
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

СИСТЕМА “КВОРУМ СЕНСИНГА” У *CHROMOBACTERIUM SUBTSUGAE* (РАНЕЕ *C. VIOLACEUM*) ИНГИБИРУЕТСЯ ГАММА-ЛАКТОНАМИ – МИНОРНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ ЭВКАЛИПТА

© 2023 г. К. С. Инчагова^а, Г. К. Дускаев^а, Д. Г. Дерябин^{а, *}

^аФедеральный научный центр биологических систем и агротехнологий
Российской академии наук, Оренбург, 460000 Россия

*e-mail: dgderabin@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.08.2022 г.

После доработки 01.09.2022 г.

Принята к публикации 01.09.2022 г.

Целью работы является исследование природы ингибирования системы “кворум сенсинга” (QS) модельной бактерии *Chromobacterium subtsugae* 026 (ранее – *C. violaceum* 026) экстрактом листьев эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill) с идентификацией в его составе молекул с соответствующим вариантом биологической активности. Тестирование цельного экстракта показало выраженную QS-ингибирующую активность, развивающуюся в широком диапазоне концентраций, в несколько десятков раз ниже требуемых для подавления бактериального роста (соотношение МИК₅₀/ЕС₅₀ = 43.6). Химический анализ обнаруживал в экстракте присутствие шести малых молекул растительного происхождения (пирогаллол, 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-1, цимол, 4-((1E)-3-гидрокси-1-пропенил)-2-метоксифенол, галловая и пальмитиновая кислоты). QS-ингибирующий эффект этих соединений в отношении *Chromobacterium* spp. ранее был показан в экспериментах *in vitro* или предсказан на моделях *in silico*. Среди минорных компонентов анализируемого экстракта идентифицированы γ -капролактон и γ -октанолактон, структуры которых демонстрировали сходство с аутоиндукторами QS – ацилированными гомосеринлактонами. Исследование химически синтезированных аналогов данных молекул в биотесте на *C. subtsugae* 026 впервые показало наличие у них QS-ингибирующей активности, характеризуемой величинами ЕС₅₀ = 354.2 и 145.6 мкг/мл соответственно. Обогащение цельного экстракта листьев эвкалипта прутовидного γ -капролактоном или γ -октанолактоном существенно усиливало QS-ингибирующее действие подобных композиций, при изоболографическом анализе оцениваемое как взаимодополняющий (аддитивный) или взаимно потенцируемый (супераддитивный) эффекты.

Ключевые слова: quorum sensing, *Chromobacterium subtsugae*, *Eucalyptus viminalis*, γ -капролактон, γ -октанолактон

DOI: 10.31857/S0026365622600626, **EDN:** NMRUHT

“Кворум сенсинг” (англ.: quorum sensing, QS) – это процесс химической коммуникации между бактериальными клетками, основанный на осуществляемых ими биосинтезе, секреции, рецепции и скоординированном ответе на малые сигнальные молекулы, называемые аутоиндукторами (Whiteley et al., 2018). Итоговым результатом подобного взаимодействия является синхронное изменение профиля транскрипционной активности бактериальной популяции, наделяющее прокариотические сообщества некоторыми свойствами многоклеточных организмов (Mukherjee, Bassler, 2019).

Известным таксоном, реализующим феномен “кворум сенсинга”, является род *Chromobacterium*, у представителей которого межклеточная коммуникация опосредуется аутоиндукторами из группы ацилированных гомосеринлактонов (АГЛ),

образуемых синтазой CviI и воспринимаемых белком-рецептором CviR. Последний, присутствующий в цитоплазме бактериальных клеток в виде гомодимера, после взаимодействия с двумя молекулами АГЛ переходит из “закрытой” в “открытую” конформацию и связывается С-концевыми доменами с хромосомной ДНК в зонах палиндромов STGNCCNNNNGGNCAG, где активирует транскрипцию расположенных рядом генов: системы секреции VI типа (CV_1432), хитиназы (CV_4240), транскрипционного регулятора (CV_0577) и гуаниндезаминазы (CV_0578), а также синтазы *cviI*, что в последнем случае формирует каноническую петлю положительной обратной связи аутоиндукции (Stauff, Bassler, 2011). Наиболее же известным фенотипическим проявлением, находящимся под контролем “кворум

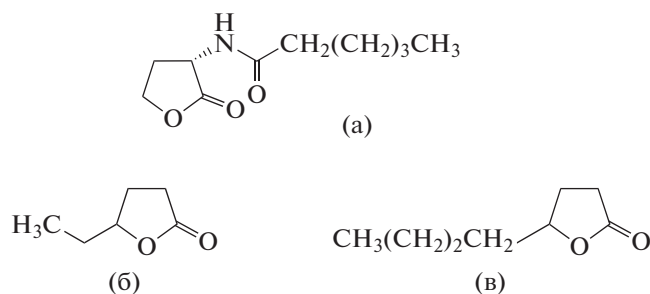


Рис. 1. Структурные формулы N-гексаноил-L-гомосерин лактона (а), γ -капролактона (б) и γ -октанолактона (в).

сенсинга” у *Chromobacterium* spp., является образование сине-фиолетового пигмента виолацеина, синтезируемого из аминокислоты триптофана под контролем *vioABCDE*-оперона, промотор которого также имеет сайт для специфического связывания белка CviR (Swem et al., 2009).

Поскольку биосинтез виолацеина позволяет прямо оценивать активность системы QS, хорошо визуально обнаруживается и доступен для количественной регистрации, основанный на нем биотест стал популярной моделью при исследовании различных аспектов “кворум сенсинга” у бактерий (Kothari et al., 2017). При этом наиболее востребованным для указанных целей является лабораторный штамм *C. violaceum* 026, производный от “дикого” изолята *C. violaceum* ATCC 31532, но, в отличие от последнего, имеющий инсерцию транспозона mini-Tn5 в гене синтазы *cviI* (McClellan et al., 1997). В результате указанного мутационного события *C. violaceum* 026 утратил способность к образованию собственного автоиндуктора N-гексаноил-L-гомосеринлактона (C_6 -АГЛ) и, как следствие, спонтанному синтезу пигмента виолацеина, но сохранил возможность его восстановления в присутствии экзогенно вносимого C_6 -АГЛ. Несколько лет назад *C. violaceum* ATCC 31532 и производный от него лабораторный штамм CV026 были реклассифицированы как *C. subtsugae* (Hargison, Soby, 2020) с сохранением за ними исходных номеров в международных коллекциях и неизменности представлений о реализуемых ими механизмах межклеточной химической коммуникации.

Одним из направлений использования биотеста на основе *C. subtsugae* 026 является поиск ингибиторов “кворум сенсинга”, актуальность которого определяется наличием аналогичных стереотипно устроенных систем у широкого круга зоопатогенных и фитопатогенных протеобактерий, использующих химическую коммуникацию для скоординированной экспрессии факторов вирулентности и образования биопленок (Remy et al., 2018). При этом на фоне разнообразия предлагаемых подхо-

дов, включающих химическую инактивацию автоиндукторов, блокаду воспринимающих их рецепторных белков, а также запускаемых ими внутриклеточных сигнальных каскадов (Zhou et al., 2020), привлекательной альтернативой является поиск природных ингибиторов “кворум сенсинга”, присутствующих в составе лекарственных растений, используемых традиционной (народной) медициной для терапии широкого спектра инфекционных состояний (Дерябин и соавт., 2021). В частности, в одной из наших предшествующих работ скрининг широкого спектра восточно-европейских лекарственных растений показал наиболее выраженную способность к ингибированию “кворум сенсинга” у экстрактов коры дуба и листьев эвкалипта (Tolmacheva et al., 2014). В свою очередь химический анализ экстракта коры дуба позволил идентифицировать в нем молекулярную композицию из семи биоактивных соединений, в совокупности воспроизводящих не менее 95% QS-ингибирующего эффекта исходного растительного экстракта (Deryabin, Tolmacheva, 2015).

Целью настоящего исследования явилось продолжение работ в обозначенном направлении, а именно – анализ природы QS-ингибирующей активности экстракта листьев эвкалипта с идентификацией в нем известных и новых растительных молекул, эффективно ингибирующих “кворум сенсинг” в биотесте на *C. subtsugae* 026 (ранее – *C. violaceum* 026).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальный штамм. В работе использован лабораторный штамм *C. subtsugae* 026 = NCTC 13274, полученный из National Collection of Type Cultures (UK Health Security Agency, Великобритания). Его генетические особенности, включающие инсерцию транспозона mini-Tn5 в ген синтазы *cviI*, а также сохранение функциональных *cviR* гена и *vioABCDE*-оперона, описаны выше.

Культивирование данного штамма проводили на LB-бульоне при 27°C. Индукцию QS-контролируемого биосинтеза виолацеина запускали внесением химически синтезированного аналога C_6 -АГЛ с чистотой $\geq 98\%$ (CAS 147852-83-3) (“Cauman Chemicals”, США), структурная формула которого приведена на рис. 1а.

Растительный материал. Объектом исследования являлись листья эвкалипта прутовидного (международное название согласно APG II – *Eucalyptus viminalis* Labill), находящиеся в сухом измельченном виде в составе коммерчески доступного препарата производства АО “Красногорсклексредства” (Россия); № ЛСР-000609/08, дата выпуска – 11/2021.

Для получения экстракта, в соответствии с инструкцией производителя, к 24 г растительного материала добавляли 200 мл стерильной дистиллированной воды, кипятили на водяной бане (100°C) в течение 15 мин, после чего охлаждали при комнатной температуре в течение 45 мин. Полученный водный экстракт центрифугировали при 1000 об./мин в течение 10 мин для удаления твердых частиц, а супернатант дополнительно фильтровали через шприцевой фильтр из полиэфирсульфона (“Membrane Solutions LLC”, США) с размером пор 0.4 мкм. Полученный экстракт высушивали при 60°C, взвешивали (выход составил 2.94 г или 12.25% от веса исходного растительного материала) и хранили при –20°C. Дальнейшие эксперименты выполняли исходя из весовых характеристик сухого экстракта, перерабатывая его в метаноле (для химического анализа) или стерильной дистиллированной воде (для биологического тестирования).

Химический анализ. Исследование компонентного состава экстракта листьев эвкалипта прутовидного проводили методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС).

Предварительно 10 мг исследуемого сухого экстракта вносили в 1 мл метанола и тщательно перемешивали. Последующий анализ выполняли с использованием газового хроматографа с масс-селективным детектором QCMS-QP 2010 Plus (“Shimadzu”, Япония), снабженного колонкой HP-5MS (длина 30.0 м, диаметр 0.25 мм). Исследуемый образец объемом 10 мкл вводили в аналитическую ячейку хроматографа с помощью микрошприца Gastight 1700 (“Hamilton”, США). В качестве газа-носителя использовали гелий (99.999%) при постоянной скорости потока 1 мл/мин. Исходная температура печи колонки составляла 100°C; температуру повышали со скоростью 20°C/мин до 290°C. Инжектор устанавливали на 200°C, а детектор на 290°C.

Первичную обработку полученных хроматограмм и масс-спектров проводили с использованием штатного программного обеспечения: GC-MS Solutions и GC-MS PostRun Analysis (“Shimadzu”, Япония). Окончательную идентификацию соединений осуществляли путем сопоставления времени их удерживания и характерных масс-спектров, представленных в библиотеках NIST, Mainlib, CAS, Wiley9 и DD2012. Относительное присутствие отдельных идентифицированных компонентов в экстракте выражали в процентах, соответствующих площади определенного пика в сравнении с суммарной площадью всех пиков на хроматограмме.

Химические соединения — аналоги малых молекул растительного происхождения. По результатам химического анализа в исследование были включены γ -капролактон (CAS: 695-06-7) и γ -октано-

лактон (CAS: 104-50-7) со степенью чистоты 98 и 97% соответственно, предоставленные “Sigma-Aldrich” (США). Структурные формулы этих молекул приведены на рис. 1б, 1в.

Исследование антибактериальной и QS-ингибирующей активностей растительного экстракта и малых молекул растительного происхождения в биотесте на *C. subtsugae* 026 проводилось методом серийных разведений в жидкой питательной среде, что позволило количественно охарактеризовать выраженность искомых эффектов величинами минимальных рост-ингибирующих (МИК) и эффективных QS-ингибирующих концентраций (ЕС).

На подготовительном этапе в LB-бульоне формировали серии двукратных разведений исследуемого растительного экстракта или малых молекул растительного происхождения в диапазоне концентраций от 0.3 до 10000 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. На следующем этапе подготовленными пробами в объемах по 100 мкл заполняли ячейки стерильных 96-луночных планшетов (“Jet Biofil”, Канада-Китай), в которые дополнительно вносили по 100 мкл C_6 -АГЛ в концентрации 0.02 мкг/мл и инокулировали 20 мкл суточной культуры *C. subtsugae* 026. Для развития анализируемых эффектов в отношении используемого тест-штамма в условиях его контролируемой индукции планшеты инкубировали при 27°C в течение 1 сут.

Оценку результатов эксперимента проводили с использованием многофункционального микропланшетного ридера Infinite 200 PRO (“Tecan”, Австрия), последовательно регистрируя: (1) оптическую плотность биомассы при 450 ± 5 нм как показатель влияния исследуемых компонентов на рост тест-штамма; (2) количество пигмента виолацеина после его этанольной экстракции при 600 ± 5 нм как показатель влияния на активность системы “кворум сенсинга”. Для этого биомассу осаждали при 13000 об./мин в течение 5 мин, супернатант удаляли, пигмент извлекали путем добавления к каждой пробе по 230 мкл 96% этанола, после чего депигментированную биомассу осаждали центрифугированием в том же режиме, а полученный этанольный экстракт переносили в ячейки 96-луночного планшета для измерений. Значения поглощения отрицательного контроля вычитали, значения положительного контроля принимали за 100%.

При исследовании эффектов композиций из растительного экстракта и малых молекул растительного происхождения их в объемах по 100 мкл попарно вносили в лунки стерильных 96-луночных планшетов в перпендикулярных друг другу направлениях, в результате чего сформирован-

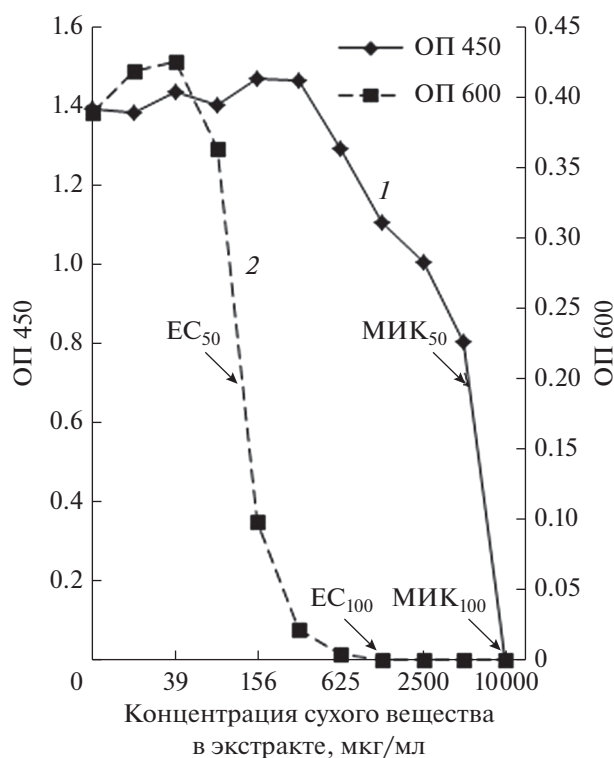


Рис. 2. Оценка рост-ингибирующего и QS-ингибирующего эффектов цельного экстракта эвкалипта прутовидного в биотесте на *C. subtsugae* 026. Обозначения: по оси абсцисс — концентрации действующих соединений (мкг/мл); по оси ординат слева, сплошная линия на графиках (1) — оптическая плотность биомассы (ОП₄₅₀); по оси ординат справа, пунктирная линия на графиках (2) — оптическая плотность пигмента (ОП₆₀₀).

ные объемы по 200 мкл содержали различные концентрационные соотношения. Пробами сравнения являлись ряды разведений, содержащие только один из тестируемых компонентов, а также положительный и отрицательный контроли. Дальнейшие инокуляцию *C. subtsugae* 026, его индукцию С₆-АГЛ, культивирование и учет результатов исследования проводили, как описано выше.

Статистическая обработка результатов исследования. Все эксперименты выполнены не менее чем в пяти повторностях. Полученные результаты обработаны в программе Excel для Windows 10. Антибактериальный эффект выражен значениями МИК₅₀ и МИК₁₀₀, соответствующими 50 и 100% подавления роста тест-штамма. В свою очередь, QS-ингибирующая активность охарактеризована величинами ЕС₅₀ и ЕС₁₀₀, соответствующими аналогичной интенсивности воздействия на биосинтез пигмента виолацеина в растущей культуре. Эффекты композиций растительного экстракта и малых молекул растительного происхождения оценены методом изоболографического анализа (Tallarida, 2006), предусматривающим

учет расположения результативных точек в системе координат, описывающих значения ЕС₅₀ для каждого из исследованных компонентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн исследования предусматривал использование биотеста на *C. subtsugae* 026 для первичной характеристики цельного экстракта листьев эвкалипта прутовидного, идентификацию присутствующих в нем природных компонентов с последующим доказательством собственной биоактивности отдельных обнаруженных химических соединений или сформированных на их основе композиций.

Анализ эффектов цельного растительного экстракта в биотесте на *C. subtsugae* 026. Выполнение количественного биотеста на жидкой питательной среде с использованием предварительно высушенного экстракта листьев эвкалипта прутовидного в концентрациях от 0.3 до 10000 мкг/мл позволило констатировать существование широкого диапазона концентраций, в котором его QS-ингибирующая активность развивалась в отсутствие или при слабой выраженности рост-ингибирующего эффекта (рис. 2). Так, если для полного подавления бактериального роста (МИК₁₀₀) требовалась максимальная концентрация тестируемого экстракта, то абсолютное блокирование биосинтеза виолацеина (ЕС₁₀₀) достигалось уже в концентрации 1250 мкг/мл (табл. 1). В свою очередь, концентрация экстракта, обуславливающая 50%-ое ингибирование QS-контролируемого биосинтеза пигмента виолацеина в биотесте на *C. subtsugae* 026, составляла 130 мкг/мл против 5666.7 мкг/мл, требующихся для 50%-го подавления бактериального роста (соотношение МИК₅₀/ЕС₅₀ = 43.6). Следует также отметить, что если рост-ингибирующий эффект развивался при концентрациях, лишь незначительно уступающих присутствию экстрагируемых компонентов в препарате, приготовленном в соответствии с инструкцией производителя (по сухому веществу 14700 мкг/мл), то QS-ингибирующая активность сохранялась при его более чем 100-кратном разведении.

Тем самым результаты проведенного исследования расширяют представления о природе биологической (в т.ч. терапевтической) активности экстрактов листьев эвкалипта. При этом полученные данные хорошо согласуются с недавно описанным QS-ингибирующим действием экстракта листьев эвкалипта клубовидного (*Eucalyptus camaldulensis*), в биотесте на *C. subtsugae* 026 развивающимся в сходном диапазоне концентраций — от 97 до 780 мкг/мл (Moradi et al., 2020). Аналогичные эффекты зафиксированы и при исследовании экстракта листьев эвкалипта шаровидного (*Eucalyptus globulus*), ингибирующее дей-

Таблица 1. Характеристика эффектов экстракта листьев эвкалипта прутовидного и идентифицированных в его составе γ -лактонов в количественном биотесте на *C. subtsugae* 026

Исследуемый экстракт или химическое соединение	Параметры рост-ингибирующей активности, мкг/мл		Параметры QS-ингибирующей активности, мкг/мл	
	МИК ₁₀₀	МИК ₅₀	ЕС ₁₀₀	ЕС ₅₀
Экстракт листьев эвкалипта прутовидного	10000	5666.7	1250	130
γ -Капролактон	10000	2666.7	2500	354.2
γ -Октанолактон	5000	708.3	625	145.6

ствии которого на биосинтез виолацеина у дикого штамма *C. violaceum* ATCC 12472 дополнялось подавлением QS-контролируемого роения, образования пиоцианина и формирования биопленки у коллекционных и клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* со стереотипно организованными системами плотностно-зависимой химической коммуникации (Sagar et al., 2022).

Химический анализ экстракта листьев эвкалипта прутовидного. Использование метода ГХ-МС обеспечило достаточно высокое разрешение между большинством компонентов (пиков) на полученной хроматограмме, среди которых 31 соединение со временем удержания на колонке в диапазоне от 2.595 до 11.070 мин были идентифицированы с вероятностью не менее 80%.

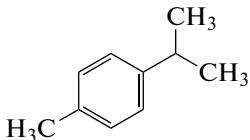
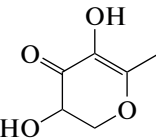
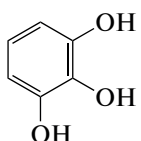
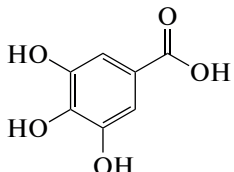
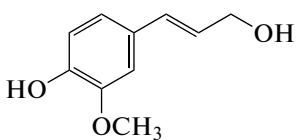
Наиболее значительным присутствием в анализируемом экстракте характеризовались четыре соединения: гидроксиметилфурфурол (время удержания 4.830 мин; относительное содержание 4.2%), 1,2,3-бензентриол/пирогаллол (время удержания 5.990 мин; относительное содержание 4.0%), 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-1 (время удержания 4.180 мин; относительное содержание 3.8%) и розифолиол (время удержания 8.935 мин; относительное содержание 3.8%). Пятое соединение со временем удержания на колонке 7.600 мин, также характеризующееся относительно высоким содержанием в анализируемом экстракте (6.4%), идентифицировалось с вероятностью менее 75%, в связи с чем было исключено из последующего анализа.

При этом для двух из названных компонентов различные варианты QS-ингибирующей активности ранее уже были экспериментально показаны, или ее наличие предполагалось по результатам молекулярного докинга (табл. 2). Наиболее хорошо подобные эффекты документированы для пирогаллола, биосинтетически связанного с галловой кислотой (которая также обнаруживается в анализируемом экстракте) и образующегося при ее декарбонизации в процессе частичной ферментации растительного сырья (Tor et al., 1996). Впервые ингибирующее воздействие пирогаллола и его аналогов на систему “кворум сен-

синга” описано на примере морской люминесцирующей бактерии *Vibrio harveyi* (Ni et al., 2008) и после критического обсуждения (Defoirdt et al., 2013; Bali et al., 2019) подтверждено в биотесте на *C. subtsugae* 026 (Инчагова и соавт., 2019). В свою очередь аналогичная активность 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-1 к настоящему времени проанализирована только на модели *in silico*, показавшей возможность его результативного связывания с рецепторным белком CviR у *C. violaceum* ATCC 12472 (Mashamba et al., 2022), но пока не получившей своего экспериментального подтверждения на моделях *in vitro*.

Среди других 27 компонентов, характеризующихся относительным содержанием в диапазоне 0.4–2.8%, по результатам проведенного химического анализа было идентифицировано еще 4 соединения с ранее показанной активностью в отношении системы “кворум сенсинга” у *Chromobacterium* spp. (табл. 2). Подобное заключение было сделано в отношении 1-метил-4-пропан-2-илбензола/цимола (время удержания 3.185 мин; относительное содержание 0.2%), описанного среди растительных монотерпенов, подавляющих QS-контролируемый биосинтез виолацеина у *C. violaceum* ATCC 12472 (Ahmad et al., 2015); 4-((1E)-3-гидрокси-1-пропенил)-2-метоксифенола, известного также как “конифероловый спирт” (время удержания 8.410 мин; относительное содержание 1.3%) и ранее показавшего свою активность в биотесте на *C. subtsugae* 026 (Deryabin, Tolmacheva, 2015); 3,4,5-тригидроксибензойной/галловой кислоты (время удержания 6.895 мин; относительное содержание 0.1%), на модели *in silico* описанной среди других растительных фенолов, формирующих аффинные взаимодействия с рецептором CviR (Santos et al., 2021) и в эксперименте *in vitro* обусловившей умеренное подавление биосинтеза виолацеина у *C. violaceum* ATCC 12472 (Borges et al., 2014); а также гексадекановой/пальмитиновой кислоты (время удержания 9.480 мин; относительное содержание 0.9%), по результатам молекулярного докинга показавшей возможность результативного взаимодействия с белком CviR (Vargas et al., 2021).

Таблица 2. Малые молекулы растительного происхождения с ранее показанной активностью в отношении системы “кворум сенсинга” у *Chromobacterium* spp., идентифицированные в составе экстракта листьев эвкалипта прутовидного

Идентифицированное соединение	Структурная формула	Относительное содержание в экстракте, %	Варианты активности <i>in silico</i> или <i>in vitro</i>
1-Метил-4-пропан-2-илбензол (цимол)		0.2	Ингибирование биосинтеза виолацеина у <i>C. violaceum</i> ATCC 12472
2,3-Дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-1		3.8	Связывание с рецепторным белком CviR у <i>C. violaceum</i> ATCC 12472
1,2,3-Бензентриол (пирогаллол)		4.0	Ингибирование биосинтеза виолацеина в биотесте на <i>C. subtsugae</i> 026
3,4,5-Тригидроксибензойная (галловая) кислота		0.1	Связывание с рецепторным белком CviR; ингибирование биосинтеза виолацеина у <i>C. violaceum</i> ATCC 12472
4-((1E)-3-Гидрокси-1-пропенил)-2-метоксифенол (конифериловый спирт)		1.3	Ингибирование биосинтеза виолацеина в биотесте на <i>C. subtsugae</i> 026
Гексадекановая (пальмитиновая) кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{COOH}$	0.9	Связывание с рецепторным белком CviR у <i>Chromobacterium</i> spp.

Таким образом, результаты проведенного химического анализа свидетельствовали о присутствии в составе анализируемого растительного экстракта сразу нескольких малых молекул (10.3% от общей массы экстрагированных компонентов) с прогнозируемой или доказанной QS-ингибирующей активностью, что согласуется с представлениями о существовании аналогичных молекулярных композиций, ранее описанных в составе экстрактов коры дуба (Deryabin, Tolmacheva, 2015) или семян авокадо (Dereli et al., 2022).

Кроме того, среди обнаруженных молекул обращали на себя внимание два минорных компо-

нента со временем удерживания на колонке в узком диапазоне от 4.525 до 4.700 мин, идентифицированные как γ -капролактон и γ -октанолактон (относительное содержание в экстракте по 0.4% каждый). При этом их структурные особенности, заключающиеся в наличии пятичленного лактонного кольца с присоединенным к нему линейными радикалами различного химического состава и полярности (рис. 1), демонстрировали близость с природными аутоиндукторами плотностно-зависимой коммуникации – ацилированными гомосеринлактонами, что позволяло предполагать возможность функциональной интерференции между названными группами малых молекул. В

то же время в доступной литературе сведения о QS-ингибирующей активности γ -лактонов растительного происхождения до настоящего времени отсутствуют.

Характеристика QS-ингибирующей активности γ -лактонов, обнаруженных в экстракте листьев эвкалипта прутовидного. В исследование были включены химически синтезированные аналоги γ -капролактона и γ -октанолактона (степень чистоты 97–98%). Их тестирование в количественном биотесте на *C. subtsugae* 026 позволило впервые выявить и охарактеризовать рост-ингибирующий и QS-ингибирующий эффекты данных молекул (табл. 1). При этом γ -октанолактон показал себя как более активное соединение, значения $EC_{50} = 145.6$ мкг/мл и $EC_{100} = 625$ мкг/мл которого оказывались в 2–4 раза ниже требуемых для подавления QS-контролируемого биосинтеза виолацеина с использованием γ -капролактона ($EC_{50} = 354.2$ мкг/мл и $EC_{100} = 2500$ мкг/мл). Кроме того, у обоих названных соединений зафиксирован слабый рост-ингибирующий эффект, формирующийся в концентрациях, кратно превосходящих требуемые для развития QS-ингибирующего эффекта (соотношения MIK_{50}/EC_{50} соответствовали 7.5 для γ -капролактона и 4.9 для γ -октанолактона).

В то же время использование анализируемых γ -лактонов в количествах, соответствующих их содержанию в составе экстракта листьев эвкалипта прутовидного, позволило зафиксировать достаточно слабый эффект (не достигающий 50% подавления QS-контролируемого биосинтеза виолацеина) при использовании γ -октанолактона или его отсутствие при использовании γ -капролактона, что может объясняться выходом из диапазона их эффективных концентраций. Указанное обстоятельство явилось основанием для предположения о том, что в естественных условиях биоактивность γ -лактонов реализуется в составе молекулярной композиции из нескольких химических соединений, присутствующих в экстракте листьев эвкалипта прутовидного (см. выше) и обеспечивающих совместный QS-ингибирующий эффект.

Оценка воздействия молекулярных композиций с участием γ -лактонов на QS-контролируемый биосинтез виолацеина у *C. subtsugae* 026. Эффекты γ -лактонов как участников молекулярных композиций проанализированы при обогащении ими цельного экстракта листьев эвкалипта прутовидного, содержащего всю совокупность малых молекул растительного происхождения. При этом серии разведений цельного экстракта были обогащены γ -капролактоном или γ -октанолактоном в диапазоне концентраций 1–10000 мкг/мл, что делало их относительное содержание сопоставимым с таковым у основных компонентов, обнаруженных в анализируемом растительном экстракте.

Исследование комбинированного действия сформированных композиций с последующим анализом полученного результата методом изоболографического анализа позволило констатировать увеличение выраженности QS-ингибирующего эффекта в отношении *C. subtsugae* 026, превосходящего таковой при использовании как индивидуальных молекул, так и цельного растительного экстракта. Так анализ композиций с участием γ -капролактона показал сосредоточение большинства экспериментальных точек вдоль линии изоболы (рис. 3а), что указывало на развитие взаимодополняющего (аддитивного) эффекта. В свою очередь, обогащение экстракта листьев эвкалипта прутовидного γ -октанолактоном приводило к формированию взаимно потенцируемого (супераддитивного) эффекта, показателем которого являлось расположение большинства экспериментальных точек существенно ниже линии изоболы, соединяющей значения EC_{50} при изолированном использовании каждого из участников композиции (рис. 3б). Соответственно, в широком диапазоне концентраций γ -октанолактона концентрации цельного растительного экстракта, требуемые для достижения 50% ингибирования QS-контролируемого биосинтеза виолацеина у *C. subtsugae* 026, могли быть снижены в 4–6 раз относительно эффектов при их раздельном использовании.

Лекарственные растения традиционно рассматриваются в качестве важнейших источников природных соединений с различными вариантами биологических активностей, значимых для медицинского и ветеринарного использования. При этом одним из актуальных направлений подобного поиска является обнаружение и исследование их воздействия на системы плотностно-зависимой химической коммуникации у зоопатогенных и фитопатогенных бактерий, в настоящее время рассматриваемых в качестве новой перспективной “мишени” для антимикробной терапии.

Результатом проведенного исследования явилась демонстрация подобной активности у экстракта листьев эвкалипта прутовидного с идентификацией в нем композиции растительных молекул, ингибирующих систему химической коммуникации лабораторного штамма *C. subtsugae* 026 (ранее — *C. violaceum* 026). При этом полученные данные хорошо согласуются с ранее описанными аналогичными эффектами экстрактов листьев эвкалипта клубовидного и эвкалипта шаровидного, что свидетельствует о типичности QS-ингибирующего эффекта у названных растительных субстратов и объясняет эффективность их использования для профилактики и терапии широкого круга инфекционных состояний. В свою очередь, проведение химического анализа позволило обнаружить в экстракте листьев эвкалипта прутовидного

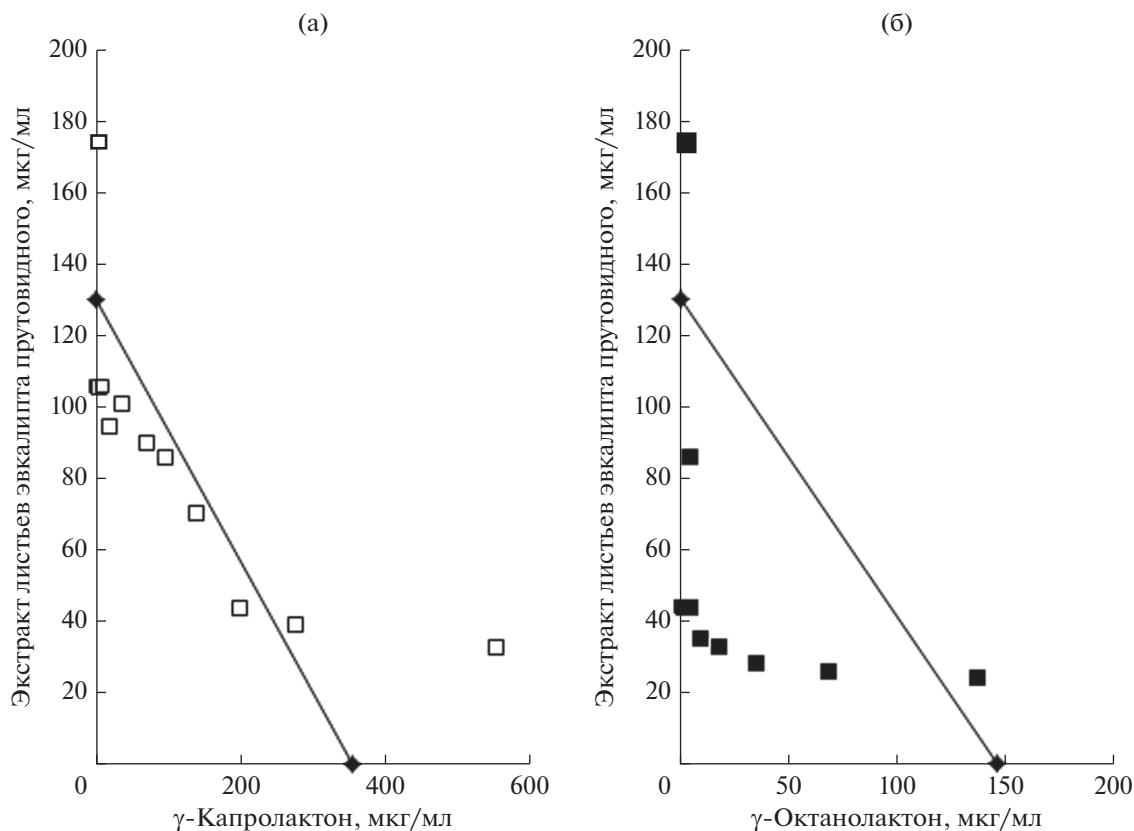


Рис. 3. Изоболографический анализ эффекта комбинаций γ -капролактона (а) и γ -октанолактона (б) с цельным экстрактом листьев эвкалипта прутовидного на QS-контролируемый биосинтез пигмента виолацеина в биотесте на *C. subtsugae* 026. Изоболы представлены в виде прямых линий, соединяющих значения EC_{50} для каждого отдельного компонента. Результат совместного действия показан путем нанесения на график точек с координатами, соответствующими концентрациям в композиции, обеспечивающим достижение EC_{50} .

цельный ряд малых молекул растительного происхождения (пирогаллол; 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-1; цимол; 4-((1E)-3-гидрокси-1-пропенил)-2-метоксифенол; галловая и пальмитиновая кислоты), ингибирующее воздействие которых на систему плотностно-зависимой химической коммуникации у *Chromobacterium* spp. ранее уже было показано в экспериментах *in vitro* или предсказано на моделях *in silico*.

Среди минорных соединений, также идентифицированных в исследуемом растительном экстракте, наше внимание было обращено на γ -лактоны, структуры которых демонстрировали существенное сходство с природными аутоиндукторами плотностно-зависимой коммуникации у бактерий — ацилированными гомосеринлактонами, что предполагает возможность функциональной интерференции между названными группами малых молекул. Проведенный анализ их химически синтезированных аналогов в биотесте на *C. subtsugae* 026 подтвердил данное предположение и впервые показал наличие QS-ингибирующей активности у γ -капролактона и γ -октанолактона. В то же время использование названных γ -лактонов

в количествах, соответствующих присутствию в экстракте листьев эвкалипта прутовидного, не позволяло достичь выраженного QS-ингибирующего эффекта, что объяснялось их выходом из диапазона биоактивных концентраций.

Последующее обогащение γ -лактонами исходного растительного экстракта показало возможность существенного усиления совместной QS-ингибирующей активности, при использовании γ -капролактона развивающегося как взаимодополняющий (аддитивного) эффект, а при использовании γ -октанолактона позволяющего достичь взаимно потенцируемого (супераддитивного) эффекта.

Обсуждая фундаментальный аспект полученного результата, следует указать на развитие представлений о многокомпонентной природе QS-ингибирующего эффекта растительных экстрактов, функционирующих по принципу молекулярных композиций с взаимодополняющими и взаимно усиливающими эффектами. Кроме того, в качестве “нового” участника подобных композиций результаты проведенного исследования впервые показывают соединения из группы γ -лак-

тонов, ранее преимущественно описываемые как вкусовые и ароматические компоненты растительного происхождения (Labuda, 2009). В свою очередь практически-ориентированный аспект проведенного исследования определяется демонстрацией возможности использования γ -лактонов для обогащения цельных растительных экстрактов или формирования на их основе композиций из малых молекул растительного происхождения, что позволяет существенно усилить воздействие на системы плотно-зависимой химической коммуникации. При этом отсутствие у γ -лактонов токсических или иных нежелательных свойств, а также разрешенное использование некоторых из них в качестве вкусо-ароматических добавок, существенно снижает порог для их возможного включения в схемы фитотерапии инфекционных заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-16-00036).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит материалов, полученных с использованием животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дерябин Д.Г., Галаджиева А.А., Косян Д.Б., Дускаев Г.К. Растительные ингибиторы плотно-зависимой коммуникации у бактерий: разнообразие структур, механизмов действия и источников происхождения // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 660–680.
- Deryabin D.G., Galadzhieva A.A., Kosyan D.B., Duskaev G.K. Plant-derived inhibitors of density-dependent communication in bacteria: diversity of structures, bioactivity mechanisms, and sources of origin // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 702–720.
- Инчагова К.С., Дускаев Г.К., Дерябин Д.Г. Подавление “кворум сенсинга” *Chromobacterium violaceum* при воздействии комбинаций амикацина с активированным углем или малыми молекулами растительного происхождения (пирогаллолом и кумарином) // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 72–82.
- Inchagova K.S., Duskaev G.K., Deryabin D.G. Quorum sensing inhibition in *Chromobacterium violaceum* by amikacin combination with activated charcoal or small plant-derived molecules (pyrogallol and coumarin) // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 63–71.
- Ahmad A., Viljoen A.M., Chenia H.Y. The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing // Lett. Appl. Microbiol. 2015. V. 60. P. 8–19.
- Bali E.B., Turkmen K.E., Erdonmez D., Saglam N. Comparative study of inhibitory potential of dietary phytochemicals against quorum sensing activity of and biofilm formation by *Chromobacterium violaceum* 12472, and swimming and swarming behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // Food Technol. Biotechnol. 2019. V. 57. P. 212–221.
- Borges A., Serra S., Cristina Abreu A., Saavedra M.J., Salgado A., Simoes M. Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quorum sensing inhibition and *in vitro* cytotoxicity // Biofouling. 2014. V. 30. P. 183–195.
- Defoirdt T., Pande G.S., Baruah K., Bossier P. The apparent quorum-sensing inhibitory activity of pyrogallol is a side effect of peroxide production // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. V. 57. P. 2870–2873.
- Dereli F.T.G., Onem E., Arin E., Ozaydin A.G., Muhammed M.T. *Persea americana* Mill.: as a potent quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence // Int. J. Second. Metabol. 2022. V. 9. P. 14–26.
- Deryabin D.G., Tolmacheva A.A. Antibacterial and anti-quorum sensing molecular composition derived from *Quercus cortex* (Oak bark) extract // Molecules. 2015. V. 20. P. 17093–17108.
- Harrison A.M., Soby S.D. Reclassification of *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 and its quorum biosensor mutant CV026 to *Chromobacterium subtsugae* // AMB Express. 2020. V. 10. P. 202.
- Kothari V., Sharma S., Padia D. Recent research advances on *Chromobacterium violaceum* // Asian Pac. J. Trop. Med. 2017. V. 10. P. 744–752.
- Labuda I. Flavor compounds // Encyclopedia of Microbiology. 3rd ed. / Editor-in-Chief: Schaechter M. Oxford: Academic Press, 2009. P. 305–320.
- Mashamba T.G., Adeosun I.J., Baloyi I.T., Tshikalange E.T., Cosa S. Quorum sensing modulation and inhibition in biofilm forming foot ulcer pathogens by selected medicinal plants // Heliyon. 2022. V. 8. P. e09303.
- McClellan K.H., Winson M.K., Fish L., Taylor A., Chhabra S.R., Cantara M., Daykin M., Lamb J.H., Swift S., Bycroft B.W., Stewart G.S.A.B., Williams P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones // Microbiology (Reading). 1997. V. 143. P. 3703–3711.
- Moradi F., Hadi N., Bazargani A. Evaluation of quorum-sensing inhibitory effects of extracts of three traditional medicine plants with known antibacterial properties // New Microbes New Infect. 2020. V. 38. P. 100769.
- Mukherjee S., Bassler B.L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 371–382.
- Ni N., Choudhary G., Li M., Wang B. Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 1567–1572.
- Remy B., Mion S., Plener L., Elias M., Chabriere E., Daude D. Interference in bacterial quorum sensing: a biopharmaceutical perspective // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 203.
- Sagar P.K., Sharma P., Singh R. Inhibition of quorum sensing regulated virulence factors and biofilm formation by

Eucalyptus globulus against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* // J. Pharmacopuncture. 2022. V. 25. P. 37–45.

Santos C.A., Lima E.M.F., Franco B.D.G.M., Pinto U.M. Exploring phenolic compounds as quorum sensing inhibitors in foodborne bacteria // Front. Microbiol. 2021. V. 12. P. 735931.

Stauff D.L., Bassler B.L. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 3871–3878.

Swem L.R., Swem D.L., O'loughlin C.T., Gatmaitan R., Zhao B., Ulrich S.M., Bassler B.L. A quorum-sensing antagonist targets both membrane-bound and cytoplasmic receptors and controls bacterial pathogenicity // Mol. Cell. 2009. V. 35. P. 143–153.

Tallarida R.J. An overview of drug combination analysis with isobolograms: perspectives in pharmacology // Pharmacol. Exp. Ther. 2006. V. 319. P. 1–7.

Tolmacheva A.A., Rogozhin E.A., Deryabin D.G. Antibacterial and quorum sensing regulatory activities of some traditional Eastern-European medicinal plants // Acta. Pharm. 2014. V. 64. P. 173–186.

Tor E.R., Francis T.M., Holstege D.M., Galey F.D. GC/MS determination of pyrogallol and gallic acid in biological matrices as diagnostic indicators of oak exposure // J. Agric. Food Chem. 1996. V. 44. P. 1275–1279.

Vargas E.L.G., de Almeida F.A., de Freitas L.L., Pinto U.M., Vanetti M.C.D. Plant compounds and nonsteroidal anti-inflammatory drugs interfere with quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* // Arch. Microbiol. 2021. V. 203. P. 5491–5507.

Whiteley M., Diggle S.P., Greenberg E.P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research // Nature. 2017. V. 551. P. 313–320.

Zhou L., Zhang Y., Ge Y., Zhu X., Pan J. Regulatory mechanisms and promising applications of quorum sensing-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation // Front. Microbiol. 2020. V. 11. P. 589640.

Quorum Sensing in *Chromobacterium subtsugae* (Previously – *C. violaceum*) Is Inhibited by Gamma-Lactones, the Minor Components of Eucalyptus Leaf Extract

K. S. Inchagova¹, G. K. Duskaev¹, and D. G. Deryabin¹, *

¹Federal Scientific Center for Biological Systems and Agrotechnologies, Russian Academy of Sciences, Orenburg, 460000 Russia

*e-mail: dgderabin@yandex.ru

Received August 16, 2022; revised September 1, 2022; accepted September 1, 2022

Abstract—The goal of the study was to investigate the mechanism of quorum sensing (QS) inhibition in the model bacterium *Chromobacterium subtsugae* 026 (previously – *C. violaceum* 026) by *Eucalyptus viminalis* Labillard leaf extract, and to identify the plant-derived components that provide this biological activity. The raw extract showed pronounced anti-QS activity within a broad concentrations range which were an order of magnitude lower than required for bacterial growth suppression (the MIC₅₀/EC₅₀ ratio of 43.6). Chemical analysis of the extract revealed six small plant-derived molecules: pyrogallol, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-1, *p*-cymene, 4-((1E)-3-hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol, gallic and palmitic acids, whose inhibitory effect on QS in *Chromobacterium* spp. has previously been shown by *in vitro* experiments or predicted by *in silico* models. In addition, minor components γ -caprolactone and γ -octanolactone, structurally similar to acylated homoserine lactones, QS autoinducers in *Chromobacterium* spp., were found in the extract. Chemically synthesized analogs of these molecules showed anti-QS activity in the *C. subtsugae* 026 bioassay (EC₅₀ = 354.2 and 145.6 μ g/mL, respectively). Enrichment of the *E. viminalis* leaf extract with γ -caprolactone or γ -octanolactone significantly increased the anti-QS activity of these compositions, which was determined by isobolographic analysis as additive or superadditive effects.

Keywords: quorum sensing, *Chromobacterium subtsugae*, *Eucalyptus viminalis*, γ -caprolactone, γ -octanolactone