

УДК 547.831.7

І.О. Малярчик, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел. (0482) 63 57 61

ВПЛИВ N-БЕНЗОТІАЗОЛ-2-ІЛ-БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМІДУ ТА ЙОГО ПОХІДНИХ НА РІСТ, УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ ТА ТУМОРОГЕННУ АКТИВНІСТЬ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Показано, що похідні N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів ефективно пригнічують ріст агробактерій та утворення ними біоплівки. За присутності 40 і 80 мкМ N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів (сполука I) та його аналогів з нуклеофільними замісниками (сполуки II, III і IV) ріст *A. tumefaciens* пригнічується на 25–30%, 80–85%, 50–68% та 30–40%, відповідно. Найбільш активна сполука – N-бензотіазол-2-іл-4-хлор-бензенсульфонамід, в концентрації 80 мкМ на 83% пригнічує формування біоплівки. Вирощування впродовж доби в присутності 40 мкМ цього похідного знижує здатність *A. tumefaciens* до індукції пухлин на тест-рослинах: кількість дисків моркви з пухлинами була у 6 разів меншою порівняно з контролем. Сполуки I, III і IV зменшують число зразків з новоутвореннями в 2, 3,6 і 3 рази.

Ключові слова: *Agrobacterium tumefaciens*, туморогенна активність, ріст та утворення біоплівки, N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід, похідні з нуклеофільними замісниками.

Грамнегативна ґрунтова бактерія *Agrobacterium tumefaciens* викликає утворення злоякісних пухлин — корончатих галів, у численних видів рослин. Пухлиноутворення є результатом переносу онкогенних фрагментів Ті-плазмід агробактерій в рослинні клітини, де вони інтегруються в ядерний геном. Ефективність інфікування залежить від числа копій Ті-плазмід та її горизонтального переносу при кон'югації [11]. Процеси ампліфікації і переносу плазмід позитивно регулюються аутоіндуктором системи *quorum sensing* (QS) *A. tumefaciens* — 3-оксо-октаноїлгомосерин лактоном [8]. Такі ознаки ураження тест-рослин як кількість пухлин та їх маса корелюють з рівнем синтезу цієї сигнальної молекули. Тому мож-

на припустити, що інгібітори системи міжклітинної комунікації будуть зменшувати онкогенний потенціал агробактерій.

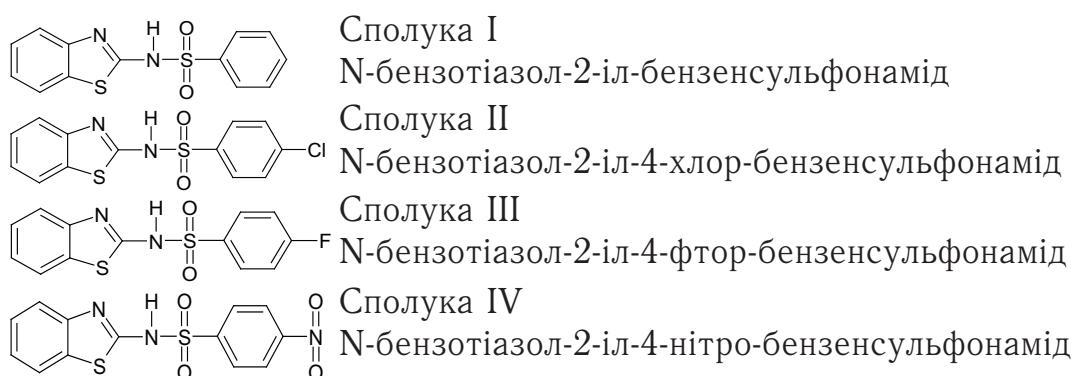
Раніше нами була встановлена здатність N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів та його похідних з нуклеофільними замісниками у фенольному кільці пригнічувати ріст і формування біоплівки *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* і *Pseudomonas aeruginosa* та синтез псевдо-монадою сигнальних гомосерин лактонів [2]. Було доведено, що антимікробна дія цих сполук пов'язана з впливом на систему *quorum sensing*, яка контролює множинні фактори патогенності, міжклітинну комунікацію, утворення біоплівки тощо [3].

Метою даної роботи було дослідження впливу похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів на ріст, формування біоплівки та онкогенні властивості *Agrobacterium tumefaciens*.

Матеріали і методи

У роботі як тест-мікроорганізми використовували колекційні штами *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 8628 та *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 8534.

Досліджувані сполуки були синтезовані в Проблемній науково-дослідній лабораторії № 5 Одеського національного університету імені І.І. Мечникова:



Кінцеві концентрації досліджуваних сполук у середовищі становили 0,4; 4; 40 та 80 мкМ.

Вплив досліджуваних речовин на ріст агробактерій оцінювали за різницею оптичної густини контрольних та дослідних варіантів. *A. tumefaciens* вирощували в пробірках у рідкому середовищі LB при 28 °C 24 год, після чого вимірювали оптичну густину культур на спектрофотометрі SmartSpec Plus (Bio-Rad) при довжині хвилі 540 нм.

При вивченні впливу на утворення біоплівки інкубацію культур проводили у 48-лункових планшетах для культури тканин фірми "Nuncclon". У кожну лунку додавали по 1 мл суспензії клітин, яка містила 10^3 КУО/мл. Через 24 години з кожної лунки ретельно відбирали середовище з неприкріпленими клітинами. Біоплівки на дні лунок відмивали фізіологіч-



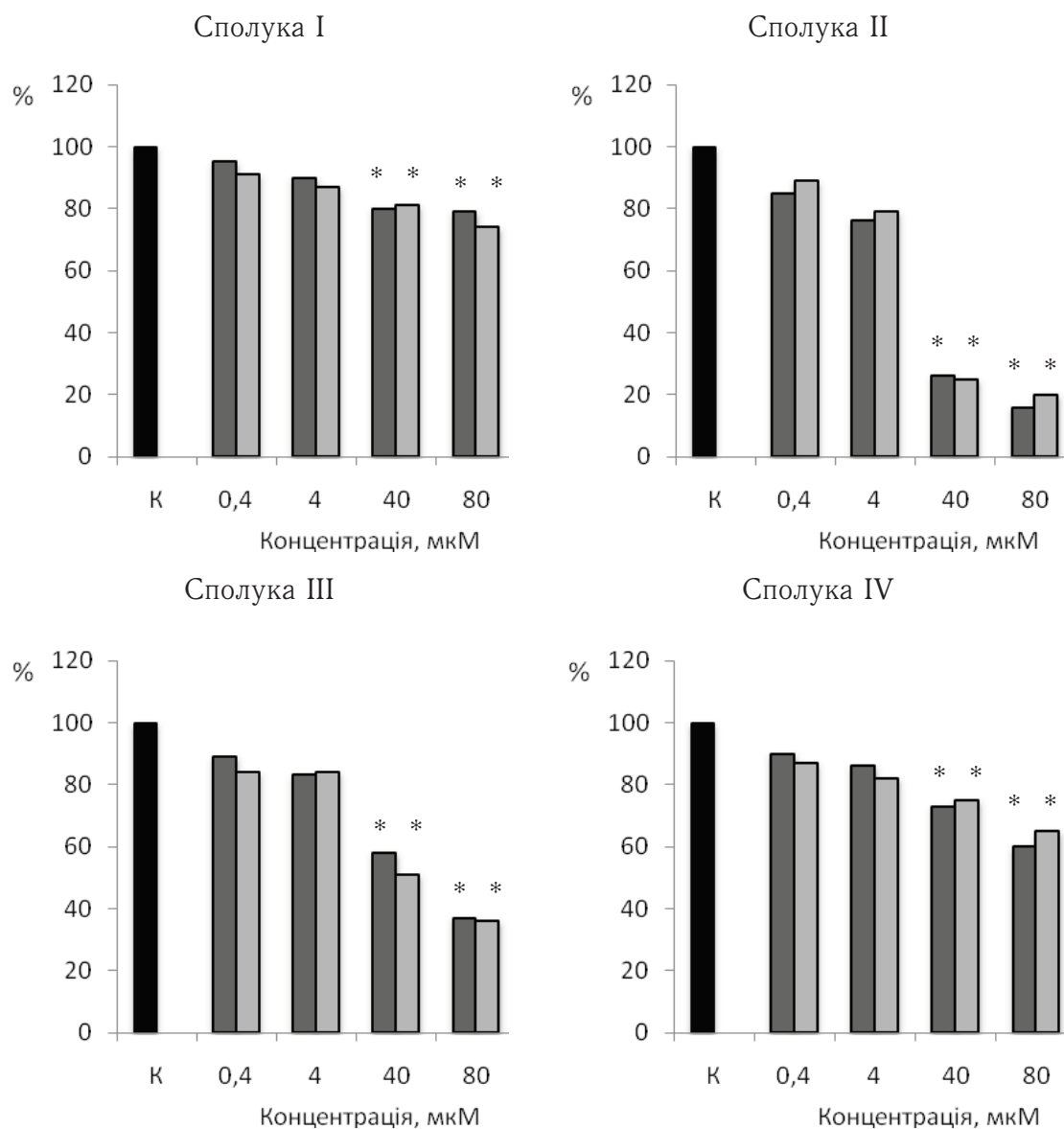
ним розчином та фіксували 96% етанолом впродовж 10 хв. Біоплівки забарвлювали водним розчином кристалічного фіолетового протягом 5 хв при кімнатній температурі. Планшети із забарвленою біоплівкою підсушували 24 год за кімнатної температури і у кожному лунку додавали по 1 мл 1% розчину додецилсульфату натрію у 0,1 N NaOH. Планшети витримували за кімнатної температури 1,5–2 години до повного лізису біоплівки. Інтенсивність формування біоплівки визначали шляхом вимірювання оптичної густини дослідних та контрольних зразків при довжині хвилі 592 нм [4].

Туморогенну активність *A. tumefaciens* оцінювали з використанням дисків моркви [7]. Моркву ретельно мили водогінною водою і 15 хвилин витримували у 20% розчині хлор-місткого вибілюючого засобу «Білизна». Потім відмивали 6 разів стерильною дистильованою водою, підсушували і нарізали диски висотою приблизно 1 см. Агробактерії вирощували 24 год у присутності досліджуваних сполук у кінцевій концентрації 40 мкМ. Потім осаджували клітини центрифугуванням при 1200 об/хв впродовж 10 хв і двічі відмивали стерильним фізіологічним розчином. Контрольні і дослідні зразки стандартизували за оптичною густиною до концентрації $1 \cdot 10^8$ кл/мл і наносили по 100 мкл суспензії на диски моркви, які розташовували на поверхні стерильного агару у чашках Петрі. Перші сім діб чашки витримували у термостаті при 28 °С, а потім два тижні при кімнатній температурі (22 ± 2 °С). Через три тижні після інокуляції підраховували кількість дисків з пухлинами та фотографували їх для оцінки розмірів пухлин. Для контролю стерильності дисків моркви за тих самих умов інкубували зразки, на які агробактерії не наносили.

Усі експерименти повторювали 3 рази. Кількість паралелей кожного з варіантів дорівнювала 6-и. Для обробки та аналізу даних використовували методи варіаційної статистики з розрахунком середньої арифметичної та її середньоквадратичного відхилення. Достовірність різниці показників оцінювали за допомогою *t*-критерію Стюдента. Математичне опрацювання отриманих даних здійснювали з використанням програми MS Excel [1].

Результати та їх обговорення

Дослідження впливу похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів на ріст в рідкій культурі *Agrobacterium tumefaciens* показало однакову чутливість обох штамів до цих сполук. При цьому вищу антимікробну дію виявили галоген-місткі аналоги (сполуки II і III). Наведені на рис. 1 дані свідчать про залежне від їх концентрації пригнічення росту бактерій. За менших з використаних концентрацій: 0,4 та 4 мкМ, накопичення біомаси знижувалося на 10–20%. За 40 та 80 мкМ досліджуваних сполук пригнічення росту становило: 25–30%, 80–85%, 50–68% та 30–40% для сполук I, II, III і IV, відповідно. Таким чином, найефективнішим виявився пригнічувальний вплив N-бензотіазол-2-іл-4-хлор-бензенсульфонамідів.



Agrobacterium tumefaciens ATCC 8628; *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 8534

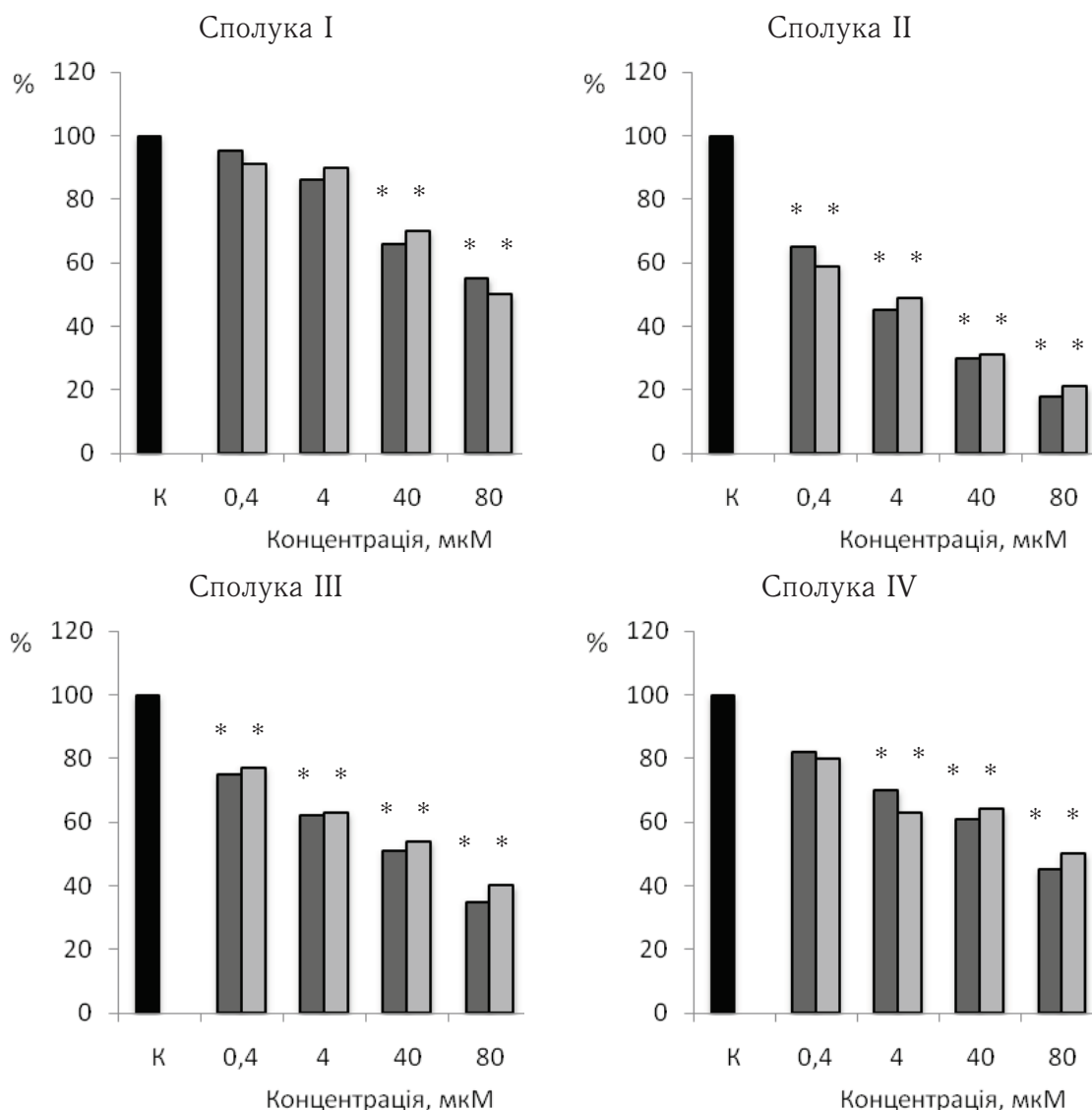
Рис. 1. Ріст *Agrobacterium tumefaciens* за присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів

Примітка: К — контроль; * — різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 1. Growth of *Agrobacterium tumefaciens* in presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives

Note: K — control; * — significant different from control

Як свідчать отримані результати (рис. 2) утворення біоплівки агробактеріями пригнічується досліджуваними сполуками більш суттєво ніж їх ріст. Вже за меншої концентрації галоген-місткі похідні вірогідно зменшують формування біоплівки. Кількісні зміни становлять 40–43% у разі сполуки II та 30% за дії сполуки III.



Agrobacterium tumefaciens ATCC 8628; *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 8534

Рис. 2. Утворення біоплівки *Agrobacterium tumefaciens* за присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів

Примітка: К — контроль; * — різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 2. *Agrobacterium tumefaciens* biofilm formation in presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives

Note: K — control; * — significant different from control

Підвищення вмісту N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів та його аналогів призводить до сповільнення процесу формування біоплівки і починаючи з концентрації сполук 4 мкМ результати вірогідно відрізняються від показників контролю. Максимальний ефект кожної із сполук реєструється при концентрації 80 мкМ. Для похідних I та IV він дорівнює 50%, а для сполук II та III — 80–83% і 60–65%, відповідно. Дворазове пригнічення утворення біоплівки найбільш активними аналогами II і III досягається при їх концентраціях 4 та 40 мкМ. Таким чином, хлор-

містке похідне виявилось активнішим і при визначенні впливу на процес формування біоплівки, який відображує функціональний стан системи міжклітинної комунікації у бактерій.

Враховуючи отримані результати, було доцільним дослідити чи змінюється патогенність агробактерій за дії на них досліджуваних сполук. Для цього оцінювали здатність агробактерій, які попередньо вирощувалися 24 год у присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів, викликати утворення пухлин на рослинних тест-об'єктах. Дані, наведені у таблиці, свідчать про виражене зниження туморогенного потенціалу *A. tumefaciens* ATCC 8628 за дії усіх сполук. Навіть сполука I, яка у концентрації 40 мкМ пригнучує утворення біоплівки цим штамом на 30%, майже удвічі зменшує кількість дисків з пухлинами. Похідні з нуклеофільними замісниками (сполуки II, III і IV) знижують число уражених зразків у 6, 3,6 та 3 рази, відповідно. Крім того, змінюється зовнішній вигляд пухлин та їх розміри. Як видно на фотографіях, пухлини на дисках, інфікованих контрольною культурою агробактерій мають вигляд суцільної білуватої маси, яка повністю покриває центральний циліндр і підіймається над поверхнею диску на 5–7 мм. Крім того численні невеличкі пухлини розташовані по усій поверхні диску. Пухлини, що утворені агробактеріями, які вирощували за присутності досліджуваних сполук, мають суттєво меншу масу і розташовані у вигляді кільця по периферії центрального циліндру. Їх висота не перевищує 1–2 мм у разі сполук II–IV, і 3–4 мм у разі сполуки I.

На жодному з неінфікованих дисків не було відмічено спонтанного утворення пухлин або ознак росту яких-небудь мікроорганізмів.

Таким чином, одержані результати підтверджують припущення про те, що можливою мішенню бактеріальних клітин, на яку діють досліджувані сполуки, є система міжклітинної комунікації [6]. Завдяки планарній будові бензотіазольного фрагменту молекули вони можуть інтеркалювати у ДНК Ті-плазмиди і попереджати її ампліфікацію і горизонтальний перенос. Крім того, похідні N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів можуть пригнічувати синтез 3-оксо-октаноїлгомосерин лактону — сигнальної молекули агробактерій. На користь цього припущення свідчать отримані раніше результати про пригнічення синтезу гомосерин лактонів *P. aeruginosa*.

Як і у випадку *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* і *Pseudomonas aeruginosa* [2,3], більш високу здатність пригнічувати ріст *Agrobacterium tumefaciens* і процеси, пов'язані з системою комунікації, виявили похідні з нуклеофільними замісниками. Але на відміну від умовно-патогенних бактерій, які більш виражено пригнічуються фтор- та нітромісткими сполуками, агробактерії є більш чутливими до хлормісткого аналога. Відомі природні і синтетичні інгібітори системи *quorum sensing* також містять у своєму складі галогени або нітро-групу. Прикладами таких сполук є галогеновані фуранони, що синтезуються червоною морською водорістю *Delisea pulchra* [5,10], та 4-нітро-піридин-N-оксид [9].



Таблиця

Вплив похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів на туморогенну активність
Agrobacterium tumefaciens ATCC 8628

Table

Influence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives on *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 8628 tumorigenic activity

Варіант	Ступінь розвитку пухлин		Кількість зразків з пухлинами / загальна кількість зразків
	мінімальний	максимальний	
Контроль			18/18
Сполука I			10/18
Сполука II			3/18
Сполука III			5/18
Сполука IV			6/18

Отримані результати обґрунтовують можливість застосування N-бензотіазол-2-іл-4-хлор-бензенсульфонамідів для позбавлення садивного матеріалу від агробактерій, зокрема, для обробки прищеп або при вирощуванні рослин у культурі тканин *in vitro*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 260 с.
2. Малярчик І.О., Філіпова Т.О., Галкін Б.М. Утворення біоплівки *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* і *Pseudomonas aeruginosa* за присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 3 — С. 32–40.
3. Малярчик І.О., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Вострова Л.М., Гренадьорова М.В. Антимікробні властивості N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів і його аналогів з нуклеофільними замісниками // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 3. — С. 40–49.
4. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices // J. Clin. Microbiol. — 1985. — V. 22. — № 6. — P. 996–1006.
5. Givskov M., de Nys R., Manefield M., Gram L., Maxirnilien R., Eberl L., Molin S., Steinberg P.D., Kjelleberg S. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling // J. Bacteriol. — 1996. — V. 178. — P. 6618–6622.
6. Hentzer M., Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections // J. Clin. Invest. — 2003. — V. 112. — P. 1300–1307.
7. Jen G.C., Chilton M.D. Activity of T-DNA borders in plant cell transformation by Mini-T Plasmids // J. Bacteriol. — 1986. — V. 166, № 2. — P. 491–499.
8. Pappas K.M., Winans S.C. A LuxR-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes // Mol. Microbiol. — 2003. — V. 48. — P. 1059–1073.
9. Rasmussen T.B., Bjarnsholt T., Skindersoe M.E., Hentzer M., Kristoffersen P., Kute M., Nielsen J., Eberl L., Givskov M. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI Selector // J. Bacteriol. — 2005. — V. 187, № 5. — P. 1799–1814.
10. Rasmussen T.B., Manefield M., Andersen R., Eberl L., Anthoni U., Christophersen C., Steinberg P., Kjelleberg S., Givskov M. How *Delisea*



pulchra furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1 // Microbiology. — 2000. — V. 146. — P. 3237–3244.

11. White C.E., Winans S.K. Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* // Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci. — 2007. — V. 362. — P. 1135–1148.

И.О. Малярчик, Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел. (0482) 63 57 61

**ВЛИЯНИЕ N-БЕНЗОТИАЗОЛ-2-ИЛ-БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМИДА
И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА РОСТ, ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ
И ТУМОРОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ
*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

Реферат

Показано, что производные N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамида эффективно угнетают рост агробактерий и образование ими биопленки. В присутствии 40 и 80 мкМ N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамида (соединение I) и его аналогов с нуклеофильными заместителями (соединения II, III и IV) рост *A. tumefaciens* угнетается на 25–30%, 80–85%, 50–68% та 30–40%, соответственно. Наиболее активное соединение — N-бензотиазол-2-ил-4-хлор-бензен-сульфонамид, в концентрации 80 мкМ на 83% подавляет формирование биопленки. Выращивание в течение суток в присутствии 40 мкМ этого производного снижает способность *A. tumefaciens* индуцировать опухоли на тест-растениях: количество дисков моркови с опухолью было в 6 раз меньшим по сравнению с контролем. Соединения I, III и IV уменьшали число образцов с новообразованиями в 2, 3,6 и 3 раза.

Ключевые слова: *Agrobacterium tumefaciens*, туморогенная активность, рост и образование биопленки, N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамид, производные с нуклеофильными заместителями.



I.O. Maliarchik, B.M. Galkin, T.O. Filipova

Odesa Mechnykov National University
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel. (0482) 63 57 61

**INFLUENCE OF N-BENZOTIAZOL-2-YL-
BENZENSULFONAMIDE DERIVATIVES ON THE
AGROBACTERIUM TUMEFACIENS GROWTH, BIOFILM
FORMATION AND TUMORIGENIC ACTIVITY**

Summary

It was shown that the growth and biofilm formation of agrobacteria effectively decreased in the presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide and its derivatives. In the presence of 40 i 80 μM of the N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide and its analogs with nucleophylic derivatives (compound II, III and IV) *A. tumefaciens* growth inhibited on 25–30%, 80–85%, 50–68% and 30–40%. Derivative with the highest activity – N-benzotiazol-2-yl-4-chlorine-benzensulfonamide, in concentration 80 μM inhibits *A. tumefaciens* biofilm formation for 83%. The growth of *A. tumefaciens* cells with 40 μM of this compound for 24 hours shows the results in decreasing of the tumor-formation ability of this bacteria on the test-plants. The numbers of carrot disks afflicted with tumors, were 6 times lower after exposition with N-benzotiazol-2-yl-4-chlorine-benzensulfonamide in compare with control. The compounds I, III and IV decreased a number of samples with tumors for 2, 3.6 and 3 times.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, tumorigenic activity, growth and biofilm formation biofilm, plankton biomass, N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide, derivatives with nucleophylic radicals.

Одержано 02.12.2011.

