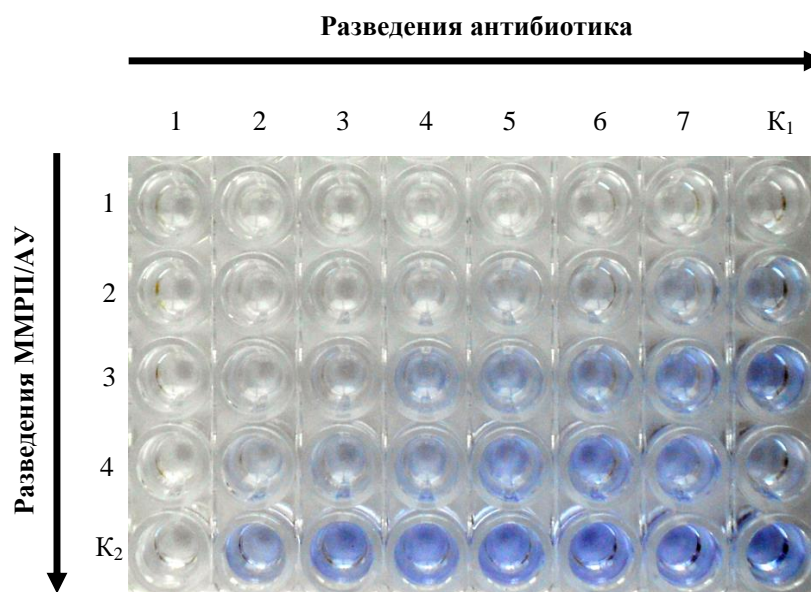
Сорбцию C_6 -АГЛ на частицах АУ также оценивали остаточными концентрациями АИ, детектируемого на основе дозозависимого биолюминесцентного отклика *E. coli* *pAL103*. Для этого в стеклянные емкости вносили от 1000 да 30000 мкг АУ и добавляли по 1 мл супернатанта *S. violaceum* ATCC 31532. В контрольный ряд емкостей помещали аналогичные объемы супернатанта в отсутствии сорбента. Емкости закрывали, переносили на шейкер ST-3 (Elmi, Латвия) и встряхивали при 300 об/мин в течение 1 часа. Супернатанты отделяли при 13000 об/мин на микроцентрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) и в объеме по 100 мкл вносили в ячейки 96-луночного планшета из непрозрачного пластика «Microlite 2+» (Thermo, США); контрольные пробы вносили без центрифугирования. В каждую лунку добавляли по 100 мкл предварительно подготовленного *lux*-биосенсора, после чего планшет помещали в измерительный блок биолюминометра LM 01T (Immunotech, Чехия). Регистрацию результатов проводили как описано выше.

Оценку механизма анти-QS активности ММРП относительно соответствующих контролей проводили в тесте подавления бактериальной биолюминесценции в двух вариантах. Первый из них предусматривал возможность прямой конкуренции растительных компонентов с С₆-АГЛ за связывание с рецепторным белком LuxR, а второй – воздействие данных компонентов на чувствительность микроорганизмов к последующей индукции АИ.

Два варианта подобного эксперимента предусматривали внесение в предварительно подготовленную культуру *E. coli pAL103* пирогаллола в концентрациях 0,15-157,64 мкг/мл или кумарина 22,84-1461,52 мкг/мл с одновременной или последовательной индукцией С₆-АГЛ в концентрации 10⁻⁶ М. Динамическую регистрацию развивающегося свечения проводили в 96-луночных планшетах из непрозрачного пластика «Microlite 2+» (Thermo, США), помещаемых в термостатируемый измерительный блок биолюминометра LM 01T («Immunotech», Чехия).

2.3.4 Методы исследования комбинированного действия антибиотиков и других химических соединений

В экспериментальных сериях, ориентированных на исследование комбинированного воздействия амикацина, формировали панели стеклянных емкостей 8×12 (при сочетании с АУ) или использовали пластиковые 96-луночные планшеты (при сочетании с пирогаллолом и кумарином), в которые вносили двукратные разведения тестируемых соединений в перпендикулярных друг другу направлениях, что обеспечивало их различные концентрационные соотношения. В свою очередь пробами сравнения являлись ряды разведений, содержащие только одно из тестируемых соединений, а также положительный и отрицательный контроли. Дальнейшую инокуляцию *S. violaceum* ATCC 31532, культивирование и учет результата исследования проводили, как описано в пункте 2.3.1 (Рисунок 13).



К₁ – контрольный ряд разведений антибиотика;

К₂ – контрольный ряд разведений ММРП или АУ

Рисунок 13 – Схема исследования комбинированного действия антибиотиков и других химических соединений на *S. violaceum* ATCC 31532

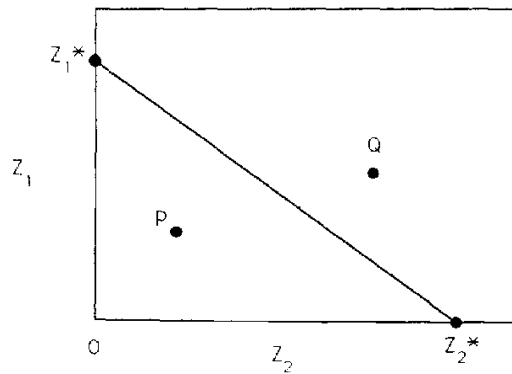
2.4 Методы статистической обработки результатов исследования

Все эксперименты выполнены не менее чем в пяти повторностях.

Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики с использованием компьютерных программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и STATISTICA 10 (StatSoft, США). Математическую меру корреляции случайных величин выражали коэффициентом корреляции Пирсона.

Для определения характера взаимодействия соединений в составе предложенных композиций использован изоболографический анализ [191]. Принцип данного метода заключается в построении изоболограммы, по которой можно определить характер взаимодействия двух веществ путём сравнения экспериментальных точек, координатами которых является концентрация вещества и значение ЕС₅₀ (Рисунок 14). Другими словами этот анализ позволяет говорить о синергическом либо антагонистическом взаимодействии исследуемых лекарств. Комбинация веществ вызывает аддитивный эффект, если точка

расположена на изоболе, супераддитивный эффект, если она находится под изоболой и инфрааддитивный эффект, если точка находится над изоболой.



z_1 и z_2 – концентрации веществ 1 и 2; z_1^* и z_2^* – эффективность вещества 1 и 2 (т.е. EC_{50}); линия, соединяющая z_1^* и z_2^* – изоболоа; точка P представляет собой пример супераддитивного эффекта, а точка Q – антагонистического эффекта

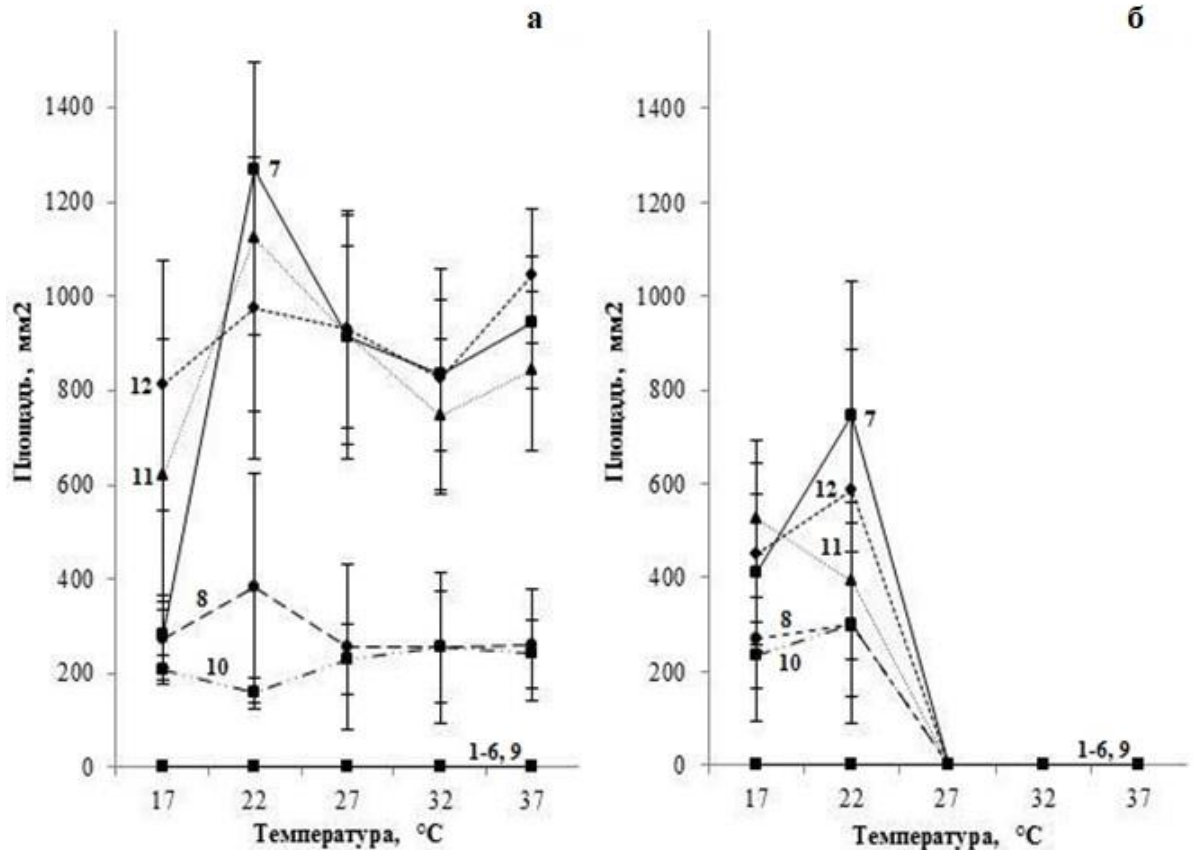
Рисунок 14 – Схема построения изоболограммы

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Определение направленности воздействия пенициллинов на систему QS у *C. violaceum* с анализом условий формирования подобного эффекта

Исследование чувствительности *C. violaceum* CV026 к антибиотикам группы пенициллина позволило констатировать широкий спектр эффектов: от полного отсутствия антибактериальной активности до выраженного подавления бактериального роста (Рисунок 15а). Наибольшую активность в отношении данного тест-штамма проявляли уреидопенициллины (азлоциллин с содержанием 75 мкг/диск и пиперациллин с содержанием 100 мкг/диск), а также карбоксипенициллин карбенициллин с содержанием 100 мкг/диск, типичная площадь зон подавления роста которыми находилась в диапазоне 240-1267 мм². При этом регистрируемые эффекты имели максимумы антибактериальной активности при 22°C и 37°C без четкой зависимости от температуры культивирования. В свою очередь карбоксипенициллин тикарциллин (75 мкг/диск) и изоксасолилпенициллин оксациллин (5 мкг/диск) обуславливали развитие менее выраженного антибактериального эффекта, характеризуемого зонами подавления роста от 157 до 382 мм², а прочие антибиотики (бензилпенициллин, аминопенициллины ампициллин и амоксициллин) в данных условиях не проявили детектируемой активности.

На этом фоне для ряда пенициллинов (пиперациллин, азлоциллин, тикарциллин, карбенициллин и оксациллин), проявляющих различный по выраженности антибактериальный эффект в отношении тестерного штамма *C. violaceum* CV026, в краевых зонах, окружающих площади полного подавления бактериального роста, зафиксированы QS-стимулирующие эффекты, заключающиеся в индукции биосинтеза пигмента виолацеина (Рисунок 16а-в).

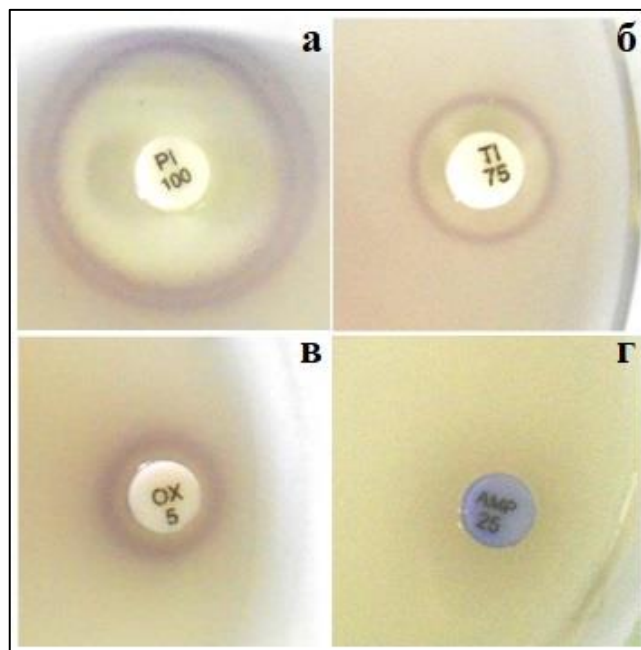


1 – бензилпенициллин 2 U/диск; 2 – бензилпенициллин 10 U/диск; 3 – ампициллин 10 мкг/диск; 4 – ампициллин 25 мкг/диск; 5 – амоксициллин 10 мкг/диск; 6 – амоксициллин 25 мкг/диск; 7 – карбенициллин 100 мкг/диск; 8 – тикарциллин 75 мкг/диск; 9 – оксациллин 1 мкг/диск; 10 – оксациллин 5 мкг/диск; 11 – азлоциллин 75 мкг/диск; 12 – пиперациллин 100 мкг/диск

Рисунок 15 – Выраженность антибактериального (а) и QS-стимулирующего (б) эффектов антибиотиков группы пенициллинов в зависимости от температуры культивирования

Площадь подобных кольцевидных зон пигментации варьировала от 233 до 743 мм², при этом существенной особенностью являлось их проявление только в субоптимальных для роста *S. violaceum* CV026 диапазоне температур: от 17°C до 22°C с полным исчезновением подобного эффекта при увеличении температуры культивирования до 27-37°C (Рисунок 15б). Отдельным наблюдением являлось развитие сине-фиолетовой пигментации диска с ампициллином (25 мкг/диск) на неизменном бактериальном газоне в отсутствие подобного эффекта при

снижении содержания этого антибиотика до 10 мкг/диск, что также регистрировалось в неоптимальном для роста тестерного штамма диапазоне температур.



а, б – синтез пигмента виолацеина на границе зоны подавления роста *C. violaceum* CV026 пиперациллином 100 мкг/диск и тикарциллином 75 мкг/диск; в – синтез пигмента вокруг диска с оксациллином (5 мкг/диск); г – изменение цвета диска с ампициллином (25 мкг/диск)

Рисунок 16 – Примеры QS-стимулирующего эффекта антибиотиков группы пенициллинов

Сопоставление наличия и выраженности оцениваемых эффектов продемонстрировало существование положительной корреляционной взаимосвязи в паре «антибактериальная активность – индукция биосинтеза виолацеина» ($r = 0,82$; $P < 0,05$), что позволяет рассматривать их как взаимодополняющие проявления биологической активности антибиотиков из группы пенициллинов в отношении *C. violaceum* CV026, реализуемые при высоких (бактериостатических) и низких (субингибиторных) концентрациях.

Для доказательства роли пенициллинов как индукторов QS-зависимого биосинтеза виолацеина у *C. violaceum* CV026 была проведена серия

экспериментов, оценивающая активность продуктов ферментативной деградации данных антибиотиков смесью бета-лактамаз I и II типа (Рисунок 17).

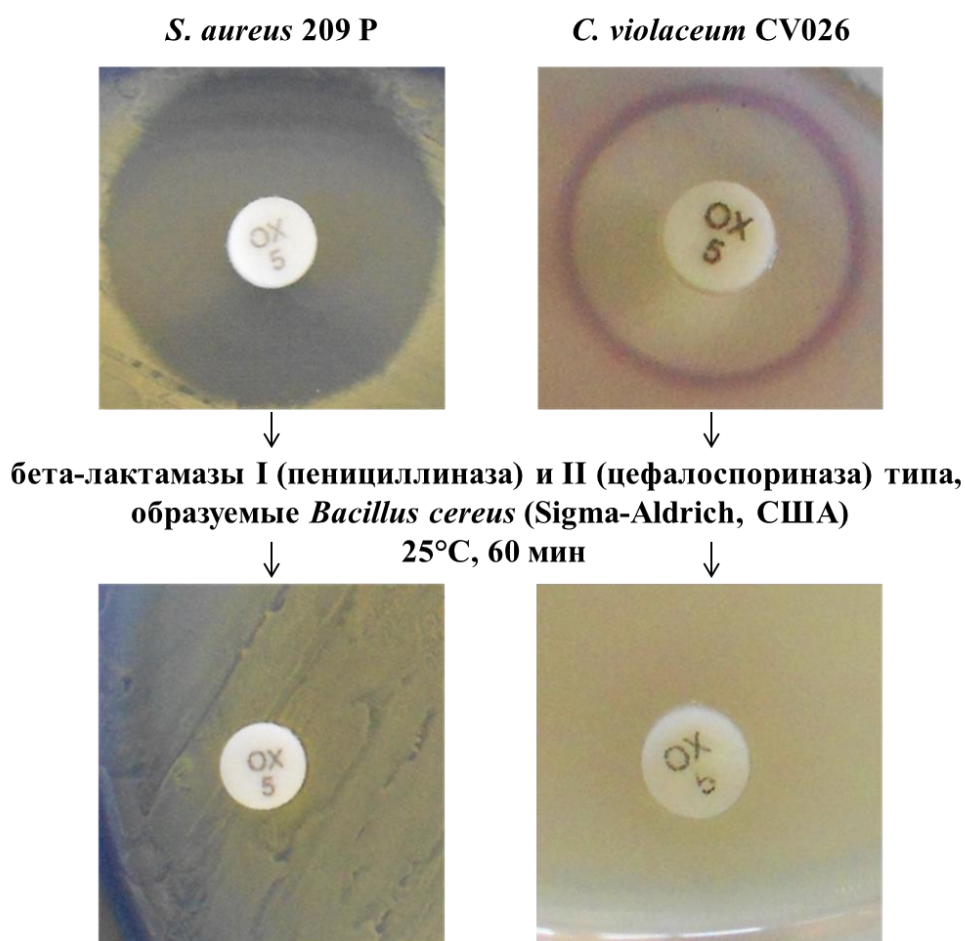


Рисунок 17 – Одновременная утрата антибактериальной и QS-стимулирующей активностей после обработки пенициллинов бета-лактамазами I и II типа

В ходе эксперимента было выявлено, что утрата их антибактериальной активности, контролируемая по отсутствию воздействия на высокочувствительный тест-штамм *S. aureus* 209 P (ATCC 6538P), сопровождалась и полным исчезновением QS-стимулирующего эффекта в отношении *C. violaceum* CV026. Тем самым полученные данные свидетельствовали в пользу идентичности материальных носителей (молекул/фрагментов молекул), необходимых для развития оцениваемых видов биологической активности.

С целью анализа значения собственной бета-лактамазной активности тестерного штамма *C. violaceum* CV026 для его реагирования на воздействие пенициллинов, активность антибиотиков была исследована в присутствии ингибиторов бета-лактамаз: сульбактама и клавулановой кислоты (Рисунок 18).

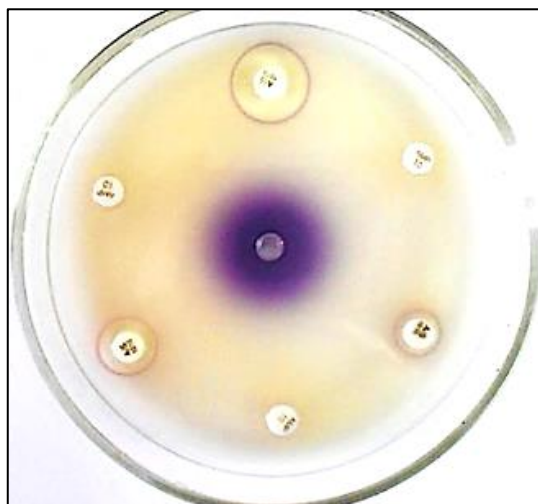


Рисунок 18 – Пример влияния антибиотиков (ампициллина) с ингибиторами пенициллиназ (сульбактам) на QS-зависимый синтез виолацеина *C. violaceum* CV026

Результаты эксперимента показали, что аминопенициллины (ампициллин в дозе 10 мкг/диск и амоксициллин в дозе 25 мкг/диск), самостоятельно не проявляющие детектируемых видов активности, в комбинации с сульбактамом (10 мкг/диск) начинали оказывать сочетанный антибактериальный и QS-индуцирующий эффекты. На этом фоне комбинация тикарциллина (75 мкг/диск) с клавулановой кислотой (10 мкг/диск) приводила к парадоксальному эффекту, заключающемуся в снижении выраженности регистрируемых эффектов в 1,36-1,44 раза, что, однако, также свидетельствовало в пользу взаимосвязи между антибактериальным и QS-стимулирующим действием данного антибиотика (Таблица 8).

Таблица 8. Изменение выраженности антибактериального и QS-стимулирующего эффектов антибиотиков из группы пенициллинов при тестировании на *C. violaceum* CV026 в присутствии ингибиторов бета-лактамаз

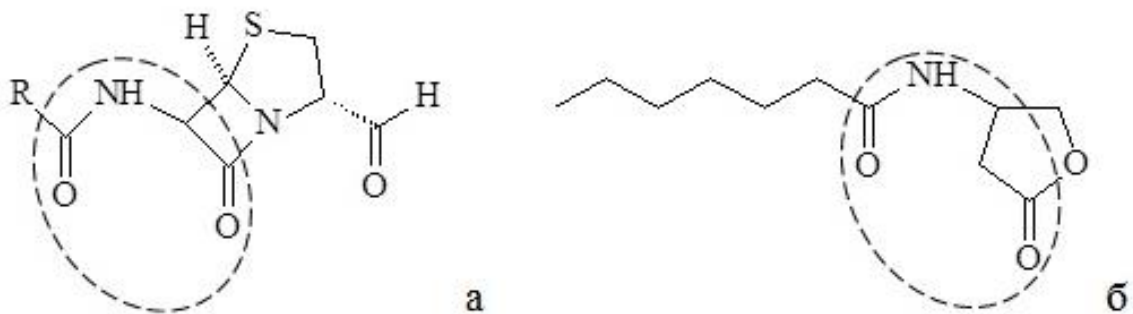
Антибиотик	Площадь зон, мм ²			
	Собственный эффект		Эффект в присутствии ингибиторов бета-лактамаз	
	Подавление роста	Стимуляция QS (индукция виолацеина)	Подавление роста	Стимуляция QS (индукция виолацеина)
Ампициллин, 10 мкг	0	0	6,4*	12,6**
Амоксициллин, 25 мкг	0	0	9,4***	14,2***
Тикарциллин, 75 мкг	17	21,2	11,8*	15,6*

Обозначения: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Таким образом, тестирование прямого рост-ингибирующего эффекта антибиотиков группы пенициллина в отношении *C. violaceum* позволило констатировать увеличение подобной активности в ряду аминопенициллины → оксациллин → карбоксипенициллины → уреидопенициллины. При этом полученные данные, согласуясь с ранее опубликованными данными о чувствительности клинических изолятов *C. violaceum* к пиперациллину и тикарциллину [119] при выраженной устойчивости к бензилпенициллину и аминопенициллинам [110, 188], существенно дополняют и систематизируют представления об особенностях антибиотикорезистентности данного бактериального вида. В свою очередь в основе разной чувствительности *C. violaceum* к различным по строению антибиотикам могли лежать как особенности его пенициллин-связывающих белков [58] так и наличие у данного микроорганизма собственных пенициллиназ (бета-лактамаз) [58, 59], ограничивающих проявление активности бензилпенициллина и аминопенициллинов.

Зарегистрированный на этом фоне QS-стимулирующий эффект субингибиторных концентраций пенициллинов, заключающийся в индукции биосинтеза пигмента виолацеина, существенно расширяет представления о

биологической активности данной группы молекул и позволяет констатировать у них информационно-коммуникационные функции. При этом, в отличие от антибиотиков, вовлеченных в систему биосинтеза белков и модулирующих систему QS через активность АГЛ-синтазы или количество воспринимающих их рецепторов [67, 128, 176, 181], антибиотики группы пенициллина наиболее вероятно реализуют прямое воздействие на систему плотностно-зависимой коммуникации, выступая в качестве АГЛ-мимикрирующих молекул. Основанием для подобного предположения является достижение индукции находящегося под строгим контролем QS пигмента виолацеина в условиях необратимой мутации гена *cvlI* у тест-штамма *C. violaceum* CV026, а также черты определенного структурного сходства молекул пенициллинов и АГЛ (Рисунок 19), допускающего их взаимодействие с одним и тем же участком рецепторного белка CviR.



Пунктиром выделены структурно близкие фрагменты данных соединений

Рисунок 19 – Структурные формулы пенициллинов (а) и C₆-АГЛ (б)

В этой связи отдельного обсуждения требует формирование подобного QS-стимулирующего эффекта пенициллина только при сниженных субоптимальных для роста *C. violaceum* температурах. Учитывая, что N-концевой домен LuxR-подобных белков, ответственный за взаимодействие с АГЛ, одновременно является мишенью для шаперонина GroEL [129], можно предполагать, что АГЛ-связывающий участок на релаксированном белке CviR (при низкой температуре в

отсутствие белков-шаперонинов) оказывается доступным для молекул пенициллинов, в то время как его стабилизация при повышении температуры как результата взаимодействия с GroEL исключает данную возможность, сохраняя мишень только для гомологичного АИ С₆-АГЛ.

Исследование эффектов бета-лактамаз и их ингибиторов позволило дополнительно подтвердить единство материальных носителей антибактериального и QS-регулирующего эффектов. Так ферментативная деградация пенициллинов полностью исключала оба эффекта, а блокирование собственных бета-лактамаз *C. violaceum* CV026, напротив, восстанавливало его чувствительность к антибактериальному и АГЛ-мимикрирующему действию аминопенициллинов (ампициллина и амоксициллина), самостоятельно не проявляющих подобных эффектов.

Тем самым полученные данные в совокупности с представлениями о частичном структурном сходстве бета-лактамов и АГЛ, а также филогенетической близости и субстратной специфичности гомосериновых лактоназ и бета-лактамаз, входящих в суперсемейство метало-бета-лактамаз [192] и осуществляющих перекрестную [143] ферментативную деградацию данных молекул, формируют представления о них не только как о факторах, вовлеченных в процессы межвидового антагонизма, но и как участниках систем видонеспецифической химической коммуникации.

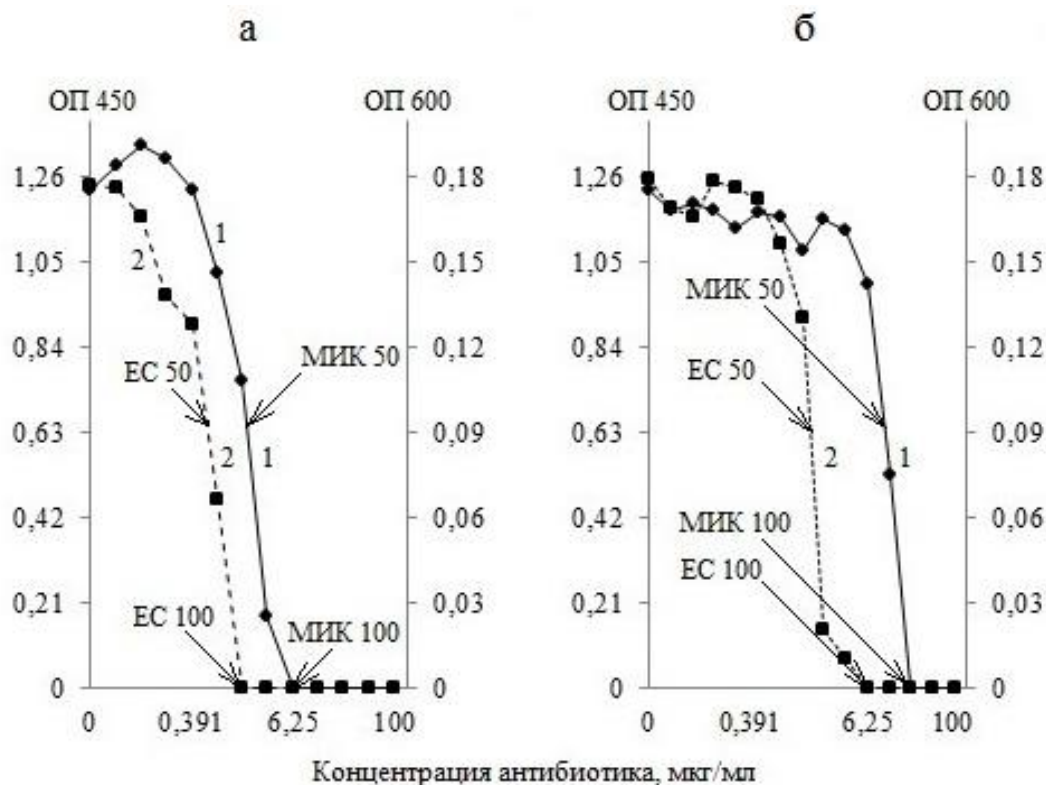
При этом биологическая целесообразность восприятия субингибиторных концентраций пенициллинов в качестве индукторов системы QS *C. violaceum* в естественных условиях существования (почве) может определяться запуском адаптивной реакции данного микроорганизма, даже в условиях низкой плотности бактериальной популяции останавливающего деление и начинающего образование биопленки, что в совокупности повышает его устойчивость к более высоким концентрациям антибиотика.

3.2 Характеристика QS-модулирующего эффекта тетрациклинов и аминогликозидов с исследованием воздействия этих антибиотиков на синтез автоиндуктора C₆-АГЛ у *C. violaceum*

Анализ воздействия тетрациклинов и аминогликозидов на рост и QS-зависимый биосинтез виолацеина у дикого штамма C. violaceum ATCC 31532. Предварительное тестирование тетрациклинов и аминогликозидов в отношении дикого штамма *C. violaceum* ATCC 31532 на плотных питательных средах позволило зарегистрировать формирование выраженных депигментированных ореолов вокруг дисков с данными антибиотиками, что указывало на проявление ими QS-ингибирующего эффекта. В свою очередь культивирование *C. violaceum* ATCC 31532 в жидкой питательной среде в присутствии широкого диапазона концентраций тетрациклинов и аминогликозидов позволило дать четкую количественную оценку воздействия названных антибиотиков на рост и QS-зависимый биосинтез виолацеина, охарактеризовав их значениями МИК₁₀₀ и МИК₅₀, ЕС₁₀₀ и ЕС₅₀. Графики, описывающие типичные дозозависимые эффекты антибиотиков (на примерах доксициклина и амикацина), представлены на Рисунке 20, а количественные характеристики для всех исследованных антибиотиков приведены в Таблице 9.

Таблица 9. Концентрации тетрациклинов и аминогликозидов (мкг/мл), обуславливающие подавление роста и QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum* ATCC 31532

Антибиотики	Концентрации, ингибирующие рост, мкг/мл		Концентрации, ингибирующие QS-активность, мкг/мл	
	МИК ₁₀₀	МИК ₅₀	ЕС ₁₀₀	ЕС ₅₀
Тетрациклин	3,13	1,01	0,39	0,27
Доксициклин	6,25	1,87	1,56	0,75
Канамицин	100	64	6,25	1,80
Гентамицин	50	8	3,13	0,18
Амикацин	25	11,6	6,25	1,07



1 (сплошная линия) – оптическая плотность биомассы (ОП₄₅₀), ось ординат слева;
 2 (пунктирная линия) – оптическая плотность пигмента (ОП₆₀₀), ось ординат справа;
 значения МИК₅₀ и МИК₁₀₀, характеризующие подавление роста бактериальной культуры на 50% и 100% от контрольных значений, а также ЕС₅₀ и ЕС₁₀₀, характеризующие аналогичное по выраженности подавление биосинтеза пигмента виолацеина, указаны стрелками

Рисунок 20 – Пример влияния тетрациклинов (на примере доксициклина гидрохлорида – а) и аминогликозидов (на примере амикацина сульфата – б) на рост и пигментообразование *S. violaceum* ATCC 31532

Полученные результаты свидетельствовали о достаточно высокой чувствительности *S. violaceum* ATCC 31532 к тетрациклину (МИК₁₀₀=3,13 мкг/мл) и доксициклину (МИК₁₀₀=6,25 мкг/мл) при меньшей ростиингибирующей активности аминогликозидов, возрастающей в ряду (МИК₁₀₀): канамицин (100 мкг/мл) → гентамицин (50 мкг/мл) → амикацин (25 мкг/мл).

Одновременно было установлено, что все исследуемые антибиотики в субингибиторных концентрациях подавляли QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина, хотя выраженность эффекта для тетрациклинов и аминогликозидов

была различной. Так, соотношение концентраций, обуславливающих полное подавление роста (MIK_{100}) и пигментообразования (EC_{100}) составляло 4-8 в группе тетрациклинов и достигло 16 при использовании аминогликозидов – канамицина и гентамицина. Соотношение MIK_{50}/EC_{50} , наиболее полно характеризующее диапазон концентраций антибиотиков, вызывающих подавление QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина в отсутствие рост-ингибирующего эффекта, было на уровне 2,5-3,7 в группе тетрациклинов и составляло до 10,8-44,4 в группе аминогликозидов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии у исследуемых антибиотиков двух видов биологической активности: рост-ингибирующей, характерной для их высоких концентраций, и QS-регулирующей, проявляющейся при более низких концентрациях, недостаточных для подавления роста бактерий. При этом в отношении *C. violaceum* ATCC 31532 тетрациклины и аминогликозиды характеризовались альтернативным балансом регистрируемых активностей: у первых превалировал прямой антибактериальный эффект, в то время как вторые демонстрировали максимально широкие диапазоны субингибиторных концентраций, обуславливающих подавление QS-зависимого биосинтеза виолацеина.

Аттестация сенсорных штаммов C. violaceum CV026 и E. coli pAL103.

Совокупность полученных результатов определила задачу изучения возможных механизмов действия субингибиторных концентраций антибиотиков, как модуляторов синтеза и рецепции химических сигналов, опосредующих систему плотностно-зависимой коммуникации. Для решения задачи использовали сенсорные штаммы *C. violaceum* CV026 и *E. coli* pAL103, реагирующие образованием пигмента виолацеина или развитием свечения (билюминесценции) на присутствие АИ C_6 -АГЛ, образуемого диким штаммом *C. violaceum* ATCC 31532.

Адекватность использования *C. violaceum* CV026 и *E. coli* pAL103 для заявленных целей была подтверждена в предварительных экспериментах определения их ответа на химически синтезированный C_6 -АГЛ в концентрациях

от 10^{-4} до 10^{-8} М, а также на смеси данного соединения с тестируемыми антибиотиками в концентрациях от 100 мкг/мл до 0,05 мкг/мл. Полученные результаты свидетельствовали о высоких аналитических характеристиках биосенсора *C. violaceum* CV026, обладающего гомологичным рецепторным белком CviR и реагирующего образованием пигмента виолацеина на присутствие C_6 -АГЛ в концентрациях от 10^{-8} М и выше с достижением максимально выраженного отклика при концентрации $3,13 \times 10^{-6}$ М. С другой стороны, индукция свечения *E. coli pAL103* инициировалась в присутствии в 20-80 раз более высоких концентраций, что можно отметить сниженной афинностью клонированного в нем рецепторного белка LuxR, в естественных условиях воспринимающего C_6 -оксо-АГЛ, а в использованном нами экспериментальном контексте – его структурный гомолог C_6 -АГЛ.

Параллельно проведенное тестирование смесей « C_6 -АГЛ + антибиотик» демонстрировало несущественные отклонения регистрируемых значений пигментообразования *C. violaceum* CV026 (при использовании аминогликозидов) и биолюминесценции *E. coli pAL103* (при использовании тетрациклинов) относительно аналогичных концентраций C_6 -АГЛ.

Таким образом, было констатировано отсутствие искажающего воздействия антибиотиков на результаты количественной детекции C_6 -АГЛ, что гарантировало адекватность их использования для определения концентрации внеклеточного C_6 -АГЛ, синтезируемого диким штаммом *C. violaceum* ATCC 31532 в присутствии субингибиторных концентраций антибиотиков. Одновременно эти же результаты составили систему внутренних контролей, позволяющих конвертировать значения пигментообразования *C. violaceum* CV026 и биолюминесценции *E. coli pAL103* в абсолютные значения концентраций АИ C_6 -АГЛ в основной серии экспериментов.

Оценка воздействия тетрациклинов и аминогликозидов на накопление внеклеточного C_6 -АГЛ в культуре *C. violaceum* ATCC 31532. Аттестованные биосенсоры *C. violaceum* CV026 и *E. coli pAL103* были использованы для количественной оценки внеклеточного C_6 -АГЛ, накапливающегося в культурах

дикого штамма *C. violaceum* ATCC 31532 в обычных условиях, а также в присутствии субингибиторных концентраций тестируемых антибиотиков. Было показано, что содержание анализируемого индуктора плотностно-зависимой коммуникации в пересчете на 1 единицу оптической плотности выросших культур сенсорных штаммов в контрольных образцах через 24 ч культивирования составило 1,3 мкМ для штамма *E. coli pAL103* (по интенсивности индукции биолюминесценции) и 68,1 мкМ для штамма *C. violaceum* CV026 (по интенсивности индукции пигмента виолацеина).

Результаты количественного анализа внеклеточных АИ, образуемых *C. violaceum* ATCC 31532 в присутствии субингибиторных концентраций тетрациклинов, свидетельствовал о неоднозначном характере их эффекта на индукцию синтеза С₆-АГЛ и его накопление в среде культивирования (Таблица 10).

Так, наиболее близкие к МИК концентрации тетрациклина (0,8-1,56 мкг/мл) и доксициклина (1,56-3,13 мкг/мл) приводили к умеренному снижению содержания АИ: до 42-83% от контрольных значений. Последующее уменьшение концентраций антибиотиков сопровождалось парадоксальным накоплением внеклеточного С₆-АГЛ, содержание которого достигало 130%-146% по сравнению с контролем. Таким образом, развивающийся в присутствии субингибиторных концентраций тетрациклинов в диапазоне от 1/2 до 1/16 МИК эффект имел двухфазный дозозависимый характер с выраженными снижением и повышением концентраций внеклеточного АИ, потенциально определяемым соотношением интенсивностей его синтеза и потребления из среды культивирования.

В свою очередь, анализ культуральной жидкости штамма *C. violaceum* ATCC 31532, выращенного в присутствии антибиотиков группы аминогликозидов в диапазоне от 1/2 до 1/4 МИК, не выявил их индуцирующего воздействия на синтез АИ сенсорным штаммом *C. violaceum* CV026, количество С₆-АГЛ в этих образцах характеризовалось нулевыми значениями (Таблица 10).

Таблица 10. Влияние тетрациклинов и аминогликозидов на продукцию C_6 -АГЛ *S. violaceum* ATCC 31532

Концентрация антибиотика, мкг/мл	Концентрация C_6 -АГЛ в образце: в числителе - мкМ в пересчете на 1 ед. ОП450; в знаменателе – в % от контрольных значений				
	Тетрациклин	Доксициклин	Канамицин	Гентамицин	Амикацин
Контроль	<u>1,30</u> 100,0	<u>1,30</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0
0,05	<u>1,30</u> 100,0	<u>1,30</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>67,21</u> 98,0
0,10	<u>1,30</u> 100,0	<u>1,30</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0
0,20	<u>1,50</u> 115,0	<u>1,30</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0
0,40	<u>1,90</u> 146,0	<u>1,43</u> 110,0	<u>62,03</u> 91,0	<u>66,71</u> 98,0	<u>54,52</u> 79,0
0,80	<u>0,97</u> 74,0	<u>1,69</u> 130,0	<u>60,75</u> 89,2	<u>68,10</u> 100,0	<u>2,72</u> 4,0
1,56	<u>0,56</u> 42,0	<u>1,08</u> 83,0	<u>58,63</u> 86,0	<u>2,04</u> 3,0	<u>2,04</u> 3,0
3,13	н/р	<u>0,60</u> 46,0	<u>58,63</u> 86,0	<u>1,36</u> 2,0	<u>0,68</u> 1,0
6,25	н/р	н/р	<u>22,52</u> 33,0	<u>0,54</u> 0,8	<u>0</u> 0
12,50	н/р	н/р	<u>2,04</u> 3,0	<u>0</u> 0	<u>0</u> 0
25,00	н/р	н/р	<u>0,34</u> 0,5	<u>0</u> 0	н/р
50,00	н/р	н/р	<u>0</u> 0	н/р	н/р
100,00	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р

Примечание: н/р – отсутствие роста

Дальнейшее снижение концентраций канамицина с 50 до 1,56 мкг/мл, гентамицина с 25 до 0,8 мкг/мл и амикацина с 12,5 до 0,2 мкг/мл сопровождалось постепенным восстановлением синтеза внеклеточного C_6 -АГЛ у сенсорного штамма до 95-100% от контрольных значений. Таким образом, полученные результаты позволили констатировать, что действие аминогликозидов в широком диапазоне их субингибиторных концентраций (до 1/32 – 1/64 МИК) связано с

выраженным подавлением биосинтеза АИ, в условиях дефицита которого двухкомпонентная система QS у *C. violaceum* ATCC 31532 перестает функционировать.

Предполагаемый механизм QS-модулирующего эффекта тетрациклинов (на примере доксициклина) и аминогликозидов (на примере канамицина) был дополнительно проанализирован на примере четырех клинических изолятов *P. aeruginosa*, способность которых к образованию N-бутирил-L-гомосерин лактона (C₄-АГЛ) предварительно показана с использованием сенсорного штамма *E. coli pAL101* с клонированным геном *rhlR*, продукт которого рецептирует C₄-АГЛ и запускает транскрипцию кассеты *luxCDABE* генов с развитием свечения (биолюминесценции) (Рисунок 21).

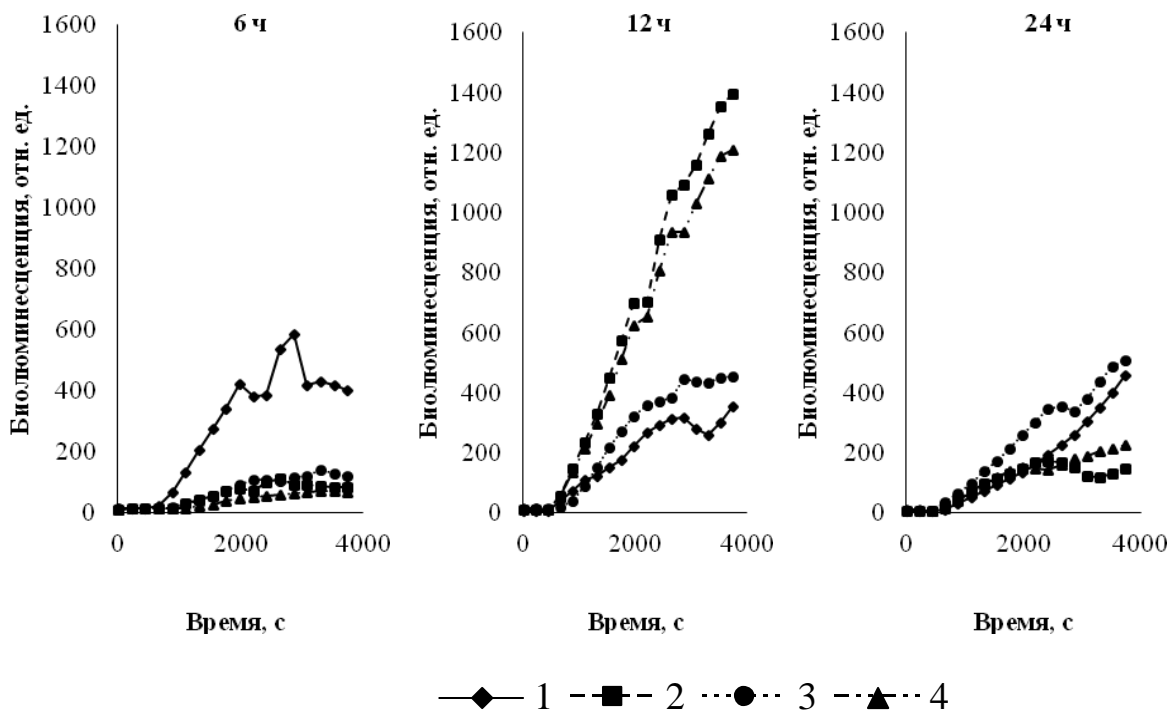


Рисунок 21 – Динамика биолюминесценции *E. coli pAL101* в присутствии супернатантов *P. aeruginosa* (1-4) через 6, 12 и 24 часа культивирования соответственно

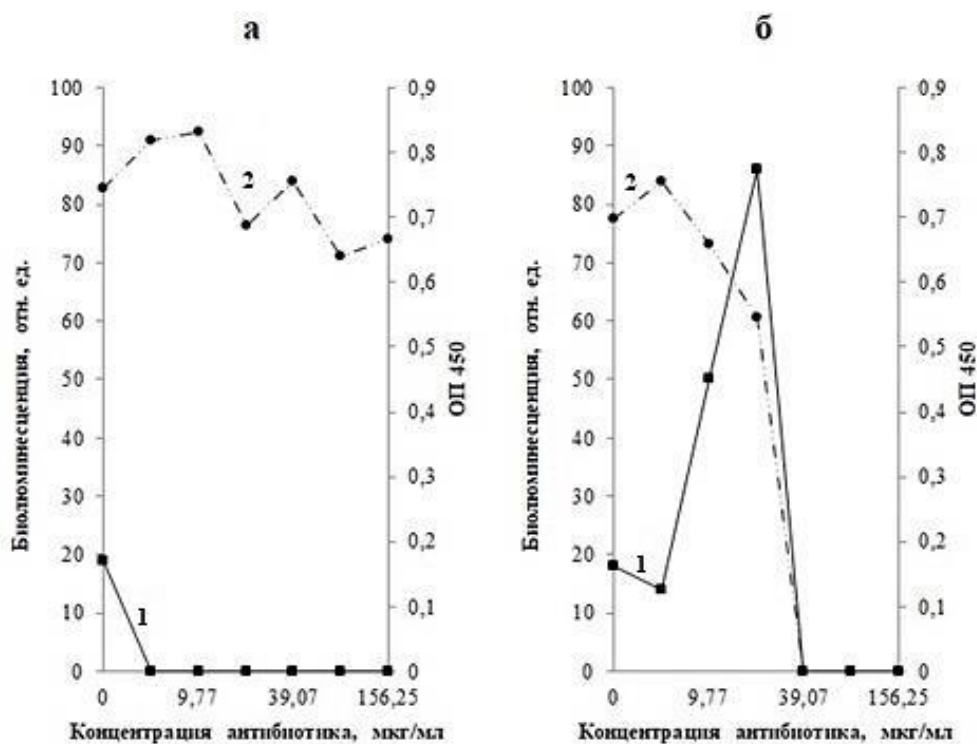
Так максимум продукции C_4 -АГЛ приходился на 12 час культивирования, после чего содержание данного АИ существенно снижалось, вероятно, вследствие его восприятия и утилизации клетками *P. aeruginosa*, достигшими плотности популяции, достаточной для развития эффекта QS.

Другим результатом предварительной серии экспериментов явилась констатация отсутствия искажающего воздействия аминогликозидов и тетрациклинов на результат восприятия C_4 -АГЛ сенсорным штаммом *E. coli pAL101*. Во-первых, исследованные антибиотики в использованном диапазоне концентраций самостоятельно не вызывали индукции билюминесценции, а во-вторых, смеси антибиотиков с химически чистым C_4 -АГЛ существенно не изменяли характера реакции сенсорного штамма на данный препарат.

Последующее определение зависимости билюминесцентного отклика *E. coli pAL101* супернатантов *P. aeruginosa*, выращенных в контакте с канамицином и доксициклином, позволило констатировать различный характер воздействия данных антибиотиков на достигаемое содержание внеклеточного C_4 -АГЛ. Так канамицин, не проявивший выраженного ингибирующего эффекта на рост *P. aeruginosa*, привел к полному подавлению образования АИ, с использованием *E. coli pAL101* не обнаруженного ни в одном из супернатантов во всем исследованном диапазоне концентраций этого антибиотика (Рисунок 22а). Напротив, доксициклин, в отношении тестируемого штамма *P. aeruginosa* характеризуемый значением МИК на уровне 39,07 мг/мл (рисунок 22б), напротив, обуславливал повышенное присутствие C_4 -АГЛ во всех анализируемых супернатантах, что свидетельствовало об избыточном накоплении АИ в среде культивирования.

Анализ полученных результатов свидетельствовал о том, что представители двух групп антибиотиков (аминогликозидов и тетрациклинов), имеющих одну и ту же мишень (малую 30S субъединицу бактериальной рибосомы), в экспериментальных условиях оказывают разнонаправленное воздействие на систему QS у клинических изолятов *P. aeruginosa*. При этом в присутствии канамицина в широком диапазоне концентраций зарегистрировано

выраженное подавление продукции C_4 -АГЛ, что в качестве мишени воздействия данного антибиотика позволяет предполагать систему биосинтеза АИ. В свою очередь эффектом доксициклина являлось накопление внеклеточного C_4 -АГЛ в среде культивирования выше контрольных значений, что может указывать на нарушение восприятия этого АИ бактериальными клетками-мишенями.



- 1 – интенсивность индукции биолоуминесценции *E. coli pAL101* при использовании супернатантов культуры *P. aeruginosa*, выросшей на среде с антибиотиком;
 2 – оптическая плотность культуры *P. aeruginosa* при росте на среде с антибиотиком

Рисунок 22 – Пример воздействия канамицина (а) и доксициклина (б) на рост и образование C_4 -АГЛ клиническим изолятом *P. aeruginosa*

Подводя итог всему вышесказанному, можно сказать, что тестирование прямого рост-ингибирующего эффекта тетрациклинов и аминогликозидов продемонстрировало их активность в отношении коллекционного штамма *S. violaceum* ATCC 31532, что согласуется с данными об эффективности этих антибиотиков против клинических изолятов *S. violaceum* [223]. При этом была

показана на порядок более высокая чувствительность исследуемого штамма к тетрациклину и доксициклину, а также увеличение активности аминогликозидов в ряду канамицин → гентамицин → амикацин, что дополняет и детализирует представления об уровнях их прямого антибактериального эффекта в отношении использованного модельного микроорганизма.

Оценка субингибиторных концентраций исследуемых антибиотиков позволила расширить представления об их биологической активности, демонстрацией их ингибирующего воздействия на QS-зависимое образование пигмента виолацеина у дикого штамма *S. violaceum* ATCC 31532, которое контролируется плотностно-зависимой двухкомпонентной системой CviI/CviR с химическим посредником C₆-АГЛ, и ингибированием биосинтеза C₄-АГЛ у клинических изолятов *P. aeruginosa*. Таким образом, в продолжающейся дискуссии о направленности эффектов различных антибиотиков на опосредуемые АГЛ системы QS у бактерий, полученные данные можно рассматривать как аргумент в пользу анти-QS активности тетрациклинов и аминогликозидов, что согласуется с полученными на других моделях данными об аналогичной активности доксициклина [92] и аминогликозидного антибиотика тобрамицина [21]. При этом новизна полученного в настоящем исследовании результата заключается в выявлении достаточно широкого диапазона концентраций аминогликозидов, вызывающих количественно различное ингибирование системы QS в отсутствие прямого антибактериального эффекта (значения EC₅₀ были меньше МИК₅₀ в 10,8-4,4 раза), в то время как у тетрациклинов концентрации, обуславливающие 50% подавление роста и ингибирование биосинтеза виолацеина, отличались не более чем в 2,5-3,7 раза.

Биологическая целесообразность анти-QS эффекта субингибиторных концентраций тетрациклинов и аминогликозидов, ранее рассматриваемых только в качестве агентов межвидового антагонизма в естественных условиях существования их продуцентов, может определяться, как минимум, двумя основными моментами. Во-первых, учитывая важную роль систем QS в индукции образования антибиотиков у *E. carotovora* [210], *S. plymuthica* [127],

B. thailandensis [54] и ряда других, в том числе почвенных бактерий, QS-ингибирующий эффект субингибиторных концентраций образуемых стрептомицетами тетрациклинов и аминогликозидов, может рассматриваться в качестве меры предотвращения возможного «ответного удара» по ним со стороны других компонентов микробиоценоза. Во-вторых, принимая во внимание QS-зависимый характер образования биопленок, в которых бактериальные клетки существенно снижают свою чувствительность к антибиотикам [11], QS-ингибирующее действие субингибиторных концентраций тетрациклинов и аминогликозидов можно рассматривать в качестве механизма, «запрещающего» переход соседствующих со стрептомицетами микроорганизмов в биопленкообразующий фенотип и, тем самым, сохраняющих их чувствительность к факторам межмикробного антагонизма.

Практически-ориентированный аспект полученных результатов заключается в обосновании использования тетрациклинов и аминогликозидов для борьбы с бактериальными патогенами растений, животных и человека, которые используют опосредуемые АГЛ двухкомпонентные системы QS для образования биопленок и индукции своего патогенного потенциала. Ранее аналогичные соображения были сформулированы в отношении аминогликозидного антибиотика тобрамицина, используемого самостоятельно или в комбинации с малыми молекулами, синергетически ингибирующими систему QS и, тем самым, повышающими чувствительность бактериальной популяции к действию антибиотика [36]. Проведённое исследование распространяет эти представления на более широкий спектр антибиотиков, среди которых аминогликозиды представляют больший интерес по сравнению с тетрациклинами. Обоснованием этого предпочтения является описанное выше действие широкого диапазона субингибиторных концентраций канамицина, гентамицина и амикацина, обуславливающих выраженное подавление QS-зависимого образования пигмента виолацеина, что свидетельствует о специфической биологической активности аминогликозидов, заключающейся в выраженном угнетении биосинтеза C_6 -АГЛ – АИ двухкомпонентной системы CviI/CviR у *C. violaceum* ATCC 31532.

Соответственно, обусловленная действием аминогликозидов блокада ранних этапов автоиндукции синтеза плотностных регуляторов позволяет не только предупреждать развитие эффекта QS у бактериальных патогенов, но и избегать других нежелательных эффектов АГЛ, в том числе связанных с цитотоксическим действием в отношении эукариотических клеток [187] или негативным влиянием на функциональную активность клеточных эффекторов иммунитета [3].

3.3 Поиск возможностей усиления QS-модулирующего эффекта антибиотиков при их комбинированном использовании с неорганическими и органическими соединениями различного механизма действия

Полученные результаты сформировали основу для решения итоговой задачи, связанной с возможностью потенцирования QS-ингибирующего эффекта аминогликозидов (на примере амикацина) при его сочетании с химическими соединениями, проявляющими иные механизмы подавления химической коммуникации у бактерий.

*Оценка воздействия АУ на рост и систему QS *C. violaceum* ATCC 31532 и его комбинирование с амикацином с целью усиления QS-ингибирующей активности.* В качестве первого из подобных соединений был выбран фармакопейный препарат АУ, обладающий высокой сорбционной активностью в отношении широкого круга органических соединений, а в рамках проведённого исследования тестированный на способность к сорбции АГЛ. Количественная характеристика подобной активности была дана в отдельной серии экспериментов, предусматривающей контакт фиксированных количеств С₆-оксо-АГЛ или С₆-АГЛ с навесками АУ в статических условиях с последующим отделением супернатантов и их оценкой в биотесте на рекомбинантном штамме *E. coli pAL103*, отвечающем дозозависимым свечением на присутствие в среде культивирования АГЛ с шестью атомами углерода в ацильной цепи.

Анализ биолюминесценции сенсорного штамма *E. coli pAL103* в присутствии модельного индуктора плотностно-зависимой коммуникации – С₆-оксо-АГЛ свидетельствовал о выраженной дозозависимой стимуляции

бактериального свечения в диапазоне от 10^{-7} до 10^{-4} М, формирующем основу для количественной оценки остаточных количеств АГЛ после его сорбции на АУ (Рисунок 23).

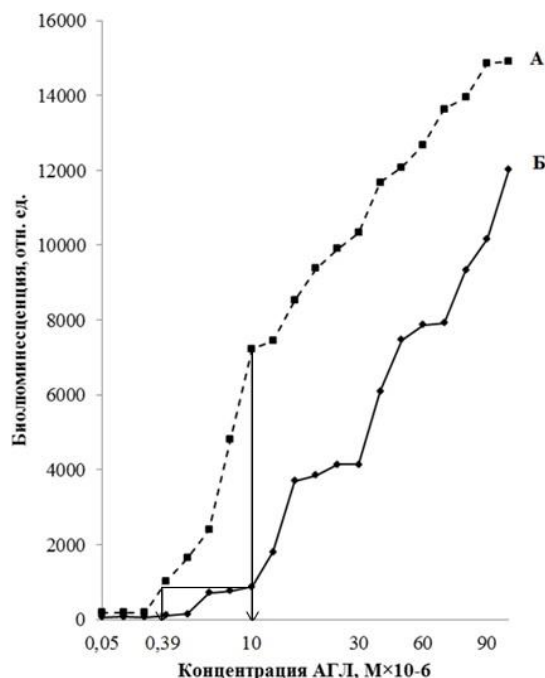


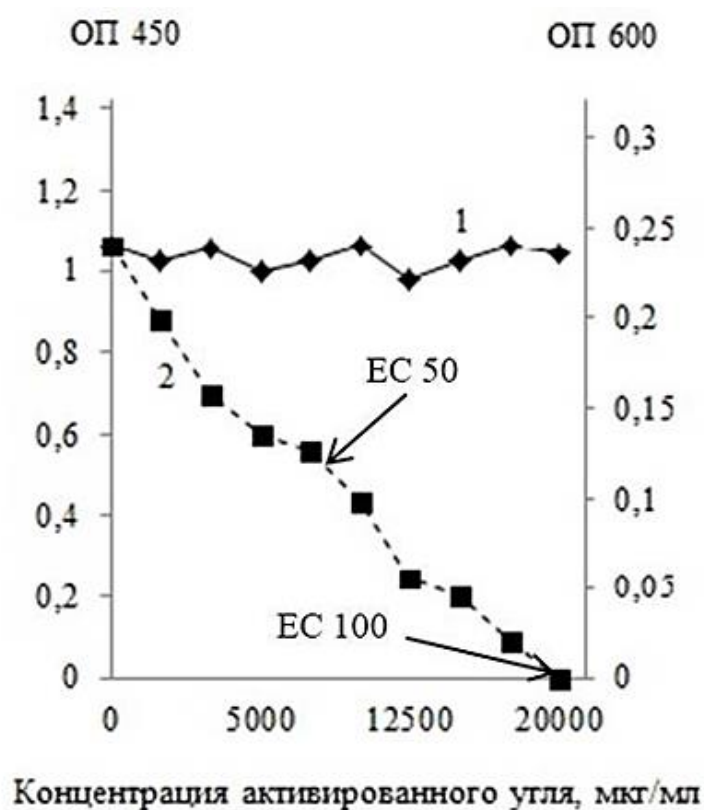
Рисунок 23 – Пример индукции биоломинесценции *E. coli pAL103* в присутствии исходных растворов различных концентраций C_6 -оксо-АГЛ (А) и тех же растворов после сорбции на АУ (Б). С помощью стрелок показана схема расчета равновесной концентрации АГЛ в супернатанте с исходной концентрацией 10^{-5} М

Исследование кинетики сорбции в статических условиях позволило установить, что основной эффект извлечения АГЛ из раствора достигается в течение первых 60 мин, после которых значения равновесных концентраций сорбтива не претерпевали существенных изменений при увеличении продолжительности контакта до 120-240 мин.

Расчет значения сорбционной емкости АУ составил $(9 \pm 0,8) \times 10^{-9}$ мг/мг, что соответствует возможности сорбции $5,6 \times 10^{-5}$ М C_6 -оксо-АГЛ на 1 мг АУ.

Оценка сорбционной активности АУ в отношении C_6 -АГЛ, синтезируемого *S. violaceum* ATCC 31532 (Рисунок 24), показала, что данное соединение не

оказывало детектируемого воздействия на рост тестерного штамма, но в концентрации 8534,67 мкг/мл снижало продукцию виолацеина до 50% от контрольных значений, а в дозе 20000 мкг/мл полностью подавляло QS-зависимый биосинтез пигмента (Таблица 11). Остаточные количества С₆-АГЛ после сорбции фиксировали при помощи *E. coli pAL103*. При этом четкий дозозависимый биолюминесцентный отклик данного тестерного штамма позволил рассчитать равновесные концентрации С₆-АГЛ при его сорбции на АУ и охарактеризовать его сорбционную емкость (qE) величиной $(11 \pm 0,9) \times 10^{-9}$ мг/мг.



по оси абсцисс – концентрация АУ (мкг/мл); по оси ординат слева, сплошная линия на графиках (1) – оптическая плотность биомассы (ОП₄₅₀); по оси ординат справа, пунктирная линия на графиках (2) – оптическая плотность пигмента (ОП₆₀₀)

Рисунок 24 – Воздействие АУ на рост и QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина в культуре *C. violaceum* ATCC 31532

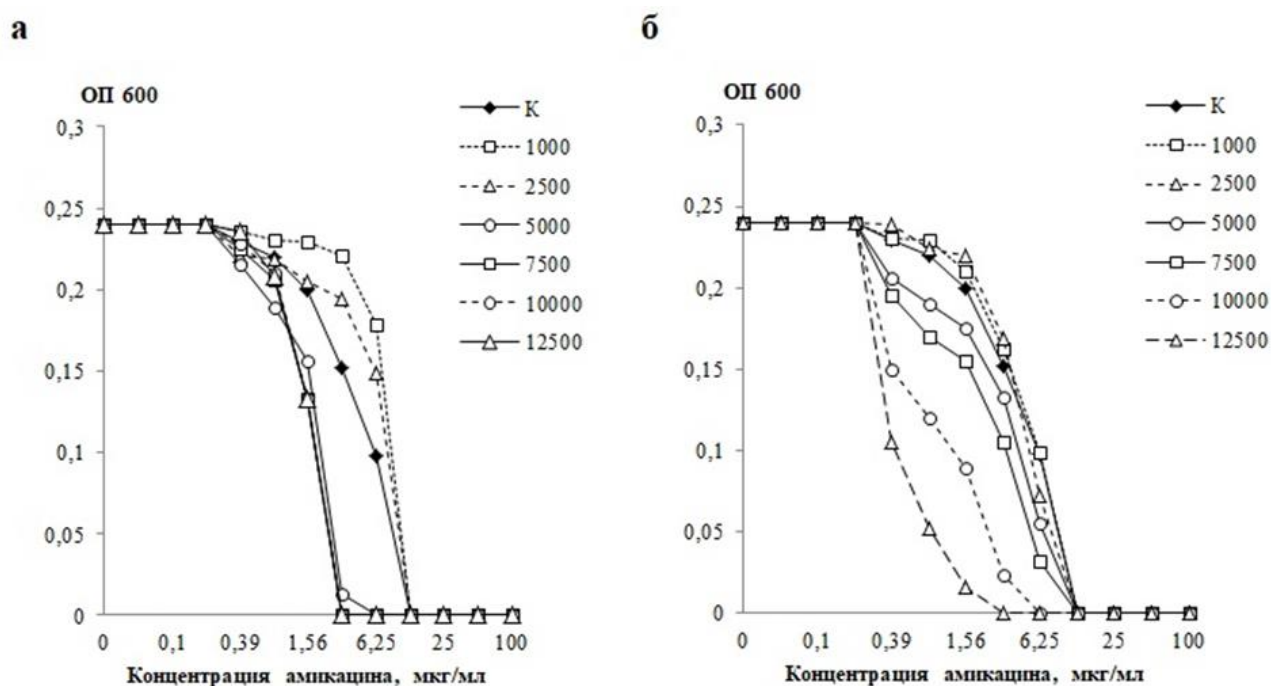
Таблица 11 – Действие АУ, пирогаллола и кумарина (мкг/мл) на рост и QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина культурой *C. violaceum* ATCC 31532

Действующие соединения	Характеристики антибактериальной активности, мкг/мл		Характеристики анти-QS активности, мкг/мл		Вероятный анти-QS механизм
	МИК ₁₀₀	МИК ₅₀	ЕС ₁₀₀	ЕС ₅₀	
АУ	-	-	20000	8534,67	Сорбция С ₆ -АГЛ
Пирогаллол	157,64	85,38	19,71	13,5	Нарушение восприятия С ₆ -АГЛ
Кумарин	365,38	182,69	182,69	136	

На следующем этапе тестирование композиций амикацина и АУ проводили в панелях стеклянных емкостей 8×12, в которые двукратные разведения названных соединений вносили в перпендикулярных друг другу направлениях, формируя различные соотношения действующих компонентов. Результаты подобного исследования заставили констатировать, что одновременное присутствие в среде культивирования антибиотика и сорбента неоднозначно сказывается на их совместной биологической активности в отношении *C. violaceum* ATCC 31532. Так эффект композиций с содержанием АУ 1000-2500 мкг/мл заключался в смещении кривых дозозависимого эффекта амикацина в сторону более высоких концентраций антибиотика, т.е. снижении анти-QS активности последнего (Рисунок 25а).

В свою очередь комбинации с содержанием АУ от 5000 мкг/мл и более обеспечивали эффективное подавление QS-зависимого биосинтеза виолацеина при более низких концентрациях амикацина в сравнении с соответствующим контролем. Интегральная оценка полученного результата с использованием изоболографического анализа (Рисунок 26а) показала смещение большинства индексов комбинированного воздействия выше прямой, соединяющей значения ЕС₅₀ только для амикацина (8,24 мкг/мл) и АУ (8534,67 мкг/мл), что характеризовало действие этих компонентов как инфрааддитивное. На этом фоне единственным исключением являлась комбинация 3,54 мкг/мл антибиотика и

4738,52 мкг/мл сорбента, при изоболографическом анализе оцениваемая как аддитивная, когда действие компонентов суммируется, а индекс комбинированного воздействия расположен на линии изоболы.

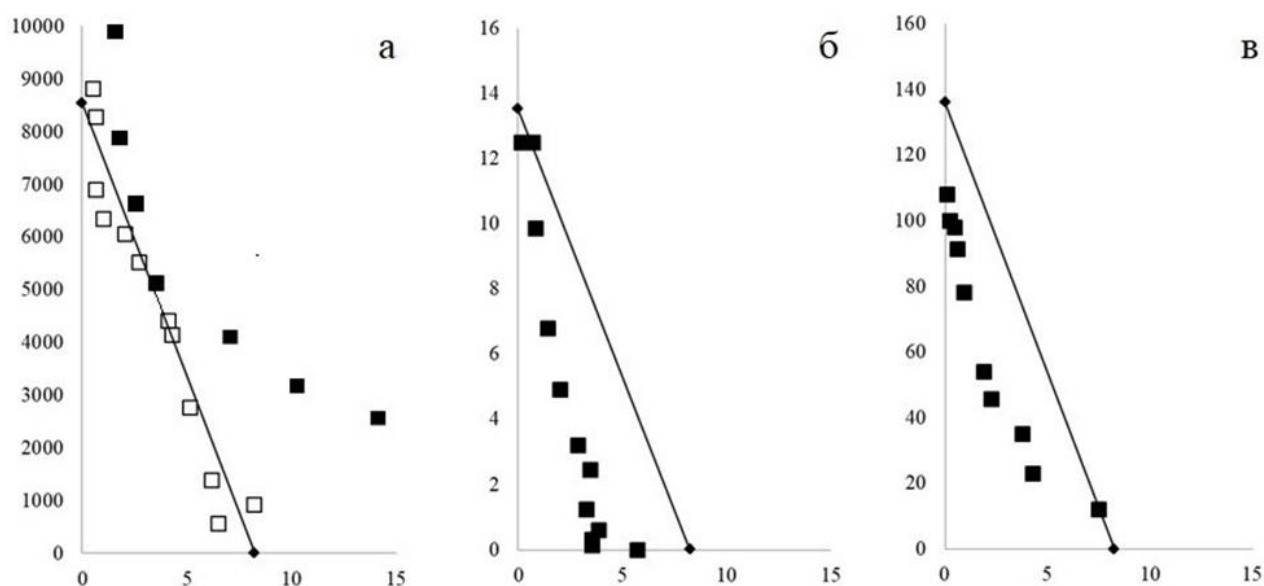


по оси абсцисс – концентрации амикацина (мкг/мл); по оси ординат – оптическая плотность пигмента виолацеина (ОП₆₀₀). Концентрации АУ, использованные в композициях с амикацином, и их обозначения на графиках приведены на полях рисунков

Рисунок 25 – Совместные эффекты амикацина с АУ (а – при одновременном; б – при последовательном использовании), в отношении QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина у *S. violaceum* ATCC 3153

При анализе причин обнаруженного эффекта рассмотрена возможность сорбции амикацина на частицах АУ, изменяющей биодоступную концентрацию антибиотика в среде культивирования. Дизайн соответствующего эксперимента предусматривал: 1) внесение исследуемых компонентов в жидкую питательную среду (как описано выше); 2) их совместную инкубацию (60 мин, $t = +25^{\circ}\text{C}$); 3) разделение частиц АУ с сорбированным антибиотиком и супернатанта с остаточными количествами амикацина; 4) оценку антимикробной активности

супернатанта в биотесте подавления роста *S. aureus* FDA 209P, проявляющего высокую чувствительность к амикацину ($\text{МИК}_{100}=12,5$ мкг/мл). В результате проведенного исследования установлено, что степень сорбционного извлечения антибиотика из среды культивирования АУ достигала 50-75%, что соответствовало 2-4 кратному увеличению МИК_{100} амикацина в отношении *S. aureus* FDA 209P.



черные квадраты – одновременное использование действующих компонентов; белые квадраты – последовательное использование (при тестировании композиции амикацина с АУ).

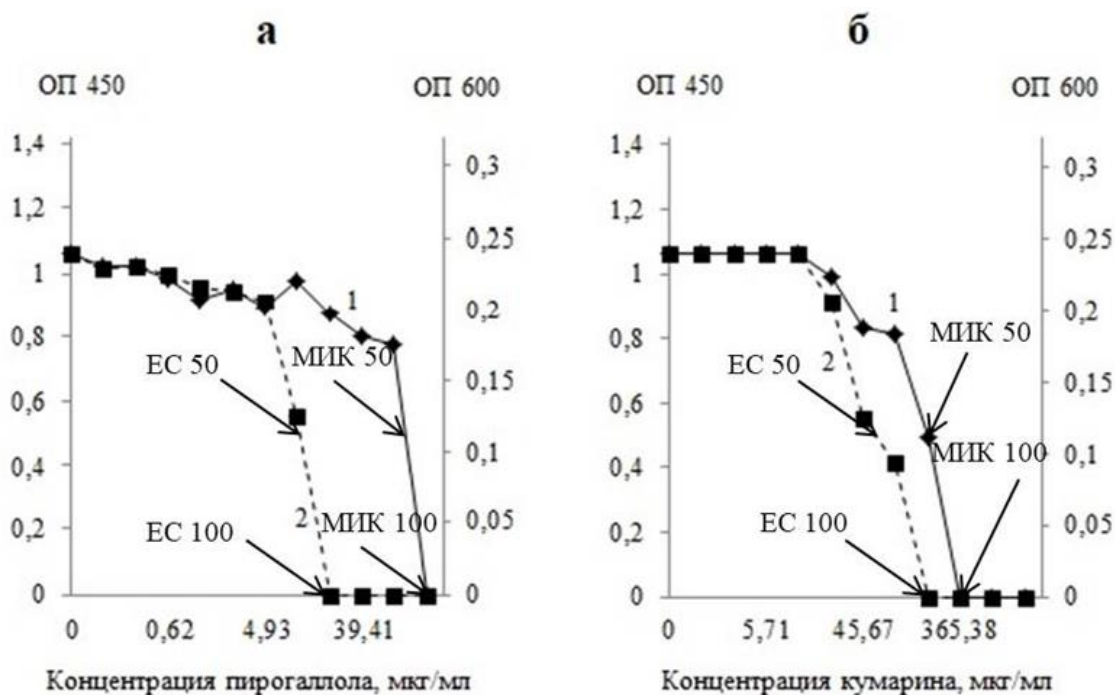
Изоболы представлены в виде прямых линий, соединяющих концентрации каждого из соединений, вызывающих одинаковый биологический эффект (50% подавление биосинтеза виолацеина; EC_{50}). Результат совместного действия двух соединений показан путем нанесения на график точек с координатами, соответствующими концентрациям в композиции, обеспечивающим достижение EC_{50}

Рисунок 26 – Изоболографический анализ совместного воздействия комбинаций амикацина с АУ (а), пирогаллолом (б) и кумарином (в) на QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина в культуре *C. violaceum* ATCC 31532

С учетом указанного обстоятельства второй вариант комбинированного использования антибиотика и сорбента включал: 1) воздействие амикацина 0,05-

100 мкг/мл на дикий штамм *S. violaceum* ATCC 31532; 2) разделение биомассы и культуральной жидкости с накопленным в ней АИ; 3) контакт последней с навесками АУ 1000-30000 мкг/мл; 4) финальную оценку остаточных количеств АИ в биотесте с сенсорным штаммом *S. violaceum* CV026, специфически отвечающим биосинтезом пигмента виолацеина на присутствие С₆-АГЛ. В результате изменения дизайна эксперимента зарегистрировано выраженное смещение кривых дозозависимого эффекта амикацина в сторону более низких концентраций антибиотика (Рисунок 25б), а индексы его комбинированного использования с АУ расположились на или вдоль изоболы, соединяющей значения ЕС₅₀ антибиотика и сорбента (Рисунок 26а), что характеризовало действие тестируемой композиции как аддитивное.

Оценка воздействия ММРП (пирогаллола и кумарина) на рост и систему QS *S. violaceum* ATCC 31532 и их комбинирование с амикацином с целью усиления QS-ингибирующей активности. Другим использованным подходом явилось тестирование комбинаций амикацина с малыми молекулами – пирогаллолом и кумарином, ранее идентифицированными в составе растительных экстрактов с выраженной анти-QS активностью [145, 162]. Проведенное в рамках настоящей работы исследование биологической активности полных химических аналогов названных соединений в отношении *S. violaceum* ATCC 31532 (Рисунок 27) подтвердило наличие подобной активности: субингибиторные концентрации пирогаллола подавляли QS-зависимую продукцию виолацеина на 50% в дозе 13,5 мкг/мл и приводили к полному угнетению пигментообразования в дозе 19,71 мкг/мл и выше. Аналогичный эффект кумарина регистрировался в более узком концентрационном диапазоне, характеризуясь величинами ЕС₅₀=136,0 мкг/мл и ЕС₁₀₀=182,69 мкг/мл (Таблица 11). На этом фоне значения рост-ингибирующей активности характеризовались МИК₅₀=85,38 мкг/мл и МИК₁₀₀=157,64 мкг/мл для пирогаллола и МИК₅₀=182,69 мкг/мл и МИК₁₀₀=365,38 мкг/мл для кумарина.



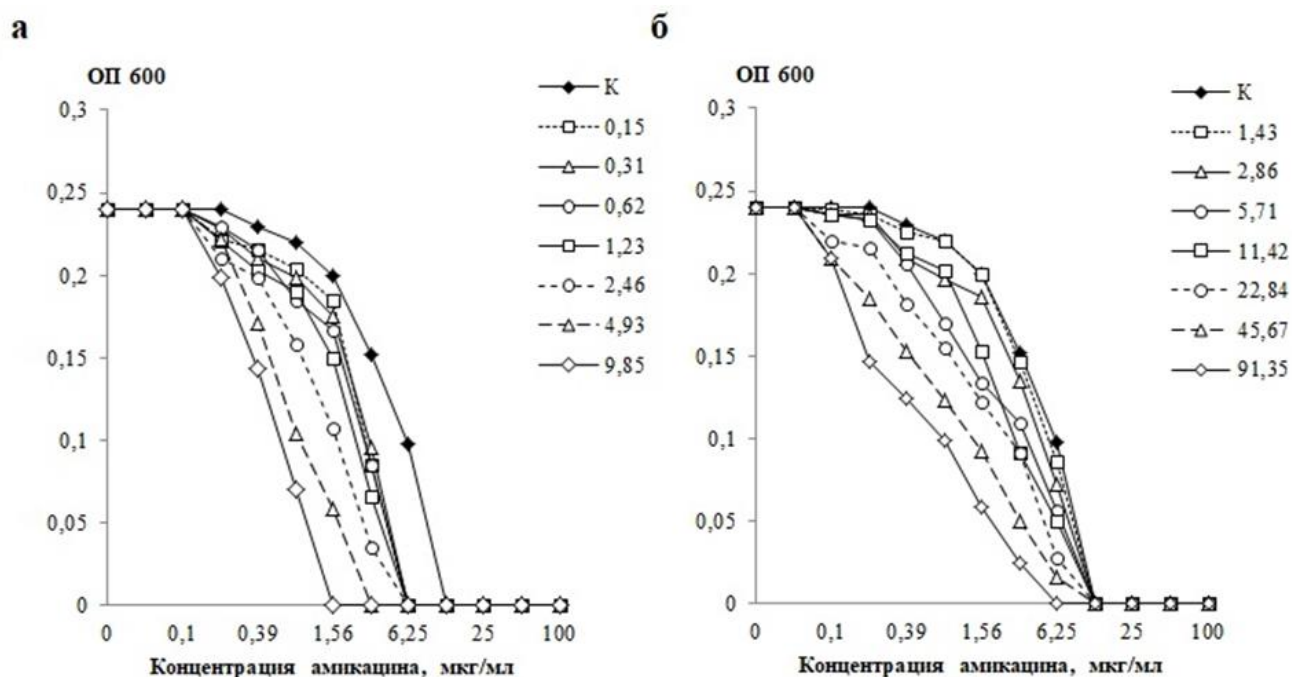
по оси абсцисс – концентрации действующих соединений (мкг/мл); по оси ординат слева, сплошная линия на графиках (1) – оптическая плотность биомассы (ОП₄₅₀); по оси ординат справа, пунктирная линия на графиках (2) – оптическая плотность пигмента (ОП₆₀₀)

Рисунок 27 – Воздействие пирогаллола (а) и кумарина (б) на рост и QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина в культуре *C. violaceum* ATCC 31532

Дополнительный анализ механизма биоактивности пирогаллола и кумарина был проведен в серии экспериментов с использованием сенсорного штамма *E. coli* *pAL103* в двух вариантах исполнения. Первый из них, в котором в культуру сенсорного штамма одновременно вносили С₆-АГЛ в концентрации 10⁻⁶ М и пирогаллол (в концентрациях от 157,64 до 0,15 мкг/мл) или кумарин (от 1461,52 до 1,43 мкг/мл), не выявил достоверных изменений в сроке индукции и уровне биолюминесценции *E. coli* *pAL103*, что свидетельствовало против возможной конкуренции исследуемых молекул за связывание с АГЛ-распознающим участком белка LuxR. С другой стороны, предварительная 60-минутная инкубация сенсорного штамма с пирогаллолом или кумарином в тех же концентрациях с последующей индукцией внесением С₆-АГЛ существенно снижала интенсивность люминесцентного отклика *E. coli* *pAL103*: при действии пирогаллола EC₅₀=7,08

мкг/мл и кумарина $EC_{50}=365,38$ мкг/мл. Тем самым полученный результат позволял связать вероятный механизм QS-ингибирующей активности исследуемых молекул с нарушением чувствительности бактериальных клеток к действию АИ, детали которого требуют своего дальнейшего изучения.

Итоговое проведение исследований в перекрестной матрице концентраций пирогаллола (0,15-157,64 мкг/мл) или кумарина (1,43-1461,52 мкг/мл) с амикацином (в диапазоне 0,05-100 мкг/мл) выявило их повышенную биоактивность в тесте подавления QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина, проявляющуюся в смещении кривых совместного дозозависимого эффекта относительно соответствующего контроля (Рисунок 28а, б).



по оси абсцисс – концентрации амикацина (мкг/мл); по оси ординат – оптическая плотность пигмента виолацеина (ОП₆₀₀). Концентрации пирогаллола и кумарина, использованные в композициях с амикацином, и их обозначения на графиках приведены на полях рисунков

Рисунок 28 – Совместные эффекты амикацина с пирогаллолом (а) и кумарином (б) в отношении QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина у *S. violaceum* ATCC 31532

При этом изоболографический анализ (Рисунок 26б, в) свидетельствовал о супераддитивном характере действия подобных композиций, проявляющемся в расположении всех расчетных индексов комбинированного воздействия под прямой, соединяющей значения EC_{50} антибиотика и ММРП. Одновременно, на фоне принципиального сходства биоактивности тестируемых композиций, изоболографический анализ фиксировал и их некоторые особенности. Так в присутствии низких концентраций пирогаллола (0,154-12,5 мкг/мл) концентрация амикацина, необходимого для 50% подавления биосинтеза виолацеина, снижалась в 2-3 раза (Рисунок 26б), в то время как сам амикацин в минимальных концентрациях (0,11-7,5 мкг/мл) обеспечивал аналогичный эффект в отношении анти-QS активности кумарина (Рисунок 26в).

Кроме того, одновременное воздействие на тестерный штамм антибиотика и пирогаллола или кумарина обуславливало двух-четырёхкратное снижение MIK_{100} по амикацину, что позволяло говорить о потенцирующем действии использованных малых молекул в отношении его рост-ингибирующей активности на *S. violaceum* ATCC 31532.

Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали анти-QS эффект достаточно разнородной по химическому строению и составу группы соединений, а также позволили охарактеризовать наиболее вероятные механизмы их действия на систему плотностно-зависимой коммуникации на примере тестерного штамма *S. violaceum* ATCC 31532, синтезирующего пигмент виолацеин под контролем системы QS.

Обнаруженное в присутствии субингибиторных концентраций антибиотика амикацина подавление QS-зависимого образования пигмента виолацеина хорошо согласуется с аналогичными эффектами тобрамицина [67], что позволяет говорить об универсальности этого типа биологической активности антибиотиков из группы аминогликозидов. По-видимому антибиотики этой группы имеют и общий механизм действия, а именно: нарушают биосинтез C_4 -АГЛ – АИ двухкомпонентной системы RhlI/RhlR у *Pseudomonas aeruginosa*, показанный ранее в работе [21], а также подавляют образование C_6 -АГЛ – АИ аналогичным

образом организованной системы CviI/CviR у *C. violaceum*, что показано в нашем исследовании.

Результаты исследования фармакопейного препарата АУ расширяют представления о нем как поливалентном физико-химическом антидоте, эффективно сорбирующем не только алкалоиды, гликозиды, производные фенола, и разнообразные токсины [174], но и регуляторные молекулы бактериального происхождения, в том числе С₆-АГЛ – АИ системы QS *C. violaceum* и С₆-оксо-АГЛ – индуктора плотностно-зависимой биолюминесценции *V. fischeri*. Химическая гомология названных лактонов и зарегистрированные в отношении них близкие значения сорбционной емкости объясняют происходящие процессы моделью мономолекулярной адсорбции на однородную поверхность (Лэнгмюра), происходящей по механизму физического закрепления молекул сорбата на поверхности сорбента при участии их гидрофобных фрагментов. В итоге АУ может быть назван вторым (после алкиламин-модифицированного циклодекстрина; [141]) неорганическим соединением, обеспечивающим эффективный «перехват» внеклеточных АГЛ.

Показанные в настоящем исследовании эффекты пирогаллола – компонента ряда растительных экстрактов с доказанной анти-QS активностью [145], развивают представления о фенольных соединениях растительного происхождения как регуляторах опосредованной гомосеринлактонами межклеточной коммуникации у *C. violaceum* и *P. aeruginosa* [90]. При этом, не исключается возможность анти-QS эффекта пирогаллола как дополнительного проявления его про-оксидантной активности [43], что не противоречит показанному ранее снижению чувствительности бактериальных клеток к действию АИ под влиянием другой группы фенольных соединений растительного происхождения – алкилоксибензолов [2]. Аналогичные эффекты кумарина хорошо согласуются с представлениями о нем как новом эффективном растительном ингибиторе QS у бактерий [162], механизм действия которого также связан со снижением чувствительности к природным и химически синтезированным АИ у клеток *V. splendidus* [227], и как показано в настоящем

исследовании – у *C. violaceum*. При этом тонким механизмом действия кумарина, вероятно, является ингибирование метаболизма циклического 3',5'-дигуанилата – внутриклеточного посредника, вовлеченного в регуляцию синтеза бактериальных экзополисахаридов, образования биопленок, адгезии и вирулентности [39].

Второй блок экспериментов планировался как экспериментальное исследование комбинаций «амикацин + АУ» и «амикацин + пирогаллол или кумарин», каждый из компонентов которых воздействует на обособленное звено системы плотно-зависимой коммуникации у *C. violaceum* ATCC 31532, что позволяло ожидать взаимного потенцирования итогового анти-QS эффекта.

Однако, одновременное присутствие амикацина и АУ в среде культивирования *C. violaceum* ATCC 31532 не дало ожидаемого результата, но напротив, привело к негативному эффекту, что объяснялось сорбцией молекул антибиотика на частицах АУ. Разрешением данного конфликта явилось последовательное использование амикацина, который в субингибиторных концентрациях подавлял продукцию АИ в растущей культуре *C. violaceum* ATCC 31532, и затем – АУ, обеспечивающего сорбцию остаточных количеств С₆-АГЛ из среды культивирования (Рисунок 29, слева).

Более однозначные результаты были получены при исследовании композиций «амикацин + пирогаллол» и «амикацин + кумарин», во всем диапазоне тестированных субингибиторных концентраций действующих компонентов проявивших выраженный супераддитивный анти-QS эффект. Механизм его формирования может быть объяснен подавлением образования С₆-АГЛ под действием антибиотика, остаточные количества которого оказываются неспособными к индукции QS-зависимых реакций у бактериальных клеток, вследствие снижения их чувствительности к АИ под действием ММРП (Рисунок 29, справа).

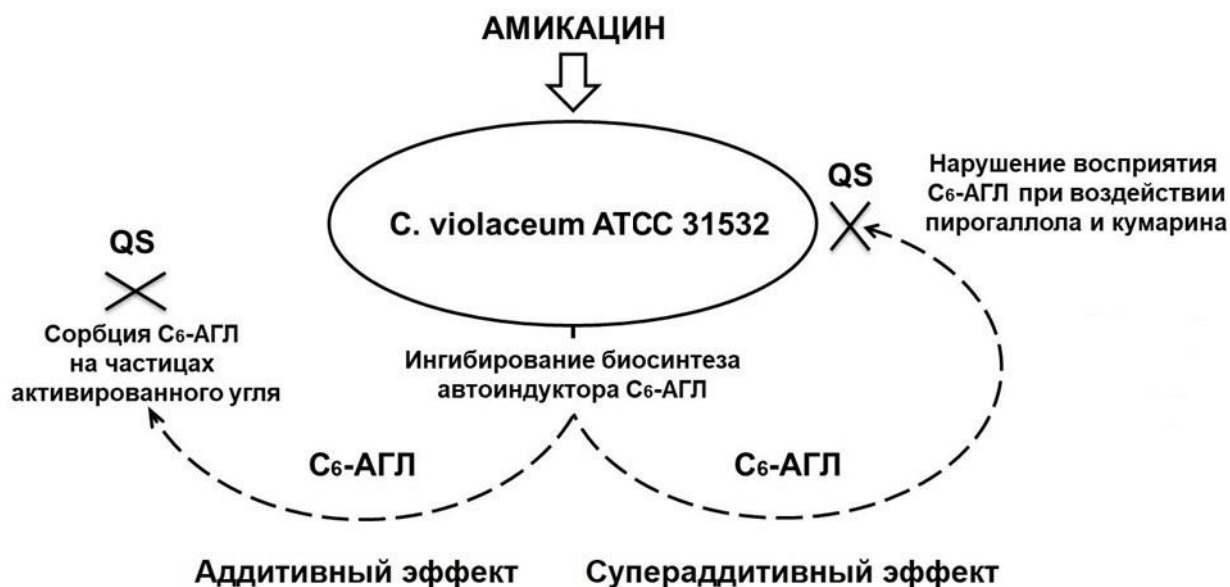


Рисунок 29 – Вероятные механизмы действия композиций аминогликозидного антибиотика амикацина с АУ (слева) и ММРП – пирогаллолом или кумарином (справа) в отношении системы QS у *C. violaceum* ATCC 31532

Обсуждая фундаментальный аспект полученного результата, следует отметить реальность формирования синергетических композиций «антибиотик + ММРП» в природных экологических нишах, в частности – почвах, что определяется типичным присутствием бактерий, синтезирующих антибиотики, в микробных сообществах ризосферы растений [158]. Одним из вариантов биологической целесообразности таких синергетических композиций является совместное противодействие растительно-бактериальных симбиозов колонизации фитопатогенными микроорганизмами, использующими стереотипно устроенные системы плотно-зависимой коммуникации для индукции своего патогенного потенциала [18].

Практически-ориентированный аспект проведенного исследования заключается в обосновании комбинированного использования амикацина (а в перспективе – и других антибиотиков из группы аминогликозидов) в сочетании с АУ и ММРП как средства борьбы с инфекционными агентами, использующими системы QS для образования биопленок и индукции своего патогенного

потенциала. При этом на фоне принципиальной возможности разобщенного во времени применения антибиотика и АУ, более предпочтительным является использование комбинаций амикацина с пирогаллолом или кумарином, что определяет перспективу их дальнейшего доклинического и клинического исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день множественная лекарственная устойчивость бактериальных патогенов является серьезной проблемой здравоохранения на международном уровне. Данное обстоятельство определило поиск альтернативных методов лечения инфекционных заболеваний традиционно применяемым антибактериальным средствам, направленным на угнетение роста патогена. К такой альтернативе относят и QS. В настоящее время представлено несколько подходов к ингибированию QS-систем, однако не один из них не доведен до состояния фармацевтического препарата. При этом на фоне создания ингибиторов QS нового поколения, не теряют своей актуальности уже давно известные и повсеместно применяемые лекарственные средства, у которых зарегистрирована QS-ингибирующая активность. К таким веществам относятся и антибиотики.

Сегодня антибиотики, не смотря на всё большее распространение антибиотикорезистентности, занимают особое место в терапии бактериальных инфекций и широко используются в современной медицине. При этом почти в 80% случаев показаниями для их использования являются инфекции верхних и нижних дыхательных путей (острый средний отит, фарингит, ОРЗ и др.). Открытие того факта, что данная группа антибактериальных средств имеет способность к модуляции QS-зависимых процессов, делает изучение их влияния на систему QS у бактерий не просто перспективным, но и важным, поскольку плотно-зависимая химическая коммуникация является ключевым фактором в запуске инфекционного процесса у человека, животных и растений.

Исследование воздействия антибиотиков на QS-зависимые процессы микроорганизмов ведутся во всем мире. Получены обширные данные о способности разных групп антибиотиков ингибировать или, наоборот, стимулировать QS у патогенных бактерий, однако результаты этих исследований

не всегда однозначны, а информация о механизмах подобного воздействия не всегда представлена и зачастую противоречива.

Целью работы стало исследование воздействия субингибиторных концентраций антибиотиков из групп пенициллинов, аминогликозидов и тетрациклинов на систему «quorum sensing» LuxI/LuxR-типа (на примере *Chromobacterium violaceum*) и разработка на данной основе возможных подходов к усилению их QS-модулирующей активности.

Первоначальная оценка антибактериального действия пенициллинов в отношении *C. violaceum* CV026 позволила констатировать широкий спектр эффектов: от полного отсутствия подобной активности до выраженного подавления бактериального роста. Наибольшим рост-ингибирующим эффектом характеризовались уреидопенициллины (азлоциллин с содержанием 75 мкг/диск и пиперациллин с содержанием 100 мкг/диск), а также карбоксипенициллин карбенициллин с содержанием 100 мкг/диск, площадь зон подавления роста которых находилась в диапазоне 240-1267 мм². При этом регистрируемые эффекты имели максимумы антибактериальной активности при 22°C и 37°C без четкой зависимости от температуры культивирования. В свою очередь карбоксипенициллин тикарциллин (75 мкг/диск) и изоксасолилпенициллин оксациллин (5 мкг/диск) обуславливали развитие менее выраженного антибактериального эффекта, характеризуемого зонами подавления роста площадью от 157 до 382 мм², а прочие антибиотики (бензилпенициллин, аминопенициллины ампициллин и амоксициллин) в данных условиях не проявили детектируемой активности.

Тестирование потенциального анти-QS эффекта бета-лактамов не позволило зафиксировать значимых эффектов, в то время как для ряда антибиотиков (пиперациллин, азлоциллин, тикарциллин, карбенициллин и оксациллин), в краевых зонах, окружающих площади подавления роста тестерного штамма *C. violaceum*, были зафиксированы QS-стимулирующие эффекты, заключающиеся в индукции биосинтеза пигмента виолацеина. Площадь подобных кольцевидных зон пигментации варьировала от 233 до 743 мм², при этом существенной

особенностью являлось их проявление только в субоптимальном для роста *C. violaceum* CV026 диапазоне температур: от 17°C до 22°C с полным исчезновением подобного эффекта при увеличении температуры культивирования до 27-37°C. Отдельным наблюдением являлось появление пигментации на диске с ампициллином (25 мкг/диск) в отсутствие такового при снижении содержания антибиотика до 10 мкг/диск, что также регистрировалось в неоптимальном для роста тестерного штамма диапазоне температур.

Для доказательства роли пенициллинов как индукторов АГЛ-зависимой реакции *C. violaceum* CV026 была проведена отдельная серия экспериментов, оценивающая активность продуктов ферментативной деградации антибиотиков смесью бета-лактамаз I и II типа. При этом исчезновение антибактериальной активности, контролируемой по воздействию на тест-штамм *S. aureus* FDA 209P (ATCC 6538P), сопровождалось полной утратой как антибактериального, так и QS-регулирующего эффектов бета-лактамов в отношении *C. violaceum* CV026, что свидетельствовало в пользу идентичности материальных носителей анализируемых видов биологической активности.

С другой стороны, с целью анализа значения собственной бета-лактамазной активности тестерного штамма *C. violaceum* CV026 в восприятии антибиотиков группы пенициллина, их активность была проанализирована в присутствии ингибиторов бета-лактамаз: сульбактама и клавулановой кислоты. При этом аминопенициллины ампициллин (10 мкг/диск) и амоксициллин (25 мкг/диск) в использованных экспериментальных условиях самостоятельно не проявляющие детектируемых видов активности, в комбинации с сульбактамом (10 мкг/диск) начинали оказывать сочетанные антибактериальный и QS-индуцирующий эффекты. На этом фоне сочетание тикарциллина (75 мкг/диск) с клавулановой кислотой (10 мкг/диск) приводило к парадоксальному результату: снижало выраженность регистрируемых эффектов в 1,36-1,44 раза, что, однако, также свидетельствовало в пользу взаимосвязи между антибактериальным и QS-регулирующим действием этого антибиотика.

Таким образом, совокупность полученных результатов расширяет представления о спектре биологических активностей антибиотиков из группы пенициллинов и указывает на наличие у них дополнительных информационно-коммуникационных функций, реализуемых в субингибиторном концентрационном диапазоне данных соединений. При этом биологическая целесообразность подобной видонеспецифической химической коммуникации у *C. violaceum* в естественных условиях существования (почве) может определяться запуском QS-регулируемых реакций этого микроорганизма, даже в условиях низкой плотности бактериальной популяции останавливающего деление и начинающего образование биопленки, что в совокупности способно повысить его устойчивость к более высоким концентрациям природных антибиотиков.

Вероятным механизмом QS-модулирующего эффекта пенициллинов является их функционирование в качестве АГЛ-мимикрирующих молекул, что обосновывается вызываемой ими индукцией биосинтеза пигмента виолацеина в условиях необратимой мутации гена *cvlI* у тест-штамма *C. violaceum* CV026, а также частичным сходством строения молекул пенициллинов и АГЛ, дополняемым филогенетическим родством и близкой субстратной специфичностью бета-лактамаз и АГЛ-лактоназ [192]. Косвенным подтверждением данного предположения является развитие QS-стимулирующего эффекта пенициллинов только при субоптимальных для роста *C. violaceum* температурах: учитывая, что N-концевой АГЛ-связывающий домен LuxR-подобных белков одновременно является мишенью для шаперонина GroEL [129], релаксированное состояние белка CviR при низкой температуре в отсутствие белков-шаперонинов может являться важным условием для доступности его взаимодействия со структурно сходными, но не идентичными АГЛ молекулами пенициллинов, в то время как стабилизация белка CviR в результате взаимодействия с шаперонинами при повышении температуры сохраняет возможность подобного связывания только в отношении гомологичного автоиндуктора C₆-АГЛ.

Следующим этапом нашей работы стал анализ воздействия тетрациклинов и аминогликозидов на рост и QS-зависимый биосинтез виолацеина дикого штамма *C. violaceum* ATCC 31532.

Полученные результаты свидетельствовали о высокой чувствительности *C. violaceum* ATCC 31532 к тетрациклину ($\text{МИК}_{100}=3,125$ мкг/мл) и доксициклину ($\text{МИК}_{100}=6,25$ мкг/мл) при относительной устойчивости к аминогликозидам, возрастающей в ряду: амикацин (25 мкг/мл) > гентамицин (50 мкг/мл) > канамицин (100 мкг/мл).

Одновременно было установлено, что все исследуемые антибиотики в субингибиторных концентрациях подавляли биосинтез пигмента виолацеина. При этом соотношение концентраций, обуславливающих абсолютное подавление роста (МИК_{100}) и пигментообразования (ЕС_{100}) составляло 4-8 в группе тетрациклинов, а в группе аминогликозидов достигало 16 при использовании канамицина и гентамицина. В свою очередь соотношение $\text{МИК}_{50}/\text{ЕС}_{50}$, наиболее полно характеризующее широту диапазона концентраций исследованных антибиотиков, вызывающих подавление QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина при минимальной выраженности или отсутствии рост-ингибирующего эффекта, составляло 2,5-3,7 в группе тетрациклинов против 10,8-44,4 в группе аминогликозидов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии у исследуемых антибиотиков двух видов биологической активности: рост-ингибирующей, реализуемой при их высоких концентрациях и более характерной для тетрациклинов, а также QS-ингибирующей, проявляющейся при субингибиторных концентрациях и типичной для антибиотиков из группы аминогликозидов.

Совокупность полученных результатов определила задачу изучения возможных механизмов действия субингибиторных концентраций тетрациклинов и аминогликозидов, в том числе как модуляторов синтеза химических сигналов, опосредующих систему плотностно-зависимой коммуникации. При этом дизайн проведенного эксперимента заключался в культивировании дикого штамма

C. violaceum ATCC 31532 в присутствии (опыт) и в отсутствии (контроль) антибиотиков с последующим отделением супернатанта и его тестированием на сенсорных штаммах *E. coli pAL103* с детерминантой Tet^r и *C. violaceum* CV026 с детерминантой Km^r, в предварительных экспериментах показавших сопоставимый ответ как на интактный С₆-АГЛ, так и на его смеси с тетрациклинами или аминогликозидами, соответственно.

Результаты проведенного исследования свидетельствовали о неидентичном характере воздействия субингибиторных концентраций тетрациклинов и аминогликозидов на накопление С₆-АГЛ в среде культивирования дикого штамма *C. violaceum* ATCC 31532

Так, наиболее близкие к МИК концентрации тетрациклина (0,8-1,56 мкг/мл) и доксициклина (1,56-3,13 мкг/мл) приводили к умеренному снижению содержания АИ: до 42-83% от контрольных значений. Последующее же уменьшение концентраций данных антибиотиков сопровождалось парадоксальным накоплением внеклеточного С₆-АГЛ в среде культивирования, содержание которого достигало 130-146% по сравнению с соответствующим контролем. Таким образом, развивающийся в присутствии субингибиторных концентраций тетрациклинов в диапазоне от 1/2 до 1/16 МИК эффект имел двухфазный характер с последовательным снижением и повышением концентраций внеклеточного АИ, потенциально определяемым соотношением интенсивностей его синтеза и потребления из среды культивирования.

В свою очередь содержание АИ в культуральной жидкости *C. violaceum* ATCC 31532, выращенного в присутствии антибиотиков группы аминогликозидов в диапазоне от 1/2 до 1/4 МИК, характеризовалось нулевыми значениями. Дальнейшее снижение концентраций канамицина с 50 до 1,56 мкг/мл, гентамицина с 25 до 0,8 мкг/мл и амикацина с 12,5 до 0,2 мкг/мл сопровождалось постепенным восстановлением синтеза внеклеточного С₆-АГЛ у сенсорного штамма до 95-100% от контрольных значений. Таким образом, полученные результаты позволили констатировать, что действие аминогликозидов в широком диапазоне их субингибиторных концентраций (до 1/32 – 1/64 МИК) связано с

выраженным подавлением биосинтеза АИ, в условиях дефицита которого двухкомпонентная система QS у *C. violaceum* ATCC 31532 перестает функционировать.

Предполагаемый механизм QS-модулирующего эффекта тетрациклинов (на примере доксициклина) и аминогликозидов (на примере канамицина) был дополнительно проанализирован на примере четырех клинических изолятов *P. aeruginosa*, способность которых к образованию N-бутирил-L-гомосерин лактона (C₄-АГЛ) предварительно показана с использованием сенсорного штамма *E. coli pAL101* с клонированным геном *rhlR*, продукт которого рецептирует C₄-АГЛ и запускает транскрипцию кассеты *luxCDABE* генов с развитием свечения (биолюминесценции). При этом культивирование *P. aeruginosa* в присутствии канамицина вело к полному подавлению образования АИ, с использованием *E. coli pAL101* не обнаружено ни в одном из проанализированных супернатантов во всем исследованном диапазоне субингибиторных концентраций данного антибиотика. В свою очередь эффектом доксициклина являлось накопление внеклеточного C₄-АГЛ в среде культивирования выше контрольных значений, что может указывать на нарушение восприятия этого АИ бактериальными клетками-мишенями.

Таким образом, совокупность полученных результатов указывает на наличие у двух групп антибиотиков – ингибиторов биосинтеза белка (тетрациклинов и аминогликозидов) дополнительной QS-модулирующей активности, что согласуется с полученными на других моделях данными об аналогичной активности субингибиторных концентраций доксициклина [92] и аминогликозидного антибиотика тобрамицина [21]. При этом особенностью действия названных групп антибиотиков на модельный штамм *C. violaceum* ATCC 31532 являлся различный баланс их прямого антибактериального и QS-ингибирующего эффектов, первый из которых превалировал у тетрациклинов, а второй был выражен у аминогликозидов. Другим важным наблюдением являлось обнаружение связи QS-ингибирующего эффекта аминогликозидов с подавлением синтеза АИ C₆-АГЛ у лабораторного штамма *C. violaceum* ATCC 31532 или C₄-

АГЛ у клинических изолятов *P. aeruginosa*, что вновь находит согласование с данными о сходном механизме действия тобрамицина [21] и в целом формирует представления о названной группе антибиотиков как перспективном средстве подавления плотностно-зависимой химической коммуникации у микроорганизмов, использующих систему QS для индукции своего патогенного потенциала.

Полученные результаты явились основанием для завершающего этапа данной работы, целью которого явилось исследование возможности сочетанного применения антибиотиков с АУ и ранее охарактеризованными ММРП – пирогаллолом и кумарином, направленного на создание синергетически действующих композиций, эффективно ингибирующих системы QS LuxI/LuxR типа у бактерий. При этом на основании сформированных представлений об антибиотиках группы аминогликозидов как ингибиторах образования АГЛ, АУ как эффективного сорбента АГЛ, а также имеющихся представлений о малых молекулах как факторах, нарушающих восприятие АГЛ, в качестве композиций с потенциальным взаимодополняющим (синергетическим) действием были проанализированы сочетания именно этих препаратов.

Исследование проведено на диком штамме *S. violaceum* ATCC 31532 с полноценной двухкомпонентной системой QS LuxI/LuxR типа, что предполагало возможность реализации биологической активности факторов, как подавляющих биосинтез АИ, так и нарушающих его восприятие.

Результаты исследований, проведённых в перекрестной матрице концентраций амикацина и АУ в растущих культурах *S. violaceum* ATCC 31532 заставили констатировать, что одновременное присутствие в среде культивирования антибиотика и сорбента неоднозначно сказывается на их совместной биологической активности. Данная активность была оценена в соответствии с методикой, предложенной R.J. Tallarida. Выявлено, что при одновременном применении антибиотика и сорбента не происходит усиления QS-ингибирующего действия.

При анализе причин обнаруженного эффекта рассмотрена возможность сорбции амикацина на частицах АУ. При проверке этой гипотезы на чувствительном к амикацину штамме *S. aureus* FDA 209P установлено, что АУ сорбирует амикацин, причем степень сорбционного извлечения антибиотика из среды культивирования достигала 50-75%.

В этой связи, второй вариант комбинированного использования антибиотика и сорбента включал последовательное воздействие на культуру амикацином, а затем – на выделенные супернатанты АУ. В результате изменения дизайна эксперимента было зарегистрировано выраженное усиление QS-ингибирующего эффекта, характеризующееся как аддитивное.

Проведение исследований в перекрестной матрице концентраций амикацина с ММРП с доказанной QS-ингибирующей активностью (пирогаллолом и кумарином) выявило их повышенную биоактивность в тесте подавления QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина *C. violaceum* ATTC 31532. При этом изоболографический анализ свидетельствовал о супераддитивном характере действия подобных композиций.

Таким образом, результаты исследования фармакопейного препарата АУ расширяют представления о нем как поливалентном физико-химическом антидоте, эффективно сорбирующем не только алкалоиды, гликозиды, производные фенола и разнообразные токсины [174], но и регуляторные молекулы бактериального происхождения, в том числе С₆-АГЛ, вследствие чего может быть назван вторым (после алкиламин-модифицированного циклодекстрина; [141]) неорганическим соединением, обеспечивающим эффективный «перехват» внеклеточных АГЛ.

Показанные в настоящем исследовании эффекты пирогаллола – компонента ряда растительных экстрактов с доказанной анти-QS активностью [145], развивают представления о фенольных соединениях растительного происхождения как регуляторах опосредованной ацилгомосеринлактонами межклеточной коммуникации у *C. violaceum* и *P. aeruginosa* [90]. При этом, не исключается возможность анти-QS эффекта пирогаллола как дополнительного

проявления его прооксидантной активности [43], что не противоречит показанному ранее снижению чувствительности бактериальных клеток к действию АИ под влиянием другой группы фенольных соединений растительного происхождения – алкилоксибензолов [2]. Аналогичные эффекты кумарина хорошо согласуются с представлениями о нем как новом эффективном растительном ингибиторе QS у бактерий [162], механизм действия которого также связан со снижением чувствительности к природным и химически синтезированным АИ у клеток *V. splendidus* [227], и как показано в настоящем исследовании – у *S. violaceum* ATCC 31532. При этом тонким механизмом действия кумарина, вероятно, является ингибирование метаболизма циклического 3',5'-дигуанилата – внутриклеточного посредника, вовлеченного в регуляцию синтеза бактериальных экзополисахаридов, образования биопленок, адгезии и вирулентности [39].

Второй блок экспериментов планировался как экспериментальное исследование комбинаций «амикацин + АУ» и «амикацин + пирогаллол или кумарин», каждый из компонентов которых воздействует на обособленное звено системы плотно-зависимой коммуникации у *S. violaceum* ATCC 31532, что позволяло ожидать взаимного потенцирования итогового анти-QS эффекта.

Однако одновременное присутствие амикацина и АУ в среде культивирования *S. violaceum* ATCC 31532 не дало ожидаемого результата, но, напротив, привело к негативному эффекту, что объяснялось сорбцией молекул антибиотика на частицах АУ. Разрешением данного конфликта явилось последовательное использование амикацина, который в субингибиторных концентрациях подавлял продукцию АИ в растущей культуре *S. violaceum* ATCC 31532, и затем – АУ, обеспечивающего сорбцию остаточных количеств C₆-АГЛ из среды культивирования.

Более однозначные результаты были получены при исследовании композиций «амикацин + пирогаллол» и «амикацин + кумарин», во всем диапазоне тестированных субингибиторных концентраций действующих компонентов проявивших выраженный супераддитивный анти-QS эффект.

Механизм его формирования может быть объяснен подавлением образования C_6 -АГЛ под действием антибиотика, остаточные количества которого оказываются неспособными к индукции QS-зависимых реакций у бактериальных клеток, вследствие снижения их чувствительности к АУ под действием ММРП.

Таким образом, совокупность полученных результатов свидетельствует о перспективности использования аминогликозидных антибиотиков, а также их сочетаний с АУ и ММРП в качестве ингибиторов плотностно-зависимой химической коммуникации бактериальных патогенов и представляет основу для дальнейших доклинических и клинических испытаний.

ВЫВОДЫ

1. В субоптимальном для роста *C. violaceum* диапазоне температур (17-22°C) субингибиторные концентрации антибиотиков пенициллинового ряда – пиперациллина, азлоциллина, тикарциллина, карбенициллина и оксациллина вызывают QS-зависимую индукцию пигмента виолацеина в отсутствие собственного природного автоиндуктора C₆-АГЛ.

2. Обработка пенициллинов смесью бета-лактамаз I и II типа ведет к совместной утрате ими антибактериальной и QS-индуцирующей активностей, в то время как ингибирование собственных бета-лактамаз *C. violaceum* сульбактамом сопровождается проявлением сочетанной антибактериальной и QS-индуцирующей активностей у ампициллина и амоксициллина, а использование клавулановой кислоты оказывает комплексное воздействие на аналогичные эффекты тикарциллина.

3. Антибиотики из групп тетрациклинов (тетрациклин, доксициклин) и аминогликозидов (канамицин, гентамицин, амикацин) в субингибиторных концентрациях подавляют QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина у *C. violaceum* с двухкомпонентной системой автоиндукции LuxI/LuxR-типа.

4. Механизм QS-ингибирующей активности аминогликозидов связан с нарушением продукции автоиндуктора C₆-АГЛ, в условиях дефицита которого QS-система *C. violaceum* перестает функционировать.

5. Последовательное использование аминогликозидного антибиотика амикацина, нарушающего образование автоиндуктора C₆-АГЛ, и фармакопейного препарата активированного угля, сорбирующего остаточные количества C₆-АГЛ из среды культивирования, обеспечивает аддитивное ингибирование QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum*, в то время как одновременное использование амикацина и активированного угля снижает их

совместную анти-QS активность за счет частичного связывания антибиотика на частицах сорбента.

6. Комбинированное использование амикацина и малых молекул растительного происхождения (пирогаллола и кумарина), нарушающих процессы восприятия C_6 -АГЛ, ведет к формированию выраженного супераддитивного ингибирующего эффекта в отношении QS-системы *C. violaceum*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

QS – quorum sensing;

АИ – автоиндуктор;

АГЛ – N-ацилгомосеринлактон;

C₄-АГЛ – N-бутаноил-L-ацилгомосеринлактон;

C₆-АГЛ – N-гексаноил-L-ацилгомосеринлактон;

C₆-оксо-АГЛ – N-(3-оксо-гексаноил)-L-ацилгомосеринлактон;

C₈-АГЛ – N-октаноил-ацилгомосеринлактон;

C₁₂-оксо-АГЛ – N-(3-оксо-додеканоил)-L-ацилгомосеринлактон;

АИП – автоиндуцирующие пептиды;

АИ-2 – автоиндуктор второго типа;

SAM – S-аденозилметионин;

ACP – ацил-ацил переносящий белок;

cAMP – циклический аденозинмонофосфат;

CRP – cAMP рецепторный протеин;

PQS – 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон;

HNQ – 2-гептил-4-хинолон;

IQS – 2-(2-гидроксифенил)-тиазол-4-карбальдегид;

ДПД – 4,5-дигидрокси-2,3-пентандион;

CAI-1 – cholerae autoinducer, (S)-3-гидрокситридекан-4-один;

AP4-24H11 – антиавтоиндуцирующее моноклональное антитело;

CD – циклодекстрины;

CDP – циклические дипептиды (дикетопиперазины)

CLP – L-лейцил-L-пролил

HP-β-CD – 2-гидроксипропил-β-CD;

БЛА – бета-лактамы антибиотики;

ПСБ – пенициллинсвязывающие белки;

АУ – активированный уголь;

ММРП – малые молекулы растительного происхождения;

LB-агар, бульон – Luria-Bertani-агар, бульон;

МИК – минимальная ингибирующая концентрация;

ЕС – концентрация вещества, вызывающая подавление проявления фенотипического признака относительно контроля;

ОП – оптическая плотность;

RLU – относительные единицы свечения

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дерябин, Д. Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д. Г. Дерябин. – Москва: Наука, 2009. – 246 с. – ISBN 978-5-02-036687-9.
2. Дерябин, Д.Г. Влияние алкилоксибензолов на индуцируемые гомосеринлактонами проявления кворум сенсинга у бактерий / Д.Г. Дерябин [*и др.*] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50. – № 4. – С. 391-397.
3. Дерябин, Д.Г. Влияние бактериальных ауторегуляторных молекул (гомосеринлактонов и алкилоксибензолов) на окислительный метаболизм клеточных эффекторов естественного иммунитета / Д.Г. Дерябин [*и др.*] // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – № 2. – С. 147.
4. Кожевин, П.А. Природные функции антибиотиков как «информбиотиков» / П.А. Кожевин, К.А. Виноградова, В.Г. Булгакова // Вестник Московского университета. Сер. 17. Почвоведение. – 2014. – Т. 3. – С. 3-9.
5. Невар, Т.Н. Влияние коллоидно-химических свойств активированных углей на их терапевтическую эффективность / Т.Н. Невар [*и др.*] // Химико-фармацевтический журнал. – 2007. – Т. 41. – № 6. – С. 44-48.
6. Пьянова, Л.Г. Углеродные сорбенты в медицине и протеомике / Л.Г. Пьянова // Химия в интересах устойчивого развития. – 2011. – Т. 19. – С. 113-122.
7. Самсонов, К.В. Сравнительная эффективность сорбции бактерий и бактериальных токсинов углеродными и углеродминеральными сорбентами / К.В. Самсонов // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2008. – Т. 29. – С. 48-50.
8. Стрелкова, Е.А. Стимуляция антибиотиками процесса формирования бактериальных биоплёнок / Е.А. Стрелкова [*и др.*] // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 2. – С. 282-285.

9. Хмель, И.А. Quorum Sensing регуляция экспрессии генов – перспективная мишень для создания лекарств против патогенности бактерий / И.А. Хмель, А.З. Метлицкая // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40. – С. 195-210.
10. Хмель, И.А. Quorum-sensing регуляция экспрессии генов: фундаментальные и прикладные аспекты, роль в коммуникации бактерий / И.А. Хмель // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – № 4. – С. 457-464.
11. Чеботарь, И.В. Антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий / И.В. Чеботарь [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14. – № 1. – С. 51-58.
12. Abd El-Hady, F.K. Investigating on the correlation between some biological activities of marine sponge-associated bacteria extracts and isolated diketopiperazines / F.K. Abd El-Hady [et al.] // Current Microbiology. – 2017. – V. 74. – P. 6-13.
13. Abisado, R.G. Bacterial Quorum Sensing and microbial community interactions / R.G. Abisado [et al.] // ASM MICROBE. – 2018. – V. 9. – N. 3. – P. e02331-17.
14. Adam, E.C. *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose / E.C. Adam [et al.] // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 1997. – V. 155. – P. 2102-2104.
15. Al-Haidari, R.A. Anti-quorum sensing activity of some medicinal plants / R.A. Al-Haidari [et al.] // AJTCAM. – 2016. – V. 13. – N. 5. – P. 67-71.
16. Anandan, K. Quorum quenching activity of AiiA lactonase KMMI17 from endophytic *Bacillus thuringiensis* KMCL07 on AHL-mediated pathogenic phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* / K. Anandan, R.R. Vittal // Microbial Pathogenesis. – 2019. – V. 132. – P. 230-242.
17. Anju, S. Novel insights on the *Bacillus* quorum sensing mechanism: its role in competence, virulence, sporulation and biofilm formation / S. Anju [et al.] // Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence. – 2018. – P. 313-327.

18. Ansari, F.A. Quorum sensing in phytopathogenic bacteria and its relevance in plant health / F.A. Ansari, I. Ahmad // *Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors*. – 2018. – P. 351-370.
19. Antunes, L. Quorum sensing in bacterial virulence / L. Antunes [*et al.*] // *Microbiology*. – 2010. – V. 156. – P. 2271-2282.
20. Asad, S. Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection / S. Asad, S.M. Opal // *Critical Care*. – 2008. – V. 12. – N. 6. – P. 236.
21. Babic, F. Tobramycin at subinhibitory concentration inhibits the RhlI/R quorum sensing system in a *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate / F. Babic, V. Venturi, G. Maravic-Vlahovicek // *BMC Infectious Diseases*. – 2010. – V. 10. – P. 148
22. Bainton, N.J. A general role for the lux autoinducer in bacterial cell signaling: Control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia* / N.J. Bainton [*et al.*] // *Gene*. – 1992. – V. 116. – P. 87-91.
23. Balaban, N.A Chimeric peptide composed of a dermaseptin derivative and an RNA III-inhibiting peptide prevents graft-associated infections by antibiotic-resistant staphylococci / N. Balaban [*et al.*] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2004. – V. 48. – P. 2544-2550.
24. Baranowska, K. Molecular Interactions biofilmach in bacterial cells / K. Baranowska, A. Rodziewicz // *Kosmos*. – 2008. – V. 57. – P. 29-38.
25. Bellezza, I. Cyclic peptides in neurological disorders: the case of Cyclo(His-Pro) / I. Bellezza, M.J. Peirce, A.M. Chapter // *Quorum Sensing*. – 2019. – P. 257-286.
26. Blosser, R.S. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers / R.S. Blosser, K.M. Gray // *Journal of Microbiological Methods*. – 2000. – V. 40. – P. 47-55.
27. Brackman, G. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and *in vivo* / G. Brackman [*et al.*] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2011. – V. 55. – P. 2655-2661.

28. Brumback, K.C. The *Serratia*-type hemolysin of *Chromobacterium violaceum* / K.C. Brumback, B.D. Eason, L.K. Anderson // FEMS Microbiology letters. – 2007 – V. 267. – P. 243-250.
29. Bulman, Z.P. Influence of *rhlR* and *lasR* on polymyxin pharmacodynamics in *Pseudomonas aeruginosa* and implications for quorum sensing inhibition with azithromycin / Z.P. Bulman [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2017. – V. 61. – P. e00096-16.
30. Bykov, D.A. Quantum-chemical modelling of the reactivity of charcoal surface double bonds / D.A. Bykov [et al.] // Theoretical and Experimental Chemistry. – 2008. – V. 44. – P. 32.
31. Camilli, A. Bacterial small-molecule signaling pathways / A. Camilli, B.L. Bassler // Science. – 2006. – V. 311. – P. 1113-1116.
32. Cao, H. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism / H. Cao [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2001. – V. 98. – P. 14613-14618.
33. Cha, J. Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of *sophora flavescens* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / J. Cha [et al.] // Phytotherapy Research. – 2009. – V. 9. – P. 1326-1331.
34. Chen, X. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron / X. Chen [et al.] // Nature. – 2002. – V. 415. – P. 545-549.
35. Chowdhary, P.K. *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines / P.K. Chowdhary [et al.] // Biochemistry. – 2007. – V. 46. – N. 50. – P. 14429-14437.
36. Christensen, L.D. Synergistic antibacterial efficacy of early combination treatment with tobramycin and quorum-sensing inhibitors against *Pseudomonas aeruginosa* in an intraperitoneal foreign-body infection mouse model / L.D. Christensen [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2012. – V. 67. – N. 5. – P. 1198-1206.

37. Chugani, S.A. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* / S.A. Chugani [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2001. – V. 98. – P. 2752-2757.
38. Cornforth, J.W. Structure of a naturally occurring antagonist of dihydrostreptomycin / J.W. Cornforth, A.T. James // The Biochemical Journal. – 1956. – V. 63. – P. 124-130.
39. D Almeida, R.E. Comparison of seven structurally related coumarins on the inhibition of Quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum* / R.E. D Almeida [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2017. – V. 101. – N. 8. – P. 3371-3378.
40. Daddaoua, A. Genes for carbon metabolism and the ToxA virulence factor in *Pseudomonas aeruginosa* are regulated through molecular interactions of PtxR and PtxS / A. Daddaoua [et al.] // PLoS One. – 2012. – V. 7. – P. e39390.
41. Das, M.C. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by Vitexin: A combinatorial study with azithromycin and gentamicin / M.C. Das [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – V. 6. – P. 23347.
42. Defoirdt, T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy / T. Defoirdt // Trends in Microbiology. – 2018. – V. 26. – N. 4. – P. 313-328.
43. Defoirdt, T. The apparent quorum-sensing inhibitory activity of pyrogallol is a side effect of peroxide production / T. Defoirdt [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2013. – V. 57. – N. 6. – P. 2870-2873.
44. Dekimpe, V. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors / V. Dekimpe, E. Deziel // Microbiology. – 2009. – V. 155. – P. 712-723.
45. Denning, G.M. *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells / G.M. Denning [et al.] // Infection and Immunity. – 1998. – V. 66. – P. 5777-5784.
46. Derzelle, S. Identification, characterization, and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in *Photobacterium luminescens* / S. Derzelle

[*et al.*] // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – V. 68. – N. 8. – P. 3780-3789.

47. Devescovi, G. Negative regulation of violacein biosynthesis in *Chromobacterium violaceum* / G. Devescovi [*et al.*] // Frontiers in Microbiology. – 2017. – V. 8. – P. 349.

48. Deziel, E. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication / E. Deziel [*et al.*] // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2004. – V. 101. – P. 1339-1344.

49. Diggle, S.P. Quorum sensing / S.P. Diggle, S.A. Cruz, M. Camara // Current Biology. – 2007. – V. 17. – N. 21. – P. 907-910.

50. Diggle, S.P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR / S.P. Diggle [*et al.*] // Molecular Microbiology. – 2003. – V. 50. – P. 29-43.

51. Dong, Y.H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference / Y.H. Dong [*et al.*] // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – V. 70. – P. 954-960.

52. Dong, Y.H. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes / Y.H. Dong, L. H. Zhang // Journal of Microbiology. – 2005. – V. 43. – P. 101-109.

53. Duchaud, E. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* / E. Duchaud [*et al.*] // Nature Biotechnology. – 2003. – V. 21. – N. 11. – P. 1307-1313.

54. Duerkop, B.A. Quorum-Sensing control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis* / Duerkop B.A. [*et al.*] // Journal of Bacteriology. – 2009. – V. 191. – N. 12. – P. 3909-3918.

55. Eberhard, A. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase / A. Eberhard [*et al.*] // Biochemistry. – 1981. – V. 20. – P. 2444-2449.

56. Eberhard, A. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis / A. Eberhard // *Journal of Bacteriology*. – 1972. – V. 109. – P. 1101-1105.
57. Eglund, K.A. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: analysis of the *luxR* DNA binding region by alanine-scanning mutagenesis / K.A. Eglund, E.P. Greenberg // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – V. 183. – N. 1. – P. 382-386.
58. Fantinatti-Garboggini, F. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum* / F. Fantinatti-Garboggini [et al.] // *Genetics and Molecular Research*. – 2004. – V. 31. – N. 3. – P. 134-147.
59. Farrar, WE Jr. beta-Lactamase activity in *Chromobacterium violaceum* / WE Jr. Farrar, N.M. O'dell // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1976. – V. 134. – N. 3. – P. 290-293.
60. Franzin, F.M. Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation / F.M. Franzin, M.P. Sircili // *BioMed Research International*. – 2015. – V. 2015. – P. 1-10.
61. Frederix, M. Co-ordination of quorum-sensing regulation in *Rhizobium leguminosarum* by induction of an anti-repressor / M. Frederix [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2011. – V. 81. – P. 994-1007.
62. Fuqua, C. The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an orphan claims its identity / C. Fuqua [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2006. – V. 188. – P. 3169-3171.
63. Furiga, A. Impairment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to antibiotics by combining the drugs with a new quorum-sensing inhibitor / A. Furiga [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2016. – V. 60. – P. 1676-1686.
64. Gallaghe, L.A. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa* / L.A. Gallagher [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – V. 184. – P. 6472-6480.
65. Gallagher, L.A. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa* / L.A. Gallagher [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – V. 184. – P. 6472-6480.

66. Galloway, W.R.J.D. Quorum sensing in Gram-negative bacteria: smallmolecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways / W.R.J.D. Galloway [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2011. – V. 111. – P. 28-67.
67. Garske, L.A. Sub-inhibitory concentrations of ceftazidime and tobramycin reduce the quorum sensing signals of *Pseudomonas aeruginosa* / L.A. Garske [et al.] // *Pathology*. – 2004. – V. 36. – P. 571-575.
68. Gonzalez, J.E. Messing with bacterial quorum sensing / J.E. Gonzalez, N.D. Keshavan // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2006. – V. 70. – N. 4. – P. 859-875.
69. Goutam, B. Quorum-sensing network-associated gene regulation in Gram-positive bacteria / B. Goutam, R.A. Kumar // *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. – 2017. – V. 64. – N. 4. – P. 439-453.
70. Gowrishankar, S. Quorum quelling efficacy of marine cyclic dipeptide-cyclo(L-leucyl-L-prolyl) against the uropathogen *Serratia marcescens* / S. Gowrishankar [et al.] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2019. – V. 123. – P. 326-336.
71. Gracia, E. Plant extract activities as antioxidant and antibiofilm against chicken gut bacteria / E. Gracia [et al.] // *JITV*. – 2018. – V. 23. – N. 1. – P. 11-17.
72. Greenberg, E.P. Quorum sensing by bacteria / E.P. Greenberg, S. Winans, C. Fuqua // *Annual Review of Microbiology*. – 1996. – V. 50. – P. 727-751.
73. Greenberg, E.P. Quorum sensing in Gram-negative bacteria / E.P. Greenberg // *ASM News*. – 1997. – V. 63. – P. 371-377.
74. Grenha, R. Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR / R. Grenha [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2013. – V. 110. – P. 1047-1052.
75. Guendouze, A. Effect of quorum quenching lactonase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with quorum sensing inhibitors / A. Guendouze [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 227.

76. Guo, Q. Identification of a small molecule that simultaneously suppresses virulence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* / Q. Guo [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – V. 6. – P. 19141.
77. Gupta, P. Efficacy of purified lactonase and ciprofloxacin in preventing systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* in murine burn wound model / P. Gupta, S. Chhibber, K. Harjai // Burns. – 2015. – V. 41. – P. 153-162.
78. Gupta, P. Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation and reduction of virulence / P. Gupta, S. Chhibber, K. Harjai // Indian Journal of Medical Research. – 2016. – V. 143. – N. 5. – P. 643-651.
79. Haquea, S. Developments in strategies for Quorum Sensing virulence factor inhibition to combat bacterial drug resistance / S. Haquea [et al.] // Microbial Pathogenesis. – 2018. – V. 121. – P. 293-302.
80. Harel, M. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes / M. Harel [et al.] // Nature Structural and Molecular Biology. – 2004. – V. 11. – P. 412-419.
81. Haudecoeur, E. Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58 / E. Haudecoeur [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions Journal. – 2009 – V. 22. – N. 5. – P. 529-537.
82. Hawver, L.A. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems / L.A. Hawver, S.A. Jung, W.-L. Ng // FEMS Microbiology Reviews. – 2016. – V. 40. – P. 738-752.
83. He, X. Biofilm formation caused by clinical *Acinetobacter baumannii* isolates is associated with overexpression of the AdeFGH efflux pump / X. He [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2015. – V. 59. – P. 4817-4825.
84. Heeb, S. Quinolones: from antibiotics to autoinducers / S. Heeb [et al.] // FEMS Microbiology Reviews. – 2011. – V. 35. – P. 247-274.
85. Heilmann, S. Why do bacteria regulate public goods by quorum sensing?- How the shapes of cost and benefit functions determine the form of optimal regulation / S. Heilmann, S. Krishna, B. Kerr // Frontiers in Microbiology. – 2015. V. 6. – P. 767.

86. Henke, J.M. Bacterial social engagements / J.M. Henke, B.L. Bassler // Trends in Cell Biology. – 2004. – V. 14. – N. 11. – P. 648-656.

87. Higgins, D.A. The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production / D.A. Higgins [et al.] // Nature. – 2007. – V. 450. – N. 7171. – P. 883-886.

88. Hoffman, L.R. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation / L.R. Hoffman [et al.] // Nature. – 2005. – V. 436. – N. 7054. – P. 1171-1175.

89. Hoque, M.M. Quorum regulated resistance of *Vibrio cholerae* against environmental bacteriophages / M.M. Hoque [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – V. 6. – P. 37956.

90. Hossain, M.A. Impact of phenolic compounds in the acyl homoserine lactone-mediated Quorum sensing regulatory pathways / M.A. Hossain [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – P. 10618.

91. Huang, J.J. Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / J.J. Huang [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – V. 72. – P. 1190-1197.

92. Husain, F.M. Doxycycline interferes with quorum sensing-mediated virulence factors and biofilm formation in gram-negative bacteria / F.M. Husain, I. Ahmad // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2013. – V. 29. – N. 6. – P. 949-957.

93. Jackowski, J.T. Effects of *P. aeruginosa*-derived bacterial products on tracheal ciliary function: role of O₂ radicals / J.T. Jackowski [et al.] // American Journal of Physiology. – 1991. – V. 260. – P. L61-L67.

94. Jakobsen, T.H. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing / T. H. Jakobsen [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2012. – V. 56. – P. 2314-2325.

95. Jakobsen, T.H. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition in vitro / T.H. Jakobsen [et al.] // Quorum Sensing. – 2018. – V. 1673. – P. 275-285.

96. Jensen, V. RhIR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and-independent pathways / V. Jensen [et al.] // Journal of Bacteriology. – 2006. – V. 188. – P. 8601-8606.
97. Jimenez, P.N. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa* / P.N. Jimenez [et al.] // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2012. – V. 76. – P. 46-65.
98. Kaliaa, V.C. Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological applications / V.C. Kaliaa [et al.] // Biotechnology Advances. – 2019. – V. 37. – N. 1. – P. 68-90.
99. Kaplan, H.B. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system / H.B. Kaplan, E.P. Greenberg // Journal of Bacteriology. – 1985. – V. 163. – P. 1210-1214.
100. Kaplan, H.B. Overproduction and purification of the *luxR* gene product: Transcriptional activator of the *Vibrio fischeri* luminescence system / H.B. Kaplan, E.P. Greenberg // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1987. – V. 84. – P. 6639-6643.
101. Kato, N. Control of Gram-negative bacterial quorum sensing with cyclodextrin immobilized cellulose ether gel / N. Kato [et al.] // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2006. – V. 56. – P. 55-59.
102. Kato, N. Control of virulence factor expression in opportunistic pathogens using cyclodextrin immobilized gel / N. Kato [et al.] // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2007. – V. 57. – P. 419-423.
103. Kendall, M.M. Quorum sensing by enteric pathogens / M.M. Kendall, V. Sperandio // Current Opinion in Gastroenterology. – 2007. – V. 23. – P. 10-15.
104. Kessler, E. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease / E. Kessler [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 1993. – V. 268. – P. 7503-7508.
105. Kim, M.K. Surface-attached molecules control *Staphylococcus aureus* quorum sensing and biofilm development / M.K. Kim [et al.] // Nature Microbiology. – 2017. – V. 2. – P. 17080.

106. Kiratisin, P. LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer / P. Kiratisin, K.D. Tucker, L. Passador // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – V. 184. – P. 4912-4919.

107. Konings, A.F. *Pseudomonas aeruginosa* uses multiple pathways to acquire iron during chronic infection in cystic fibrosis lungs / A.F. Konings [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2013. – V. 81. – P. 2697-2704.

108. Kontogiorgis, C. Coumarin-based drugs: a patent review (2008 – present) / C. Kontogiorgis, A. Detsi, D. Hadjipavlou-Litina // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. – 2012. – V. 22. – N. 4. – P. 437-454.

109. Kratochvil, M.J. Nonwoven polymer nanofiber coatings that inhibit quorum sensing in *Staphylococcus aureus*: toward new nonbactericidal approaches to infection control / M.J. Kratochvil [et al.] // *ACS Infectious Diseases*. – 2017. – V. 3. – P. 271-280.

110. Kumar, M.R. *Chromobacterium violaceum*: A rare bacterium isolated from a wound over the scalp / M.R. Kumar // *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. – 2012. – V. 2. – N. 1. – P. 70-72.

111. Kuttler, C. Interplay of two quorum sensing regulation systems of *Vibrio fischeri* / C. Kuttler, B.A. Hense // *Journal of Theoretical Biology*. – 2008. – V. 251. – N. 1. – P. 167-180.

112. Laarman, A.J. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways / A.J. Laarman [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2012. – V. 188. – P. 386-393.

113. Latifi, A. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS / A. Latifi [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 1996. – V. 21. – P. 1137-1146.

114. Latifi, A. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / A. Latifi [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 1995. – V. 17. – P. 333-343.

115. Lau, G.W. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice / G.W. Lau [*et al.*] // *Infection and Immunity*. – 2004. – V. 72. – P. 4275-4278.
116. Ledgham, F. Global regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: the regulatory protein AlgR₂ (AlgQ) acts as a modulator of quorum sensing / F. Ledgham [*et al.*] // *Research in Microbiology*. – 2003. – V. 154. – P. 207-213.
117. Lee, J. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response / J. Lee [*et al.*] // *Nature Chemical Biology*. – 2013. – V. 9. – P. 339-343.
118. Lee, J. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa* / J. Lee, L. Zhang // *Protein and Cell*. – 2015. – V. 6. – P. 26-41.
119. Lee, J. Two cases of *Chromobacterium violaceum* infection after injury in a subtropical region / J. Lee [*et al.*] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1999. – V. 37. – N. 6. – P. 2068-2070.
120. Lequette, Y. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / Y. Lequette, E.P. Greenberg // *Journal of Bacteriology*. – 2005. – V. 187. – P. 37-44.
121. Lequette, Y. A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit / Y. Lequette [*et al.*] // *Journal of Bacteriology*. – 2006. – V. 188. – P. 3365-3370.
122. Li, L.L. Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR / L.L. Li, J.E. Malone, B.H. Iglewski // *Journal of Bacteriology*. – 2007. – V. 189. – P. 4367-4374.
123. Liang, H. Molecular mechanisms of master regulator VqsM mediating quorum-sensing and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* / H. Liang [*et al.*] // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – V. 42. – P. 10307-10320.
124. Lightbown, J.W. Inhibition of cytochrome systems of heart muscle and certain bacteria by the antagonists of dihydrostreptomycin: 2-alkyl-4-hydroxyquinoline N-oxides / J.W. Lightbown, F.L. Jackson // *Biochemical Journal*. – 1956. – V. 63. – P. 130-137.

125. Lindsay, A. Effect of *sdiA* on biosensors of N-acylhomoserine lactones / A. Lindsay, B.M.M. Ahmer // *Journal of Bacteriology*. – 2005. – V. 187. – N. 14. – P. 5054-5058.

126. Lithgow, J.K. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci / J.K. Lithgow [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2000. – V. 37. – P. 81-97.

127. Liu, X. Quorum-sensing signaling is required for production of the antibiotic pyrrolnitrin in a rhizospheric biocontrol strain of *Serratia plymuthica* / X. Liu [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. – 2007. – V. 270. – N. 2. – P. 299-305.

128. Liu, Z. Antibiotics at subinhibitory concentrations improve the quorum sensing behavior of *Chromobacterium violaceum* / Z. Liu [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. – 2013. – V. 341. – N. 1. – P. 37-44.

129. Manukhov, I.V. The N-terminal domain of *Aliivibrio fischeri* LuxR is a target of the groEL chaperonin / I.V. Manukhov [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2010. – V. 192. – N. 20. – P. 5549-5551.

130. March, J.C. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology / J.C. March, W.E. Bentley // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2004. – V. 15. – P. 495-502.

131. Mathesius, U. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum sensing signals / U. Mathesius [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2003. – V. 7. – P. 429-433.

132. Maura, D. Evidence for direct control of virulence and defense gene circuits by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulator, MvfR / D. Maura [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – P. 34083.

133. Maura, D. Pharmacological inhibition of the *Pseudomonas aeruginosa* MvfR quorum sensing system interferes with biofilm formation and potentiates antibiotic-mediated biofilm disruption / D. Maura, L.G. Rahme // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2017. – V. 61. – P. e01362-17.

134. McEwan, D.L. Host translational inhibition by *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A Triggers an immune response in *Caenorhabditis elegans* / D.L. McEwan, N.V. Kirienko, F.M. Ausubel // Cell Host Microbe. – 2012. – V. 187. –P. 37-44.
135. McKnight, S.L. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* / S.L. McKnight, B.H. Iglewski, E.C. Pesci // Journal of Bacteriology. – 2000. – V. 182. – P. 2702-2708.
136. Meiser, H. Pyrogallol concentrations in rumen content, liver and kidney of cows at pasture / H. Meiser, H.W. Hagedorn, R. Schulz // Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift. – 2000. – V. 113. – N. 3. – P. 108-111.
137. Miller, E.L. Eavesdropping and crosstalk between secreted quorum sensing peptide signals that regulate bacteriocin production in *Streptococcus pneumonia* / E.L. Miller [et al.] // The ISME Journal. – 2018. – V. 12. – P. 2363-2375.
138. Miller, S.T. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial Quorum-Sensing signal AI-2 / S.T Miller [et al.] // Molecular Cell. – 2004. – V. 15. – N. 5. – P. 677-687.
139. Moker, N. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules / N. Moker, C.R. Dean, J. Tao // Journal of Bacteriology. – 2010. – V. 192. – P. 1946-1955.
140. Monnet, V. Peptide conversations in Gram-positive bacteria / V. Monnet, V. Juillard, R. Gardan // Critical Reviews in Microbiology. – 2016. – V. 42. – P. 339-351.
141. Morohoshi, T. Inhibition of Quorum sensing in gram-negative bacteria by alkylamine-modified cyclodextrins / T. Morohoshi [et al.] // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2013. – V. 116. – N. 2. – P. 175-179.
142. Muimhneachain, E.O. Analogues of *Pseudomonas aeruginosa* signaling molecules to tackle infections / E.O. Muimhneachain [et al.] // Organic and Biomolecular Chemistry. – 2018. – V. 16. – P. 169-179.
143. Mukherji, R. A rapid iodometric method for qualitative detection of AHL lactonases / R. Mukherji, A. Prabhune // World Journal of Pharmaceutical Research. – 2013. – V. 3. – N. 1. – P. 1126-1132.

144. Murugayah, S.A. Optimisation of a high-throughput fluorescamine assay for detection of N-acyl-L-homoserine lactone acylase activity / S.A. Murugayah, S.L. Warring, M.L. Gerth // *Analytical Biochemistry*. – 2019. – V. 566. – P. 10-12.
145. Ni, N. Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi* / N. Ni [et al.] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2008. – V. 18. – N. 5. – P. 1567-1572.
146. Norizan, S.N.M. Caffeine as a potential quorum sensing inhibitor / S.N.M. Norizan, W.-F. Yin, K.-G. Chan // *Sensors*. – 2013. – V. 13. – P. 5117-5129.
147. Oschner, U.A. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* / U. A. Oschner [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 1994. – V. 176. – P. 2044-2054.
148. Palla, M. Quorum sensing in rhizobia isolated from the spores of the mycorrhizal symbiont *Rhizophagus intraradices* / M. Palla [et al.] // *Mycorrhiza*. – 2018. – V. 28. – P. 773-778.
149. Papenfort, K. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria / K. Papenfort, B.L. Bassler // *Nature Reviews Microbiology*. – 2016. – V. 14. – N. 9. – P. 576-88.
150. Park, P.W. Syndecan-1 shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa* / P.W. Park [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – V. 275. – P. 3057-3064.
151. Park, S.Y. Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces spp.* and its application to quorum quenching / S.Y. Park [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71. – P. 2632-2641.
152. Patankar, A.V. Orphan LuxR regulators of quorum sensing / A.V. Patankar, J.E. Gonzalez // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2009. – V. 33. – P. 739-756.
153. Pearson, J.P. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes / J.P. Pearson [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1994. – V. 91. – P. 197-201.

154. Pesci, E.C. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa* / E.C. Pesci [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1999. – V. 96. – P. 11229-11234.
155. Pesci, E.C. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* / E.C. Pesci [et al.] // Journal of Bacteriology. – 1997. – V. 179. – P. 3127-3132.
156. Plener, L. The phosphorylation flow of the *Vibrio harveyi* quorum-sensing cascade determines levels of phenotypic heterogeneity in the population / L. Plener [et al.] // Journal of Bacteriology. – 2015. – V. 197. – P. 1747-1756.
157. Poole, K. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* / K. Poole [et al.] // Molecular Microbiology. – 1996. – V. 21. – P. 713-724.
158. Poomthongdee, N. Acidophilic actinomycetes from rhizosphere soil: diversity and properties beneficial to plants / N. Poomthongdee, K. Duangmal, W. Pathom-aree The Journal of Antibiotics. – 2015. – V. 68. – N. 2. – P. 106-114.
159. Proctor, C.R. Furanone quorum-sensing inhibitors with potential as novel therapeutics against *Pseudomonas aeruginosa* / C.R. Proctor, P.A. McCarron, N.G. Ternan // Journal of Medical Microbiology. – 2020. – V. 69. – P. 195-206.
160. Quecan, B.X.V. Bioactive phytochemicals targeting microbial activities mediated by quorum sensing / B.X.V. Quecan, M.L.C. Rivera, U.M. Pinto // Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors. – 2018. – P. 397-416.
161. Rampioni, G. RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* / G. Rampioni [et al.] // Molecular Microbiology. – 2007. – V. 66. – P. 1557-1565.
162. Reen, F.J. Coumarin: a novel player in microbial Quorum sensing and biofilm formation inhibition / F.J. Reen [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2018. – V. 102. – N. 5. – P. 2063-2073.
163. Remy, B. Interference in bacterial quorum sensing: a biopharmaceutical perspective / B. Remy [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2018. – V. 9. – N. 203. – P. 1-17.

164. Reuter K. Interfering with bacterial quorum sensing / K. Reuter, A. Steinbach, V. Helms // *Perspectives in Medicinal Chemistry*. – 2016. – V. 8. – P. 1-15.
165. Rivera-Utrilla, J. Activated carbon modifications to enhance its water treatment applications. An overview / J. Rivera-Utrilla [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2011. – V. 187. – P. 1-23.
166. Ryall, B. *Pseudomonas aeruginosa*, cyanide accumulation and lung function in CF and non-CF bronchiectasis patients / B. Ryall [et al.] // *European Respiratory Journal*. – 2008. – V. 32. – P. 740-747.
167. Schauder, S. The LuxS-family of bacterial autoinducers: Biosynthesis of a novel quorum sensing signal molecule / S. Schauder [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2001. – V. 41. – N. 2. – P. 463-476.
168. Schuster, M. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa* / M. Schuster, E.P. Greenberg // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2006. – V. 296. – P. 73-81.
169. Schuster, M. Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon / M. Schuster, E.P. Greenberg // *BMC Genomics*. – 2007. – V. 8. – N. 287. – P. 1-11.
170. Schuster, M. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis / M. Schuster [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2003. – V. 185. – P. 2066-2079.
171. Schuster, M. Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR / M. Schuster, M.L. Urbanowski, E.P. Greenberg // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2004. – V. 101. – P. 15833-15839.
172. Seet, Q. Anti-activator QslA defines the quorum sensing threshold and response in *Pseudomonas aeruginosa* / Q. Seet, L.H. Zhang // *Molecular Microbiology*. – 2011. – V. 80. – P. 951-965.
173. Selvaraj, S. Vibrational (FT-IR and FT-Raman), electronic (UV-vis) and quantum chemical investigations on pyrogallol: A study on benzenetriol dimers / S. Selvaraj [et al.] // *Vibrational Spectroscopy*. – 2018. – V. 95. – P. 16-22.

174. Senderovich, H. Is there a role for charcoal in palliative diarrhea management? / H. Senderovich, M.J. Vierhout // *Current Medical Research and Opinion*. – 2018. – V. 34. – N. 7. – P. 1253-1259.

175. Shaobin, W. The physical and surface chemical characteristics of activated carbons and the adsorption of methylene blue from wastewater / W. Shaobin [*et al.*] // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2005. – V. 284. – P. 440-446.

176. Shen, L. Modulation of secreted virulence factor genes by subinhibitory concentrations of antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* / L. Shen [*et al.*] // *Journal of Microbiology*. – 2008. – V. 46. – P. 441-447.

177. Shin, D. N-Acyl homoserine lactone analog modulators of the *Pseudomonas aeruginosa* RhII quorum sensing signal synthase / D. Shin [*et al.*] // *ACS Chemical Biology*. – 2019. – V. 14. – N. 10. – P. 2305-2314.

178. Shin, M. Plant-inspired pyrogallol-containing functional materials / M. Shin, E. Park, H. Lee // *Advanced functional materials*. – 2019. – V. 29. – N. 43. – P. 1-26.

179. Silva, A.J. *Vibrio cholerae* biofilms and *Cholera* pathogenesis / A.J. Silva, J.A. Benitez // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. – 2016. – V. 10. – N. 2. – P. e0004330.

180. Sio, C.F. Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / C.F. Sio [*et al.*] // *Infection and Immunity*. – 2006. – V. 74. – P. 1673-1682.

181. Skindersoe, M.E. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* / M.E. Skindersoe [*et al.*] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2008. – V. 52. – P. 3648-3663.

182. Solomonson, L.P. Cyanide as a metabolic inhibitor / L.P. Solomonson [*et al.*] // *Academic Press*. – 1981. – P. 11-28.

183. Starkey, M. Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity / M. Starkey [*et al.*] // *PLOS Pathogens*. – 2014. – V. 10. – P. e1004321.

184. Stauff, D.L. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor / D.L. Stauff, B.L. Bassler // *Journal of Bacteriology*. – 2011. – V. 193. – P. 3871-3878.
185. Stenvang, M. Epigallocatechin gallate remodels overexpressed functional amyloids in *Pseudomonas aeruginosa* and increases biofilm susceptibility to antibiotic treatment / M. Stenvang [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – V. 291. – P. 26540-26553.
186. Surette, M.G. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production / M.G. Surette, M.B. Miller, B.L. Bassler // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1999. – V. 96. – N. 4. – P. 1639-1644.
187. Sviridova, T. Cytotoxicity of N-dodecanoyl-L-homoserine lactone and 5-N-dodecyl resorcinol to human granulocytes and monocytes: a comparative study / T. Sviridova [et al.] // *Central-European Journal of Immunology*. – 2013. – V. 38. – N. 3. – P. 310-316.
188. Swain, B. Urinary tract infection by *Chromobacterium violaceum* / B. Swain [et al.] // *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. – 2014. – V. 8. – N. 8. – P. 1-2.
189. Swatton, J.E. Impact of azithromycin on the quorum sensing controlled proteome of *Pseudomonas aeruginosa* / J.E. Swatton // *PLoS ONE*. – 2016. – V. 11. – N. 1. – P. e0147698.
190. Sztajer, H. Autoinducer-2-regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the *luxS* mutation / H. Sztajer [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2008. – V. 190. – P. 401-415.
191. Tallarida, R.J. An overview of drug combination analysis with isobolograms: perspectives in pharmacology / R.J. Tallarida // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2006. – V. 3. – N. 19. – P. 1-7.
192. Tang, K. Quorum quenching agents: resources for antivirulence therapy / K. Tang, X. Zhang // *Marine Drugs*. – 2014. – V. 12. – P. 3245-3282.

193. Tang, K. A culture-dependent method for the identification of quorum quenching enzymes of microbial origin / K. Tang, X.H. Zhang // *Methods in Molecular Biology*. – 2018. – V. 1673. – P. 297-309.
194. Tiaden, A. α -Hydroxyketone synthesis and sensing by *Legionella* and *Vibrio* / A. Tiaden, H. Hilbi // *Sensors*. – 2012. – V. 12. – P. 2899-2919.
195. Tian, D. Coumarin analogues from the *Citrus grandis* (L.) osbeck and their hepatoprotective activity / D. Tian [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2019. – V. 67. – N. 7. – P. 1937-1947.
196. Tinh, N.T.N. In vitro characterization of a recombinant AHL-Lactonase from *Bacillus cereus* isolated from a striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) Pond / N.T.N. Tinh [et al.] // *Indian Journal of Microbiology*. – 2013. – V. 53. – P. 485-487.
197. Tolmacheva, A.A. Antibacterial and quorum sensing regulatory activities of some traditional eastern-european medicinal plants / A.A. Tolmacheva [et al.] // *Acta Pharmaceutica*. – 2014. – V. 64. – N 2. – P. 173-186.
198. Uroz, S. N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities / S. Uroz [et al.] // *Microbiology*. – 2005. – V. 151. – P. 3313-3322.
199. Utari, P.D. Deciphering physiological functions of ahl quorum quenching acylases / P.D. Utari, J. Vogel, W.J. Quax // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 1123.
200. Vатtem, D.A. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors / D.A. Vатtem [et al.] // *Fitoterapia*. – 2007. – V. 78. – P. 302-310.
201. Ventre, I. Dimerization of the quorum sensing regulator RhlR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy / I. Ventre [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2003. – V. 48. – P. 187-198.
202. von Bodman, S.B. Cell-cell communication in bacteria: united we stand / S.B. von Bodman, J.M. Willey, S.P. Diggle // *Journal of Bacteriology*. – 2008. – V. 190. – P. 4377-4391.

203. Wade, D.S. Regulation of *Pseudomonas quinolone* signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* / D.S. Wade [et al.] // Journal of Bacteriology. – 2005. – V. 187. – P. 4372-4380.
204. Wai-Leung, N. Bacterial quorum sensing network architectures / N. Wai-Leung, B.L. Bassler // Annual Review of Genetics. – 2009. – V. 43. – P. 197-222.
205. Wang, J.-H. Inhibition of biofilm in *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 by diketopiperazines / J.-H. Wang [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2016. – V. 32. – N. 9. – P. 143.
206. Waters, C.M. Quorum sensing cell-to-cell communication in bacteria / C.M. Waters, B.L. Bassler // Annual Review of Cell and Developmental Biology. – 2005. – V. 21. – P. 319-346.
207. Wei, Y. Mechanism of *Vibrio cholera* autoinducer-1 biosynthesis / Y. Wei [et al.] // ACS Chemical Biology. – 2011. – V. 16. – P. 356-365.
208. Weigel, W.A. QseBC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in *Enterobacteriaceae* and *Pasteurellaceae* / W.A. Weigel, D.R. Demuth // Molecular Oral Microbiology. – 2015. – V. 31. – N. 5. – P. 379-397.
209. Welsh, M.A. Chemical probes of quorum sensing: from compound development to biological discovery / M.A. Welsh, H.E. Blackwell // FEMS Microbiology Reviews. – 2016. – V. 40. – N. 5. – P. 774-794.
210. Whitehead, N.A. The regulation of virulence in phytopathogenic erwinia species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations / N.A. Whitehead [et al.] // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2002. – V. 81. – N. 1-4. – P. 223-231.
211. Whiteley, M. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* / M. Whiteley, K.M. Lee, E.P. Greenberg // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1999. – V. 96. – P. 13904-13909.
212. Whiteley, M. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research / M. Whiteley, S.P. Diggle, E.P. Greenberg // Nature. – 2017. – V. 551. – N. 7680. – P. 313-320.

213. Whiteley, M. Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes / M. Whiteley, E.P. Greenberg // Journal of Bacteriology. – 2001. – V. 183. – P. 5529-5534.
214. Winson, M.K. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa* / M. K. Winson [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1995. – V. 92. – P. 9427-9431.
215. Winzer, K. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS / K. Winzer [et al.] // Journal of Bacteriology. – 2000. – V. 182. – P. 6401-6411.
216. Wisniewski-Dye, F. *railR* genes are part of a quorum-sensing network controlled by cinI and cinR in *Rhizobium leguminosarum* / F. Wisniewski-Dye [et al.] // Journal of Bacteriology. – 2000. – V. 184. – P. 1597-1606.
217. Wolz, C. Iron release from transferrin by pyoverdinin and elastase from *Pseudomonas aeruginosa* / C. Wolz [et al.] // Infection and Immunity. – 1994. – V. 62. – P. 4021-4027.
218. Xavier, K.B. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game / K.B. Xavier, B.L. Bassler // Current Opinion in Microbiology. – 2003. – V. 6. – N. 2. – P. 191-197.
219. Xiao, G. Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* *mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry / G. Xiao, J. He, L.G. Rahme // Microbiology. – 2006. – V. 152. – P. 1679-1686.
220. Xiao, G. MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands / G. Xiao [et al.] // Molecular Microbiology. – 2006. – V. 62. – P. 1689-1699.
221. Xin-Mei, P. Current developments of coumarin compounds in medicinal chemistry / P. Xin-Mei, L.V.D. Guri, H.Z. Cheng // Current Pharmaceutical Design. – 2013. – V. 19. – N. 21. – P. 3884-3930.

222. Yanagihara, K. Role of elastase in a mouse model of chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection that mimics diffuse panbronchiolitis / K. Yanagihara [et al.] // Journal of Medical Microbiology. – 2003. – V. 52. – P. 531-535.

223. Yang, C.-H. *Chromobacterium violaceum* infection: A clinical review of an important but neglected infection / C.-H. Yang, Y.-H. Li // Journal of the Chinese Medical Association. – 2011. – V. 74. – P. 435-441.

224. Yang, F. Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species / F. Yang [et al.] // FEBS Letters. – 2005. – V. 579. – P. 3713-3717.

225. Yim, G. Antibiotics as signalling molecules / G. Yim, H.H. Wang, J. Davies // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2007. – V. 362. – P. 1195-1200.

226. Zhang, B. Synthesis and biological evaluation of azamacrolide comprising the triazole moiety as quorum sensing inhibitors / B. Zhang [et al.] // Molecules. – 2018. – V. 23. – P. 1086.

227. Zhang, S. Quorum sensing-disrupting coumarin suppressing virulence phenotypes in *Vibrio splendidus* / S. Zhang [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2016. – V. 101. – N. 8. – P. 3371-3378.

228. Zhao, G.Q. The receptors for mammalian sweet and umami taste / G.Q. Zhao [et al.] // Cell. – 2003. – V. 115. – P. 255-266.

229. Zhou, L. The DSF family of quorum sensing signals: diversity, biosynthesis, and turnover / L. Zhou [et al.] // Trends in Microbiology. – 2017. – V. 25. – P. 293–303.

230. Zhou, S. *Bacillus spp.* QSI-1 modulate quorum sensing signals reduce *Aeromonas hydrophila* level and alter gut microbial community structure in fish / S. Zhou [et al.] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2016. – V. 6. – P. 184.