

# Органическая химия

УДК 547.341+547.725

## УЧАСТИЕ 3-БЕНЗИЛГЕКСАГИДРОПИРРОЛО[1,2-*a*]ПИРАЗИН-1,4-ДИОНА В ХИМИЧЕСКОЙ КОММУНИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

П.П. Муковоз, Е.В. Иванова, Н.Б. Перунова, В.И. Баталов, О.В. Бухарин

Микробиологическими методами изучено влияние бифидобактерий *B. bifidum* 237 на кишечные палочки *E. coli* 12. Установлено подавляющее действие *B. bifidum* 237, предварительно обработанных супернатантами палочек *E. coli* 12, на персистентные свойства самих кишечных палочек. Методом хроматомасс-спектрометрии в супернатантах микроорганизмов обнаружен 3-бензилгексагидропирроло[1,2-*a*]пиразин-1,4-дион, содержание которого коррелировало в серии опытов с эффектами взаимного влияния участников ассоциации. Обсуждены особенности фрагментации 3-бензилгексагидропирроло[1,2-*a*]пиразин-1,4-диона.

*Ключевые слова:* дикетопиперазины, сигнальные соединения, ассоциативный симбиоз, экзометаболиты, супернатанты, бифидобактерии, кишечные палочки, масс-спектрометрия.

### Введение

Участие химических агентов в дистантной коммуникации у микроорганизмов настолько широко, что не ограничивается рамками трехкаскадной системы «лактоны – пептиды – амины», традиционно принятой в микробиологии. Речь идет, во-первых, об ацилированных лактонах гомосерина **1 а–с**, регулирующих широкий круг кворум-зависимых процессов у грамотрицательных бактерий; во-вторых, о коротких пептидах, регулирующих процессы конъюгативных плазмидных переносов у грамположительных кокков **2 а–с**; в-третьих, об аминокислотах и сходных с ними аминных соединениях **3 а–с**, регулирующих агрегацию бактериальных клеток или развитие воздушного мицелия у грибов (рис. 1) [1].

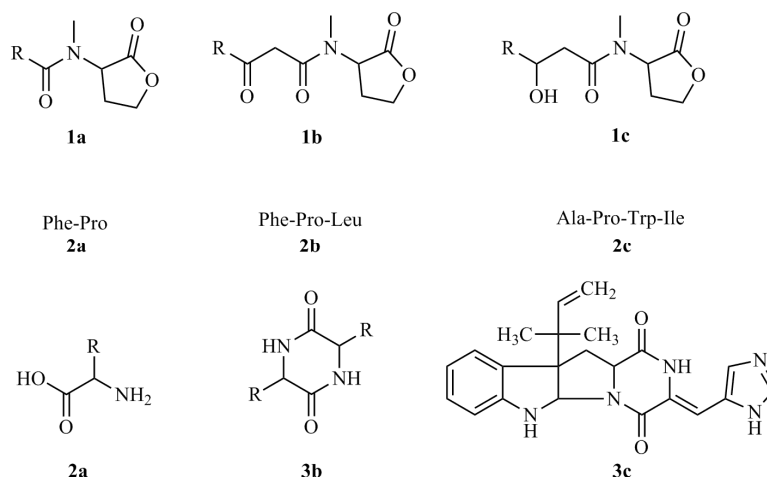


Рис. 1. Сигнальные соединения микроорганизмов

Однако природа сигнальных молекул у различных микроорганизмов не всегда соответствует перечисленным группам. Так у грибов и актиномицетов роль сигнальных соединений, функционально аналогичных аминокислотам, часто выполняют микотоксины алкалоидной природы – азотсодержащие гетероциклические соединения, биогенно происходящие из аминокислот [2, 3]. Скрининг продуцентов вторичных метаболитов грибов рода *Penicillium*, обнаружил, что исследо-

ванные штаммы синтезируют алкалоиды (флавины, дикетопиперазины, бензодиазепины, производные хинолина), накопление которых селективно включает процессы биосинтеза белков, влияя на передачу информации в популяции [4, 5]. Одним из таких микотоксинов является антибиотик рокефортин **3 с**, входящий в группу дикетопиперазиновых алкалоидов **3 б** [6].

В целом, вопрос о роли эволюционно-консервативных сигнальных молекул (химически идентичных или гомологичных) у различных форм живого до настоящего времени остается недостаточно разработанным. В этой связи поиск новых сигнальных соединений особенно актуален при расшифровке механизмов функционирования микросимбиоза, как вектора ассоциативного симбиоза [7]. Не менее важными остаются прикладные исследования, позволяющие использовать такие соединения, как биологически активные вещества.

Целью работы было установить химическую природу сигнальных соединений, влияющих на характер межмикробных взаимодействий бактерий (на модели ассоциации бифидобактерий *B. bifidum* 237 и лактозонегативных гемолитических кишечных палочек *E. coli*).

### Обсуждение результатов

Характер взаимодействий ассоциантов изучался нами по таким универсальным признакам микроорганизмов, как уровень антилизоцимной активности (АЛА, мкг/мл OD<sup>\*</sup>), определяющий способность выживать в организме хозяина, и ростовым свойствам бактерий (OD<sub>450</sub><sup>\*\*</sup>).

Влияние бифидобактерий на кишечные палочки изучали как при соинкубировании экзометаболитов (супернатантов) чистых культур, так и после предварительной обработки бифидобактерий супернатантами *E. coli* с последующей соинкубацией. В результате опыта было обнаружено, что предварительно обработанный штамм *B. bifidum* 237 приобретал способность к подавлению биологических свойств лактозонегативных гемолитических кишечных палочек, что не наблюдалось в опыте с необработанными культурами. Так, значения АЛА и ростовых свойств кишечных палочек *E. coli* 12 значительно снижались при переходе от опыта с чистыми культурами к опыту с предварительно соинкубированным штаммом *B. bifidum* 237 (с 1,8 мкг/мл OD<sub>450</sub> до 1,2 мкг/мл OD<sub>450</sub> и с 0,9 OD<sub>450</sub> до 0,47 OD<sub>450</sub> соответственно) ( $p < 0,05$ ).

Полученные данные позволили нам предположить, что в супернатанте кишечной палочки содержатся соединения, являющиеся «сигналом» к включению у *B. bifidum* 237 механизмов подавления персистентных свойств *E. coli* 12.

Методом хроматомасс-спектрометрии в эфирных экстрактах супернатанта *E. coli* 12 был обнаружен 3-бензилгексагидропирроло[1,2-а]пиазин-1,4-дион **4**, содержание которого коррелировало в серии опытов с эффектами взаимного влияния участников ассоциации. По химической природе соединение **4** представляет собой циклический дипептид пролина и фенилаланина, являющийся производным дикетопиперазинов **3 б**.

Характер фрагментации соединения **4** представлен на рис. 2. Масс-спектрометрические данные приведены в экспериментальной части.

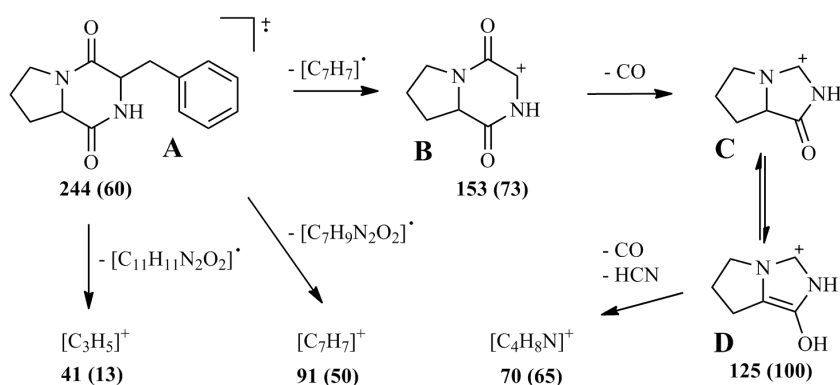


Рис. 2. Фрагментация 3-бензилгексагидропирроло[1,2-а]пиазин-1,4-диона (**4**) в условиях электронного удара

\* Единица измерения антилизоцимной активности, выраженная в мкг/мл умноженная на единицу оптической плотности (OD) при длине волны 450 нм.

\*\* Единица измерения роста/размножения, выраженная в единицах оптической плотности (OD) при длине волны 450 нм.

В масс-спектре соединения **4** присутствует интенсивный сигнал молекулярного иона  $[M]^{++}$  с  $m/z$  244 (62 %) (структура **A**), изотопный состав которого в масс-спектре ( $[M]^{++} - 100$  %;  $[M+1]^{++} - 15,6$  %;  $[M+2]^{++} - 1,48$  %) хорошо согласуется с расчетными значениями ( $[M]^{++} - 100$  %;  $[M+1]^{++} - 15,4$  %;  $[M+2]^{++} - 1,10$  %) [8, 9]. Преобладающее направление фрагментации  $[M]^{++}$  связано с бензильным разрывом, в ходе которого образуется тропилиевый ион  $[C_7H_7]^+$  с  $m/z$  91 (49 %) и пирозиниевый ион  $[M-C_7H_7]^+$  (структура **B**) с  $m/z$  153 (73 %), (см. рис. 2). Интенсивность сигналов тропилиевого типа в спектрах большинства известных соединений максимальна, однако, в масс-спектре соединения **4** интенсивность иона  $[C_7H_7]^+$  таковой не является, что вероятно зависит от конкурентной способности функциональных групп молекулярного иона к иницированию распада и стабилизации заряда [8]. Дальнейший распад пирозиниевого иона (структура **B**) приводит к выбросу нейтральной молекулы CO, что характерно для циклических кетонов, и образованию фрагментарного иона  $[M-C_7H_7-CO]^+$   $m/z$  125 (100 %). Максимальная интенсивность иона  $[M-C_7H_7-CO]^+$ , обусловленная его устойчивостью, вероятно связана с делокализацией заряда в структурах имидозолиевого типа (резонансные структуры **C** и **D**) [9]. Последующее элиминирование нейтральных молекул CO и HCN приводит к образованию фрагмента  $[C_4H_8N]^+$   $m/z$  70, интенсивность сигнала которого (66 %), обусловлена значительной устойчивостью пирролидиниевого катиона [8, 9]. В масс-спектре соединения **4** присутствует сигнал алилиевого иона  $[C_3H_5]^+$  с  $m/z$  41, характерного для алкилпроизводных и алициклических соединений. Как и ионы тропилиевого типа, алилиевый ион способен эффективно делокализовывать заряд, однако интенсивность его незначительна (12 %), что связано с преобладанием иного направления фрагментации [8, 9]. Кроме основных сигналов в масс-спектре соединения **4** присутствуют малоинтенсивные сигналы фрагментных ионов (3–7 %), большинство из которых содержат в своём составе фенильный фрагмент:  $m/z$  77  $[C_6H_5]^+$  (6 %),  $m/z$  103  $[C_6H_5C_2H_2]^+$  (6 %),  $m/z$  118  $[C_6H_5CHCHNH]^+$  (3 %),  $m/z$  131  $[C_6H_5CHCHCO]^+$  (7 %). Образование ионов  $m/z$  55  $[CH_2CHCO]^+$  (5 %) и  $m/z$  57  $[CH_3NCO]^+$  (7 %), содержащих карбонильную группу, характерно для алициклических кетонов и  $\alpha$ -аминокислот, соответственно [8, 9].

### Заключение

Вопрос о механизме образования соединения **4** требует дальнейших исследований. Однако, согласно литературным данным, наиболее вероятный механизм образования дикетопиперазинов **3 б** в микробиоценозах – внеклеточная ферментативная гетероциклизация линейных дипептидов **2 а**, либо отдельных аминокислот **3 а**, составляющих основу белкового гидролизата питательной среды [1]. Многочисленные компоненты гидролизата в большинстве случаев мешают определению искомого продукта, приводя к неоднозначным результатам. В частности, нельзя заранее исключить возможность циклизации дикетопиперазина **4** из линейных дипептидов гидролизата в инжекторе прибора, хотя она и маловероятна. В пользу отсутствия такого процесса свидетельствует наличие только одного хроматографического пика в хроматограмме исследуемых образцов. Известно, что образование дикетопиперазинов **3 б** из дипептидов **2 а** осуществляется достаточно легко и часто самопроизвольно при небольшом нагревании. В продуктах реакции обнаруживаются четыре оптических изомера, поскольку каждый из них имеет по два хиральных центра (за исключением дипептидов, включающих глицин). В условиях возгонки пробы в инжекторе хроматомасс-спектрометра наиболее вероятно было бы образование таких четырех изомеров, которые на ахиральной колонке должны были бы выходить в виде двух хроматографических пиков. Первый из этих пиков должен соответствовать энантиомерам D,D и L,L, а второй их диастереомерам D,L и L,D. Аналогичный процесс наблюдался нами, при наличии в пробе линейных дипептидов лейцина и пролина. В хроматограммах соединения **4** подобного не наблюдается.

Выходом в разрешении этого вопроса, вероятно, могла бы стать замена питательных сред на обедненные, в которых заведомо отсутствуют дипептиды. К сожалению, замена традиционных питательных сред на минеральные (различные соли и углеводы) или синтетические (аминокислоты), не всегда возможна, поскольку данные среды не являются оптимальными для нормальной жизнедеятельности облигатно-анаэробных бактерий *B. bifidum*. Поэтому доказательством принадлежности соединения **4** к экзометаболитам бактерий, по нашему мнению, должен стать хроматомасс-спектр двух стандартных линейных дипептидов (Про-Фен и Фен-Про), снятый в идентичных условиях. Окончательной верификацией участия соединения **4** в процессе подавления персистентных свойств *E. coli* 12, вероятно должен стать опыт, включающий внесение дикетопиперазина **4** непосредственно в среду с микроорганизмами.

### Экспериментальная часть

Исследования проводились на модели штаммов микроорганизмов, представителей нормальной микрофлоры кишечника человека: *Bifidobacterium bifidum* 237 и условно-патогенных микросимбионтов (ассоциантов): *E. coli* 12 лактозонегативные гемолитические (lac «-»/hly «+») (коллекция штаммов ИКВС УрО РАН). Культуры микроорганизмов были изолированы от пациентов при обследовании на дисбиоз кишечника. Выделение и идентификацию микроорганизмов осуществляли общепринятыми методами в соответствии с методическими рекомендациями.

Для получения супернатантов (фильтратов) штаммы микроорганизмов культивировали в бульоне Schaedler (BBL, США) при 37 °С в течение 24–48 часов. Анаэробные микроорганизмы инкубировали в анаэробной камере “GasPak 150” (BBL, США) с помощью газогенераторных пакетов “GasPak Anaerobic System” (BBL, США). Далее центрифугировали (3000 об/мин 15 минут) и пропускали внклеточную жидкость через мембранные фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,2 мкм, получая из бульонных культур супернатант (экзометаболиты) микроорганизмов.

Исследование биологических свойств (антилизоцимная активность и ростовые свойства) бифидобактерий и кишечной палочки в условиях межмикробных взаимодействий проводили при добавлении стерильных супернатантов (продуктов жизнедеятельности) микроорганизмов-симбионтов в среду культивирования [10]. Ростовые свойства (рост/размножение) и антилизоцимную активность (АЛ) микроорганизмов исследовали фотометрическим способом [11, 12]. Измерения оптической плотности производили на фотометре ELx808 (BioTek, США). Эксперименты были проведены в трёх дублях.

Предварительную обработку бифидобактерий метаболитами кишечной палочки проводили по следующей схеме: культуры бифидобактерий соинкубировали с супернатантом *E. coli* в течение 2 часов при 37 °С, затем центрифугировали, забирали надосадок, ресуспензировали физиологическим раствором NaCl (0,9 %), трижды повторяя цикл. Затем бифидобактерии культивировали в питательном бульоне в течение 48 часов в анаэробных условиях при 37 °С, получали супернатант, который соинкубировали с культурами кишечной палочки и определяли у *E. coli* биологические свойства.

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке непараметрическим методом с применением критерия Манна – Уитни. Выраженность изменений биологических свойств микроорганизмов определяли как разницу между опытом и контролем в процентном отношении. Разница между сравниваемыми величинами считалась достоверной при значении  $p < 0,05$ .

Супернатанты микроорганизмов в количестве 5 мл экстрагировали смесью 10 мл метанола и диэтилового эфира в соотношении 1 : 1, добавляли 5 мл метанола, эфир отгоняли, метанольный экстракт сушили безводным сульфатом магния, экстракт вводили в инжектор хроматомасс-спектрометра.

Масс-спектры электронного удара снимали на хроматомасс-спектрометре GCMS-QP 2010 Ultra фирмы Shimadzu с масс-селективным детектором при энергии ионизации 70 эВ.

**3-Бензилгексагидропирроло[1,2-а]пиразин-1,4-дион (4).** Масс-спектр (ЭУ, 70 эВ),  $m/z$  ( $I_{\text{отн}}$ , %), ( $C_{14}H_{16}N_2O_2$ ): 244 [ $M$ ]<sup>+</sup> (62), 201 [ $M-C_3H_7$ ]<sup>+</sup> (3), 153 [ $M-C_7H_7$ ]<sup>+</sup> (73), 131 [ $C_6H_5CHCHCO$ ]<sup>+</sup> (7), 125 [ $M-C_7H_7-CO$ ]<sup>+</sup> (100), 118 [ $C_6H_5CHCHNH$ ]<sup>+</sup> (3), 103 [ $C_6H_5C_2H_2$ ]<sup>+</sup> (6), 91 [ $C_7H_7$ ]<sup>+</sup> (49), 77 [ $C_6H_5$ ]<sup>+</sup> (6), 70 [ $C_4H_8N$ ]<sup>+</sup> (66), 57 [ $CH_3NCO$ ]<sup>+</sup> (6), 55 [ $CH_2CHCO$ ]<sup>+</sup> (5), 41 [ $C_3H_7$ ]<sup>+</sup> (12).

Работа выполнена по программе Президиума РАН «Механизмы интеграции молекулярных систем при реализации физиологических функций» в рамках проекта № 12-П-4-1045 «Изучение интеграционных механизмов межмикробных взаимоотношений микросимбионтов кишечной микробиоты человека».

### Литература

1. Олескин, А.В. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов / А.В. Олескин, И.В. Ботвинко, Е.А. Цавкелова // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 3. – С. 309–327.
2. Соболевская, М.П. Биоактивные соединения морских актиномицетов / М.П. Соболевская, Т.А. Кузнецова // Биоорган. химия. – 2010. – Т. 36, № 5. – С. 1–15.

3. Биологически активные соединения актинобактерии *Streptomyces* sp. GW 33/1539 / М.П. Соболевская, В.А. Денисенко, С. Фотсо и др. // Изв. АН, серия химическая. 2008. – № 3. – С. 652–655.
4. Новые продуценты биологически активных соединений – грибы рода *Penicillium*, выделенные из вечной мерзлоты / Т.В. Антипова, В.П. Желифонова, Б.П. Баскунов и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 3. – С. 318–323.
5. Желифонова, В.П. Вторичные метаболиты в таксономии грибов рода *Penicillium* / В.П. Желифонова, Т.В. Антипова, А.Г. Козловский // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 3. – С. 291–300.
6. Выделенные из вечной мерзлоты грибы *Penicillium Aurantiogriseum Dierckx* 1901 – продуценты дикетопиперазиновых алкалоидов рокефортина и 3,12-дигидро рокефортина / А.Г. Козловский, В.П. Желифонова, В.М. Аданин и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 4. – С. 446–451.
7. Ассоциативный симбиоз / О.В. Бухарин, Е.С. Лобакова, Н.В. Немцева и др. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 264 с.
8. Вульфсон, Н.С. Масс-спектрометрия органических соединений / Н.С. Вульфсон, В.Г. Заикина, А.И. Микой. – М.: Химия, 1986. – 311 с.
9. Лебедев, А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии / А.Т. Лебедев. – М.: Бинум Лаборатория знаний, 2003. – 496 с.
10. Симбиоз и его роль в инфекции / О.В. Бухарин, Е.С. Лобакова, Н.Б. Перунова и др. // Екатеринбург: УрО РАН, 2011. – 301 с.
11. Бухарин, О.В. Персистенция патогенных бактерий / О.В. Бухарин. – М.: Медицина; Екатеринбург: УрО РАН, 1999. – 365 с.
12. O'Toole, G.A. Biofilm formation as microbial development / G.A. O'Toole, A.H. Kaplan, R. Kotler // Ann. Rev. Microbiol., 2000. – Vol. 4. – P. 49–76.

*Поступила в редакцию 18 сентября 2012 г.*

### **PARTICIPATION OF 3-BENZYLHEXAHYDROPYRROLO[1,2-a]PYRAZINE-1,4-DIONE IN CHEMICAL COMMUNICATION AMONG MICROORGANISMS**

The influence of bifidobacterium *B. bifidum* 237 on *E. coli* 12 was studied by the microbiological methods. The inhibitory effect of *B. bifidum* 237, previously treated with supernatants of *E. coli* 12, on the persistent properties of the *E. coli* was found. 3-Benzylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione was detected in supernatants of bacteria by GCMS method. Its quantity correlated with the effects of the mutual influence of association members in a series of experiments. The fragmentation properties of 3-benzylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione were discussed.

*Keywords: diketopiperazine, signal compounds, associative symbiosis, exometabolites, supernatants, bifidobacteria, E. coli, mass-spectrometry.*

**Mukovoz Petr Petrovich** – PhD (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Division of Russian Academy of Science. 11 Pionerskaya st., Orenburg, 460000.

**Муковоз Петр Петрович** – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук. 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.

E-mail: mpp27@mail.ru

**Ivanova Elena Valeryevna** – PhD (Medicine), Senior Researcher, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Division of Russian of Science. 11 Pionerskaya st., Orenburg, 460000.

**Иванова Елена Валерьевна** – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук. 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.

E-mail: walerewna13@gmail.com

**Perunova Nataliya Borisovna** – PhD (Medicine), Senior Researcher, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Division of Russian Academy of Science. 11 Pionerskaya st., Orenburg, 460000.

**Перунова Наталья Борисовна** – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук. 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.

E-mail: perunovanb@gmail.com

**Batalov Vladimir Igorevich** – Postgraduate Student of Organic Chemistry Subdepartment, Chemistry Department, South Ural State University. 76, Lenin Avenue, Chelyabinsk, 454080.

**Баталов Владимир Игоревич** – аспирант кафедры органической химии, химический факультет, Южно-Уральский государственный университет. 454080, г. Челябинск, пр. им. В.И. Ленина, 76.

E-mail: Batalov87@gmail.com

**Bukharin Oleg Valeryevich** – Dr. Sc. (Medicine), Professor, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Division of Russian of Science. 11 Pionerskaya st., Orenburg, 460000.

**Бухарин Олег Валерьевич** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук. 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.

E-mail: ikvs@esoo.ru