

# ВЛИЯНИЕ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ МИКРОБНОЙ КЛЕТКИ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЕННЫХ 1H-ИНДОЛ-4-, -5-, -6-, -7-ИЛАМИНОВ

А.А. Масейкина<sup>1</sup>, И.С. Степаненко<sup>1</sup>, С.А. Ямашкин<sup>2</sup>, Е.Д. Слестников<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Мордовский государственный педагогический институт им. М.Е. Евсевьева, г. Саранск, Россия

**Резюме.** Исследование новых противомикробных соединений включает определение механизма их воздействия на микробную клетку. Как правило, действие большинства современных синтетических противомикробных препаратов связано либо с подавлением синтеза ДНК, либо с подавлением бактериального белкового синтеза на уровне трансляции или транскрипции. Существуют чувствительные и простые методы скрининга и мониторинга потенциальной генотоксической активности широкого спектра природных и синтетических соединений. До настоящего времени широко применялся тест Эймса, основанный на чувствительности штаммов сальмонелл к канцерогенным химическим веществам, хотя некоторые соединения, вызывающие негативные реакции по Эймсу, на самом деле могли быть канцерогенными для животных. Другой метод, *SOS*-хромотест, — это *SOS*-транскрипционный анализ, способный оценить повреждение ДНК, вызванное химическими и физическими мутагенами. Он измеряет экспрессию репортерного гена ( $\beta$ -галактозидазы). Фермент  $\beta$ -галактозидаза перерабатывает ортонитрофенил галактопиранозид с образованием желтого соединения, обнаруживаемого при 420 нм. Затем индукцию  $\beta$ -галактозидазы нормализуют по активности щелочной фосфатазы — фермента, экспрессируемого конститутивно *Escherichia coli*. *SOS*-хромотест также широко используется для генотоксикологических исследований. Ответ быстрый (несколько часов) и не требует выживания тестерного штамма. Кривые «доза–эффект» для различных химических веществ включают линейную область. Наклон этой области принимается за меру индукции *SOS*. Поэтому для нашего исследования выбран *SOS*-хромотест, позволяющий выявить ДНК-опосредованное действие исследуемых соединений. Целью работы стала оценка *SOS*-индуцирующей активности противомикробных соединений на основе замещенных 1H-индол-4-, -5-, -6-, -7-иламинов. В качестве тестерного штамма в исследовании использован штамм *Escherichia coli* PQ 37 с генотипом *F-thr leu his-4 pyrD thi galE galK lacΔU169 srl300::Th10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Muc+ sfiA::Mud (Ap, lac) cis*. Благодаря присутствию «сшивки» генов *sfiA::lacZ*, экспрессия гена  $\beta$ -галактозидазы *lacZ* в штамме PQ 37 находится под контролем промотора гена *sfiA*, одного из компонентов *SOS*-регулона *E. coli*. Показателем *SOS*-индуцирующей активности исследуемых соединений в *SOS*-хромотесте является активность  $\beta$ -галактозидазы, которая оценивается относительно активности конститутивного фермента микроорганизмов — щелочной фосфатазы, что позволяет контролировать также токсический эффект исследуемых соединений на клетки бактерий. Результаты исследований показали, что

## Адрес для переписки:

Масейкина Алена Александровна  
430005, Россия, г. Саранск, Большевикская ул., 68,  
ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский  
государственный университет им. Н.П. Огарева.  
Тел.: 8 (951) 343-54-08.  
E-mail: minibat@mail.ru

## Contacts:

Alena A. Maseykina  
430005, Russian Federation, Saransk, Bolshevistskaya str., 68,  
National Research Ogarev Mordovia State University.  
Phone: +7 (951) 343-54-08.  
E-mail: minibat@mail.ru

## Для цитирования:

Масейкина А.А., Степаненко И.С., Ямашкин С.А., Слестников Е.Д.  
Влияние на генетический аппарат микробной клетки соединений  
на основе замещенных 1H-индол-4-, -5-, -6-, -7-иламинов // Инфекция  
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 663–670. doi: 10.15789/2220-7619-  
TEO-1451

## Citation:

Maseykina A.A., Stepanenko I.S., Yamashkin S.A., Slastnikov E.D. An impact  
of 1H-indol-4-, -5-, -6-, -7-ylamines-substituted compounds on the microbial  
cell genetic apparatus // Russian Journal of Infection and Immunity =  
Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 663–670. doi: 10.15789/2220-  
7619-TEO-1451

4,4,4-трифтор-*N*-(6-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (1), 4,4,4-трифтор-*N*-(6-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (2) и *N*-(1,5-диметил-2-фенил-1*H*-индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (3) не обладают *SOS*-индуцирующей активностью в исследуемых концентрациях. 4-гидрокси-8-фенил-4-(трифторметил)-1,3,4,7-тетрагидро-2*H*-пирроло[2,3-*h*]-хинолин-2-он(4), 9-гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидро-7*H*-пирроло-[2,3-*f*]-хинолин-7-он (5), 6-гидрокси-2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,6,7,9-тетрагидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]-хинолин-8-он (6) и 1,2,3,9-тетраметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]-хинолин-8-он (7) в бактерицидных концентрациях проявляли дозозависимую *SOS*-индуцирующую активность. Полученные результаты исследований позволили выявить соединения 4, 5, 6, 7, механизм действия которых включает воздействие на ДНК микробной клетки.

**Ключевые слова:** *SOS*-хромотест, щелочная фосфатаза, активность  $\beta$ -галактозидазы, фактор индукции *SOS*-ответа клетки, генотоксичность, антибактериальная активность.

## AN IMPACT OF 1*H*-INDOL-4-, -5-, -6-, -7-YLAMINES-SUBSTITUTED COMPOUNDS ON THE MICROBIAL CELL GENETIC APPARATUS

Maseykina A.A.<sup>a</sup>, Stepanenko I.S.<sup>a</sup>, Yamashkin S.A.<sup>b</sup>, Slastnikov E.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

<sup>b</sup>Mordovia State Pedagogical Institute named after M.E. Evseviev, Saransk, Russian Federation

**Abstract.** The study of new antimicrobial compounds includes determining the mechanism of their effect on the microbial cell. As a rule, an effect for the majority of current synthetic antimicrobials is associated either with suppressed DNA synthesis, or with inhibiting bacterial protein production at translational or transcriptional level. A number of sensitive and easy-to-do methods are available for screening and monitoring potential genotoxic activity of a wide range of natural and synthetic compounds. To date, the Ames test has been widely used, which is based on the sensitivity of Salmonella strains to carcinogenic chemicals, although some compounds resulting in Ames negative reactions could actually be carcinogenic to animals. Likewise, the SOS chromotest represents a SOS transcriptional analysis able to assess DNA damage caused by chemical and physical mutagens by measuring the expression of a reporter gene ( $\beta$ -galactosidase) encoding the  $\beta$ -galactosidase enzyme that metabolizes ortho-nitrophenyl galactopyranoside resulting in emerging a yellow-colored compound detected at wavelength 420 nm. Next, the induction of  $\beta$ -galactosidase is normalized by the activity of alkaline phosphatase, an enzyme expressed constitutively by *Escherichia coli*. SOS chromotest is also widely used for genotoxicological studies providing a quick answer (several hours) and requiring no survival of the test strain. Dose-response curves for various chemicals consist of a linear region, which slope corresponds to the SOS induction. Therefore, the SOS chromotest was selected for the study allowing to identify DNA-mediated effects of the analyzed compounds. The aim of the study was to evaluate the *SOS*-inducing activity for 1*H*-indol-4-, -5-, -6-, -7-ylamines-substituted antimicrobial compounds. The *Escherichia coli* PQ 37 with the genotype *F-thr leu his-4 pyrD thi galE lac $\Delta$ U169 srl300::Th10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Mis+ sfiA::Mud (Ar, lac) cts* was used as a test strain. Due to the link of the *sfiA::lac Z* genes, *lacZ*  $\beta$ -galactosidase gene expression in the strain PQ 37 is controlled by the *sfiA* gene promoter, one of the components in the *E. coli* SOS regulon. Activity of  $\beta$ -galactosidase assessed relative to constitutive microbial alkaline phosphatase reflects *SOS*-inducing activity triggered by examined compounds in the SOS chromotest that also allows to control their toxic effects on bacterial cells. The data showed that 4,4,4-trifluoro-*N*-(6-methoxy-1,2,3-trimethyl-1*H*-indol-5-yl)-3-oxobutanamide (1), 4,4,4-trifluoro-*N*-(6-methyl-2-phenyl-1*H*-indol-5-yl)-3-oxobutanamide (2) and *N*-(1,5-dimethyl-2-phenyl-1*H*-indol-6-yl)-4,4,4-trifluoro-3-oxobutanamide (3) exerted no *SOS*-inducing activity at the examined concentrations. In contrast, 4-Hydroxy-8-phenyl-4-(trifluoromethyl)-1,3,4,7-tetrahydro-2*H*-pyrrolo [2,3-*h*]-quinoliN-2-one (4), 9-hydroxy-5-methyl-2-phenyl-9-(trifluoromethyl)-1,6,8,9-tetrahydro-7*H*-pyrrolo-[2,3-*f*]-quinoliN-7-one (5), 6-hydroxy-2,3-dimethyl-6-(trifluoromethyl)-1,6,7,9-tetrahydro-8*H*-pyrrolo[3,2-*h*]quinoliN-8-one (6) and 1,2,3,9-tetramethyl-6-(trifluoromethyl)-1,9-dihydro-8*H*-pyrrolo [3,2-*h*]-quinoliN-8-one (7) displayed a dose-dependent *SOS*-inducing activity at bactericidal concentrations. The data obtained allowed us to identify compounds 4, 5, 6, 7, which mechanism of action relies on affecting microbial cell DNA.

**Key words:** *SOS* chromotest, alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase activity, induction factor of the *SOS* response of a cell, genotoxicity, antibacterial activity.

## Введение

Механизм действия многих современных синтетических противомикробных соединений заключается либо в подавлении синтеза нуклеиновых кислот, либо в подавлении синтеза бактериального белка на уровне трансляции или

транскрипции. Исследование влияния вновь синтезированных соединений на структуру нуклеиновых кислот на примере бактериальной ДНК важно как для установления молекулярных механизмов антибактериальной активности новых молекул, так и для подтверждения предположений об их вероятной генотоксичности [1].

Для определения механизма воздействия биологически активных молекул на дезоксирибонуклеиновую кислоту прокариотической клетки целесообразно применять тест-систему, в которой индукция *SOS*-оперонов при наличии разных концентраций исследуемого вещества определяется по абсолютному значению активности  $\beta$ -галактозидазы [1].

Прокариотическая *SOS*-система — это бактериальная защитная система, которая включается в ответ на критическое разрушение дезоксирибонуклеиновой кислоты и/или подавление репликации, активируя тем самым череду защитных реакций, к которым относится экспрессия огромного количества генов, запускающих функции клетки, осуществляемые специальными ферментными системами и определяющие способность исправлять повреждения и разрывы в молекулах ДНК. Это так называемый *SOS*-ответ клетки, включающий физиологические и репарационные изменения, вызываемые действием *SOS*-системы [3].

Интенсивность нарушения целостности ДНК или ингибирования репликации в общем зависит от нескольких факторов, в том числе и химического взаимодействия молекулы с ДНК, которое также представляет собой одну из ступеней биологического механизма, ведущего к мутациям. В настоящее время базовые процессы *SOS*-регулона прокариот, запускающие программу *SOS*-сигнала бактерий на изменение ДНК, уже идентифицированы [3].

*SOS*-ответ формируют следующие реакции: подавление клеточного деления и метаболизма, активация лизогенных профагов и *SOS*-восстановление ДНК. Результатом быстрого запуска *SOS*-ответа может быть «ошибочная» репликация ДНК, сохраняющаяся при дальнейшем делении клеток. Роль *UmuDC*-зависимой *SOS*-репарации такова, что при множественных дефектах ДНК, в случае отставания клетки от запуска начальной последовательности ДНК, она имеет свойство продолжать репликацию путем введения случайных оснований в синтезированную цепь поверх поврежденного участка, что сопровождается большим числом ошибок. Таким образом, индукция *SOS*-ответа влечет за собой значительное увеличение частоты мутаций. При полной потере жизненно важных функций такая клетка в конечном итоге погибнет. Если же мутации, которые возникли при «ошибочном» *SOS*-восстановлении, не летальны, то клетка выживает, но ее потомство будет передавать мутации, возникающие в процессе *SOS*-ответа [2].

Как итог, факторы, вызывающие *SOS*-ответ прокариотической клетки, либо имеют ДНК-повреждающую (генотоксическую) активность, либо ингибируют репликацию и могут вызывать так называемый *SOS*-мутагенез.

Цель данного исследования — тестирование *SOS*-индуцирующей активности новых соединений, с обнаруженной и доказанной противомикробной активностью, с использованием *SOS*-хромотеста [9].

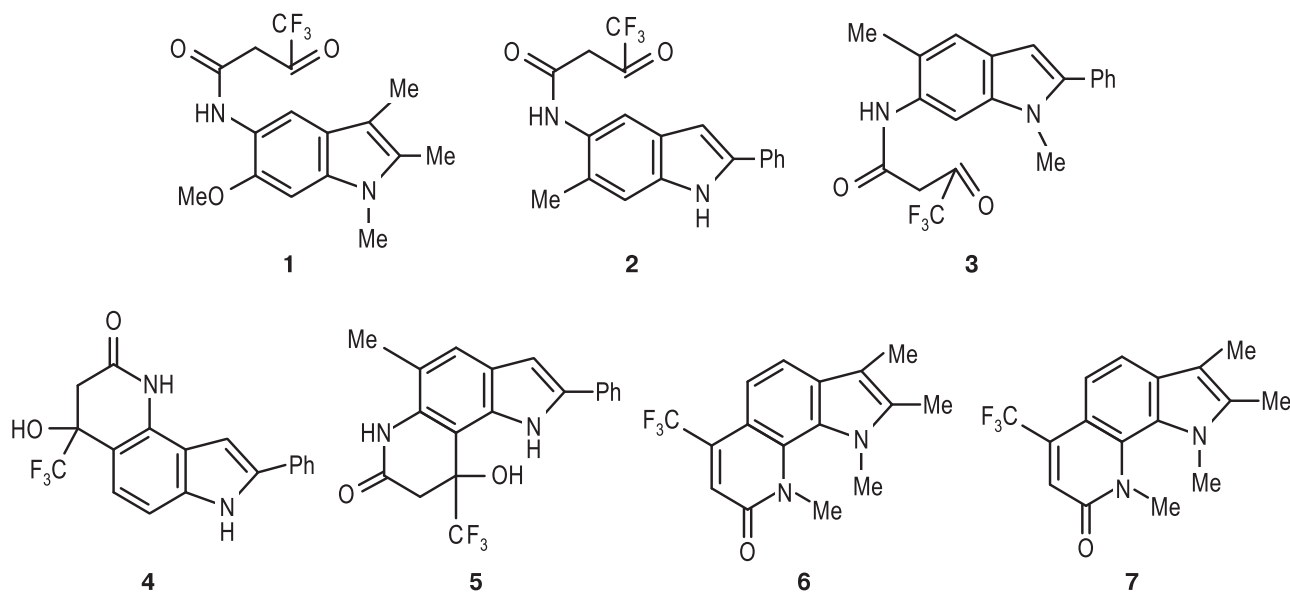
## Материалы и методы

В представленной работе для оценки *SOS*-индуцирующей активности исследуемых соединений использовался *SOS*-хромотест. В проведенном эксперименте применялась система, в которой активацию *SOS*-сигнала при добавлении различных концентраций тестируемого вещества оценивали по абсолютной величине активности  $\beta$ -галактозидазы [9]. Этот метод был предложен Филиппом Квилардетом и его коллегами [5, 6].

В качестве объектов исследования использовались следующие соединения на основе замещенных 1*H*-индол-4-, -5-, -6-, -7-иламинов: 4,4,4-трифтор-*N*-(6-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (1) на основе 6-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-иламина, 4,4,4-трифтор-*N*-(6-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (2) на основе 6-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-иламина, *N*-(1,5-диметил-2-фенил-1*H*-индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (3) на основе 1,5-диметил-2-фенил-1*H*-индол-6-иламина, 4-гидрокси-8-фенил-4-(трифторметил)-1,3,4,7-тетрагидро-2*H*-пирроло [2,3-*h*]-хинолин-2-он (4) на основе 2-фенил-1*H*-индол-4-иламина, 9-гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидро-7*H*-пирроло[2,3-*f*]-хинолин-7-он (5) на основе 5-метил-2-фенил-1*H*-индол-6-иламина, 6-гидрокси-2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,6,7,9-тетрагидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]-хинолин-8-он (6) и 1,2,3,9-тетраметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*] хинолин-8-он (7) на основе 2,3-диметил-1*H*-индол-7-иламина (рис.).

В качестве тестерного штамма в исследовании использован штамм *Escherichia coli* PQ 37 с генотипом *F-thr leu his-4 pyrD thi galE galK lacΔU169 srl300::Th10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Muc+ sfi A::Mud (Ap, lac) cts*. Изменение активности индуцибельного фермента  $\beta$ -галактозидазы, которое свидетельствует о *SOS*-индуцирующей активности тестируемых соединений, изучали посредством *SOS*-хромотеста. Активность индуцибельного фермента  $\beta$ -галактозидазы в данном тесте сравнивается с активностью конститутивного фермента щелочной фосфатазы. Это дает возможность определять уровень токсического воздействия исследуемых соединений на *SOS*-регулон прокариотической клетки [8].

Агаровая культура *E. coli* PQ37 переносится в пробирку с 5 мл *LB*-бульона с ампициллином (20 мкг/мл), культивируется при 37°C 12 ч. 12-ча-



**Рисунок. Соединения на основе замещенных 1H-индол-4-, -5-, -6-, -7-иламинов**

Figure. Compounds based on substituted 1H-indol-4-, -5-, -6-, -7-ylamines

совая «ночная» культура тест-штамма разводится в соотношении  $\frac{1}{3}$  свежим LB-бульоном с ампициллином (20 мкг/мл) и подрашивается при 37°C с аэрацией (оптическая плотность суспензии должна соответствовать 0,4 ЕД при 600 нм). Затем бактериальная суспензия разливается по 0,9 мл в пробирки, содержащие 100 мкл раствора исследуемого соединения в разных концентрациях, ДМСО («негативный контроль»), раствор мутагена митомицина С (10 мкг/мл), являющегося индуктором SOS-ответа клетки («положительный контроль»). Пробирки инкубируются при 37°C 24 ч, после чего определяется активность ферментов: щелочной фосфатазы и  $\beta$ -галактозидазы. Для определения активности фермента щелочной фосфатазы микробная суспензия в объеме 300 мл смешивается с 2,7 мл Т-буфера, а затем измеряется оптическая плотность раствора при длине волны 600 нм с помощью спектрофотометра (Shimadzu UV-1800, Япония). В пробирки добавляется 0,15 мл хлороформа и 0,1 мл 0,1%-ного додецилсульфата натрия, полученная смесь инкубируется на водяной бане 5 мин при 28°C. В пробирки с лизатами клеток добавляется 600 мкл раствора *N*-нитрофенилфосфата. Полученную смесь инкубируют 30 мин при комнатной температуре, а затем к смеси добавляется 1 мл 2М НСl и через 5 мин — 1 мл 2М Tris. Измеряется оптическая плотность каждой смеси при длинах волн 420 и 550 нм соответственно. Далее активность фермента щелочной фосфатазы рассчитывается по формуле (1) [6]:

$$A = \frac{D_{420} - 1,75 \times D_{550}}{t \times V \times D_{600}} \times 1000, \quad (1)$$

где 1,75 — поправочный коэффициент;  $D_{420}$ ,  $D_{550}$ ,  $D_{600}$  — соответствующие значения оптической плотности для реакционной смеси;  $t$  — время реакции (мин);  $V$  — объем культуры, взятой для определения (мл).

Для определения активности фермента  $\beta$ -галактозидазы микробную суспензию в объеме 300 мл смешивают с 2,7 мл Т-буфера, затем измеряется оптическая плотность раствора при длине волны 600 нм. В пробирки добавляется 0,15 мл хлороформа и 0,1 мл 0,1%-ного додецилсульфата натрия, после полученная смесь инкубируется на водяной бане 5 мин при 28°C. Затем пробирки со смесями сильно встряхивают. В пробирки с лизатами клеток добавляется *o*-нитрофенилгалактопиранозид, и полученную смесь инкубируется 30 мин при комнатной температуре. К смеси добавляется 2 мл 1М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , и измеряется оптическая плотность каждой смеси при длинах волн 420 и 550 нм. Активность фермента  $\beta$ -галактозидазы рассчитывается по формуле (1) [7]. Для количественной оценки SOS-ответа используют показатель IF (фактор индукции SOS-ответа клетки), который определяется по формуле (2) [6]:

$$IF = \frac{R(O)}{R(C)}, \quad (2)$$

где

$$R(O) = \frac{\text{Активность } \beta\text{-галактозидазы в опыте}}{\text{Активность щелочной фосфатазы в опыте}}$$

$$R(C) = \frac{\text{Активность } \beta\text{-галактозидазы в контроле}}{\text{Активность щелочной фосфатазы в контроле}}$$

Если показатель  $IF > 2$  (фактор индукции *SOS*-ответа клетки), то это свидетельствует о способности исследуемого соединения оказывать ДНК-повреждающее действие или нарушать или тормозить репликацию ДНК прокарриотической клетки [5].

## Результаты

Значение коэффициента индукции *SOS*-ответа соединения 5 оказалось ниже порогового значения при концентрациях 50 мкг/мл, где составило 1,2, и 500 мкг/мл, где составило 1,8. Увеличение концентрации исследуемого циклического амида 5 до 1000 мкг/мл вызвало изменение значения *IF*, которое превысило пороговый уровень «2» и составило 3,2. Испытуемое соединение 5 в концентрации 1000 мкг/мл повышало активность  $\beta$ -галактозидазы ( $p < 0,05$ ) (табл.). Амид 1 в исследуемых концентрациях ДНК не оказал статистически значимого эф-

фекта на активность индуцибельного фермента  $\beta$ -галактозидазы. Для исследуемого соединения 1 в концентрации от 50 до 1000 мкг/мл коэффициент индукции *SOS*-ответа был ниже порогового уровня «2».

Показатель коэффициента индукции *SOS*-ответа соединения 6 при концентрации 50 мкг/мл не превышал порогового значения и составил 1,3. Увеличение концентрации циклического амида 6 до 500 мкг/мл вызывало превышение порогового уровня значения *IF* и составляло 2,8. Дальнейшее увеличение концентрации исследуемого соединения 6 выявило дозозависимое увеличение показателя *IF* до 6,7. Анализируемый циклический амид статистически достоверно увеличивал активность индуцибельного фермента  $\beta$ -галактозидазы в концентрации 500 и 1000 мкг/мл.

Коэффициент индукции *SOS*-ответа пирролохинолона 7 оказался ниже порогового значения и составил 1,9 при использовании исследуе-

**Таблица. *SOS*-индуцирующая активность исследуемых соединений**

Table. *SOS*-inducing activity of the studied compounds

Исследуемое соединение Test compound	Доза, мкг/мл Dose, $\mu\text{g/ml}$	$\beta$ -галактозидаза, ЕД $\beta$ -galactosidase, ED	Щелочная фосфатаза, ЕД Alkaline phosphatase, EU	Фактор индукции <i>SOS</i> -ответа ( <i>IF</i> ) SOS response induction factor ( <i>IF</i> )
Негативный контроль Negative control	–	246,3 $\pm$ 27,0	1453,3 $\pm$ 94,8	–
Митомицин С Mitomycin C	10	2107,2 $\pm$ 70,9	1775,6 $\pm$ 93,1	7,02
5	50	243,4 $\pm$ 31,3	1290,8 $\pm$ 185,9	1,2
	500	399,2 $\pm$ 78,9	1315,2 $\pm$ 218,9	1,8
	1000	946,5 $\pm$ 34,6*	1682, 5 $\pm$ 73,1	3,2
1	50	173,5 $\pm$ 7,55	1575,5 $\pm$ 238,1	1
	500	192,6 $\pm$ 4,6	1506,1 $\pm$ 41,4	1,1
	1000	187,7 $\pm$ 6,3	1417,9 $\pm$ 133,9	1,17
6	50	246,0 $\pm$ 9,2	1636,6 $\pm$ 172,1	1,3
	500	532,1 $\pm$ 121,9*	1098,9 $\pm$ 386,0	2,8
	1000	1055,9 $\pm$ 94,2*	1387,9 $\pm$ 44,4	6,7
7	50	336,2 $\pm$ 12,7	1575,6 $\pm$ 194,0	1,9
	500	333,0 $\pm$ 22,1	1000,5 $\pm$ 107,9	3,1
	1000	591,0 $\pm$ 76,8*	1287,6 $\pm$ 130,9	3,8
3	50	211,2 $\pm$ 9,3	1188,4 $\pm$ 135,9	1,7
	500	211,2 $\pm$ 58,5	990,07 $\pm$ 99,2	2,1
	1000	224,9 $\pm$ 79,2	1132,6 $\pm$ 75,1	2
4	50	282,9 $\pm$ 39,9	868,4 $\pm$ 27,9	1
	500	640,43 $\pm$ 51,7	938,82 $\pm$ 60,8	2
	1000	1004,53 $\pm$ 113,3*	854,14 $\pm$ 41,6	3,1
2	50	297,1 $\pm$ 72,8	1019,5 $\pm$ 44,1	0,9
	500	279,1 $\pm$ 37,8	855,2 $\pm$ 47,6	0,9
	1000	276,3 $\pm$ 45,4	954,2 $\pm$ 57,2	0,9

**Примечание.** \* — отличие от контроля статистически достоверно при  $p < 0,05$ .

Note. \* — a significant difference compared to control is set at  $p < 0.05$ .

мого соединения в концентрации 50 мкг/мл. Увеличение концентрации пирролохинолона 7 до 500 мкг/мл показало изменение значения IF: оно превысило пороговый уровень «2» и составило 3,1. Исследуемое соединение 7 проявило дозозависимый *SOS*-индуцирующий эффект, но его способность вызывать *SOS*-ответ оказалась менее выражена, чем у циклического амида 6, а IF пирролохинолона 7 составил 3,8. Пирролохинолон 7 в концентрации 1000 мкг/мл увеличивал активность фермента  $\beta$ -галактозидазы ( $p < 0,05$ ).

Нециклический амид 3 в концентрации 50 мкг/мл не изменял значение коэффициента индукции *SOS*-ответа, оно было ниже порогового и составило 1,7. Увеличение концентрации амида 3 до 500 мкг/мл выявило превышение порогового уровня «2», и значение IF составило 2,1. Дальнейшее увеличение концентрации исследуемого соединения 3 до 1000 мкг/мл выявило лишь тенденцию к увеличению активности  $\beta$ -галактозидазы, а значение IF оставалось на уровне 2,0.

Циклический амид 4 в концентрации 50 мкг/мл не влиял на значение фактора индукции *SOS*-ответа, показатель IF оказался ниже порогового значения и составил 1,0. С увеличением концентрации (до 500 мкг/мл) циклического амида 4 значение IF составило 2,0. Дальнейшее увеличение концентрации исследуемого соединения 4 выявило дозозависимое увеличение показателя IF, которое составило 3,1. Циклический амид 4 достоверно увеличивал активность  $\beta$ -галактозидазы в концентрации 500 и 1000 мкг/мл ( $p < 0,05$ ).

На фоне использования амида 2 в исследуемых концентрациях индукции *SOS*-функций у тестируемого микроорганизма не выявлено. Нециклический амид 2 в концентрациях 50, 500, 1000 мкг/мл не оказывал влияния на активность  $\beta$ -галактозидазы тест-штамма *Escherichia coli* PQ 37.

## Обсуждение

Вышеописанные результаты дают возможность охарактеризовать вновь синтезированную группу соединений как неоднородную в отношении *SOS*-регулона прокариот. Ранее показано, что соединения из группы производных замещенных 1*H*-индол-5-иламинов менее активны в отношении микроорганизмов, вызывающих неспецифические и некоторые специфические инфекционные заболевания человека [9]. Результаты *SOS*-хроматеста продемонстрировали, что производные замещенных 1*H*-индол-5-иламинов, амиды 1 и 2, не обладают *SOS*-индуцирующей способностью в исследуемых концентрациях. В присутствии замещенного производного 1*H*-индол-6-

иламина 3 наблюдается тенденция к повышению активности  $\beta$ -галактозидазы в концентрации 1000 мкг/мл, но статистически значимого изменения значения фактора индукции *SOS*-ответа нет. Циклический амид 4, соединение на основе 2-фенил-1*H*-индол-6-иламина, оказывал дозозависимое влияние на активность  $\beta$ -галактозидазы тест-штамма *E. coli* PQ 37 ( $p < 0,05$ ). Биологически активные производные замещенных 1*H*-индол-6-иламина (циклический амид 5) и 2,3-диметил-1*H*-индол-7-иламина (циклический амид 6) и пирролохинолин 7, индукции *SOS*-сигнала у тестируемого штамма *Escherichia coli* в концентрации 50 мкг/мл не демонстрировали, а при более высоких концентрациях, которые являются бактерицидными, показали *SOS*-индуцирующую активность, что свидетельствует об их влиянии на ДНК прокариотических клеток.

Учитывая доказанный бактериостатический тип действия исследуемых соединений в минимальных подавляющих концентрациях (МПК) [4], можно сделать предположение, что механизм действия, который включает разрушающее влияние на клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану прокариот и опосредует гибель микроорганизма, не является основным антимикробным механизмом группы изучаемых производных 1*H*-индол-4-, -5-, -6-, -7-иламинов. При концентрациях 50, 500 мкг/мл исследуемые соединения не вызывали *SOS*-ответа микробной клетки, но при концентрациях 1000 мкг/мл соединения с широким спектром антимикробной активности [9] проявляли дозозависимый *SOS*-индуцирующий эффект.

Ни одно из исследуемых соединений не оказывало эффект, сравнимый с «положительным контролем» — известным мутагеном митомицином С, показатель IF которого составлял 7,2.

## Заключение

Экспериментальное исследование *SOS*-индуцирующей активности новых соединений с доказанной противомикробной активностью с использованием *SOS*-хроматеста, свидетельствует о том, что одним из механизмов биологического действия изучаемых соединений является воздействие на ДНК микробной клетки. При бактерицидных концентрациях соединения производные замещенных 1*H*-индол-4-, -6-, -7-иламинов способны воздействовать на ДНК прокариотических микроорганизмов, в бактериостатических концентрациях они и производные замещенных 1*H*-индол-5-иламинов, предположительно, имеют дополнительный механизм действия на микробную клетку. Полученные нами данные могут послужить материалом для будущих исследований.

## Список литературы/References

1. Бояршинов В.Д., Михалев А.И., Ухов С.В., Новикова В.В., Данилов Ю.Л. Синтез и противомикробная активность эфиров и амидов пиридин-2-карбоновой кислоты // *Фундаментальные исследования*. 2014. Ч. 1, № 11. С. 105–109. [Boyarshinov V.D., Mihalev A.I., Ukhov S.V., Novikova V.V., Danilov Yu.L. Synthesis and antimicrobial activity of pyridine-2-carboxylic acid esters and amides. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Researches*, 2014, pt. 1, no. 11, pp. 105–109. (In Russ.)]
2. Кадималиев Д.А., Степаненко И.С., Надежина О.С., Ямашкин С.А. Влияние различно замещенных пирролохинолонов на физиолого-биохимические характеристики лигнолитического гриба *Lentinus tigrinus* // *Микология и фитопатология*. 2014. Т. 48, № 5. С. 309–314. [Kadimaliev D.A., Stepanenko I.S., Nadezhina O.S., Yamashkin S.A. Influence of variously substituted pyrroloquinolones on physiological and biochemical characteristics of the lignolytic fungus *Lentinus tigrinus*. *Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*, 2014, vol. 48, no. 5, pp. 309–314. (In Russ.)]
3. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике / Под ред. С.И. Алиханяна. М.: Мир, 1976. 436 с. [Miller D. Experiments in molecular genetics. Ed. by S.I. Alikhanyan. Moscow: Mir, 1976. 436 p. (In Russ.)]
4. Патент № 2227140 Российская Федерация, МПК 7С07D 209/16. Способ получения серотонина и его фармакологических солей: № 2002128129; заявлено 2002.10.22; опубликовано 2004.04.27 / Алферов А.В., Северин Е.С., Крюков Л.Н. Патентообладатель: ЗАО «Лорр». [Patent No. 2227140 Russian Federation, Int. Cl. C07D 209/16. Method of production of serotonin and serotonin salts. No. 2002128129; application: 2002.10.22; date of publication 2004.04.27 / Alferov A.V., Severin E.S., Krjukov L.N., Panov A.E., Vorontsov E.A., Kuznetsov S.L., Mikerin I.E. Proprietors: Lorr Ltd.]
5. Патент № 2404982 Российская Федерация, МПК C07D 471/04 (2006.01), A61K 31/4439 (2006.01), A61P 31/04 (2006.01), A61P 31/06 (2006.01). Применение пирролохинолиновых соединений для уничтожения клинически латентных микроорганизмов: № 2008122912/04; заявлено 2006.08.11; опубликовано 2010.11.27 / Бек П.Х., Браун М.Б., Кларк Д.Е., Коутес Э., Дайк Х.Д., Ху Я., Лондесбро Д.Д., Миллс К., Паллин Т.Д., Рейд Г.П., Стодарт Г. Патентообладатель: Хелперби терапиястикс лимитед. 122 с. [Patent No. 2404982 Russian Federation, Int. Cl. C07D 471/04 (2006.01), A61K 31/4439 (2006.01), A61P 31/04 (2006.01), A61P 31/06 (2006.01). Application of pyrroloquinoline compounds for killing clinically latent microorganisms. No. 2008122912/04; application: 2006.08.11; date of publication 2010.11.27 / Bek P.H., Braun M.B., Klark D.E., Coates A., Dyke H.J., Hu Y., Londebrough D.J., Mills K., Pallin Th.D., Reid G.P., Stoddart G. Proprietors: Helperby therapeutics limited. 122 p.]
6. Рогачева А.В., Празднова Е.В., Мазанко М.С., Чистяков В.А. Ингибирование SOS-репарации у бактерий // *Актуальная биотехнология*. 2017. № 2. С. 77–79. [Rogacheva A.V., Prazdnova E.V., Mazanko M.S., Chistyakov V.A. Inhibition of SOS repair in bacteria. *Aktual'naya biotekhnologiya = Current Biotechnology*, 2017, no. 2, pp. 77–79. (In Russ.)]
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Мироннова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Guidelines for Conducting Preclinical Trials of Medicines. Part one / Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif and K, 2012. 944 p. (In Russ.)]
8. Садовникова М.С., Беликов В.М. Пути применения аминокислот в промышленности // *Успехи химии*. 1978. Т. 47, № 2. С. 357–383. [Sadovnikova M.S., Belikov V.M. Ways of using amino acids in industry. *Uspekhi khimii = Advances in Chemistry*, 1978, vol. 47, no. 2, pp. 357–383. doi: 10.1070/RC1978v047n02ABEH002212 (In Russ.)]
9. Сафарова А.Я., Гицу Г.А., Михайлицын Ф.С., Севбо Д.П., Трусов С.Н. Получение салициламида МСТ-28 и изучение противогименолепидозной активности // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2015. № 2. С. 41–42. [Safarova A.Ya., Gicu G.A., Mihajlicyn F.S., Sevbo D.P., Trusov S.N. Preparation of salicylamide MST-28 and study of anti-hymenolepidosis activity. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2015, no. 2, pp. 41–42. (In Russ.)]
10. Ушаков В.Ю. SOS-система репараций ДНК у бактерий (обзор) // *Вестник Пермского университета*. 2010. № 2. С. 19–30. [Ushakov V.Yu. SOS-system repair system in bacteria (review). *Vestnik Permskogo universiteta = Perm University Bulletin*, 2010, no. 2, pp. 19–30. (In Russ.)]
11. Alyamkina E.A., Yamashkin S.A., Stepanenko I.S., Yurovskaya M.A. 4-Amino-2-phenylindole-based compounds with potential antibacterial activity. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2017, vol. 72, no. 1, pp. 24–28. doi: 10.3103/S0027131417010023
12. Barrett T.C., Mok W.W., Murawski A.M., Brynildsen M.P. Enhanced antibiotic resistance development from fluoroquinolone persists after a single exposure to antibiotic. *Nat. Commun.*, 2019, vol. 10, no. 1: 1177. doi: 10.1038/s41467-019-09058-4
13. Cox M.M., Goodman M.F., Kreuzer K.N., Sherratt D.J., Sandler S.J., Mariani K.J. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*, 2000, vol. 404, no. 6773, pp. 37–41. doi: 10.1038/35003501
14. Hooper D.C. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, vol. 32, no. 1, pp. S9–S15. doi: 10.1086/319370
15. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, vol. 8, pp. 423–435. doi: 10.1038/nrmicro2333
16. Koonin E.V., Makarova K.S., Wolf Y.I. Evolutionary genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 71, pp. 233–261. doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093830
17. Kreuzer K.N. DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *CSH Perspectives in Biology*, 2013, vol. 5, no. 11: a012674. doi: 10.1101/cshperspect.a012674
18. Maeda T., Horinouchi T., Sakata N., Sakai A., Furusawa C. High-throughput identification of the sensitivities of an *Escherichia coli* Δ recA mutant strain to various chemical compounds. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 2019, vol. 72, no. 7, pp. 566–573. doi: 10.1038/s41429-019-0160-5
19. Mersch-Sundermann V., Kern S., Wintermann F. Genotoxicity of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and related structures on *Escherichia coli* PQ37 (SOS-Chromotest). *Environ. Mol. Mutagen.*, 1991, no. 18, pp. 41–50. doi: 10.1002/em.2850180108
20. Quillardet P., Hofnung M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mut. Res.*, 1985, vol. 147, no. 3, pp. 65–78. doi: 10.1016/0165-1161(85)90020-2

21. Quillardet P., Huisman O., Ari R.D., Hofnung M. SOS-chromotest, a direct assay of a SOS-function in Escherichia coli K12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, no. 19, pp. 5971–5975. doi: 10.1073/pnas.79.19.5971
22. Russell A.D., Hugo W.B., Ayliffe's G.A.J., Fraise A.P., Lambert P.A. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 4<sup>th</sup> ed. *Massachusetts: Blackwell Publishing*, 2004. 689 p. doi: 10.1002/9781118425831
23. Sanyal G., Doig P. Bacterial DNA replication enzymes as targets for antibacterial drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.*, 2012, vol. 7, no. 4, pp. 327–339. doi: 10.1517/17460441.2012.660478
24. Stepanenko I.S., Yamashkin S.A., Kostina Y.A., Batarshcheva A.A., Mironov M.A. A new group of compounds derived from 4-, 5-, 6- and 7-aminoindoles with antimicrobial activity. *Res. Results Pharmacol.*, 2018, vol. 4, no. 3, pp. 17–26. doi: 10.3897/rrpharmacology.4.29905
25. Stepanenko I.S., Yamashkin S.A., Kostina Y.A., Slastnikov E.D., Batarshcheva A.A. A study of the type of antimicrobial action of novel compounds synthesized from substituted benzaminoindoles. *Bulletin of RSMU*, 2019, no. 2, pp. 57–64. doi: 10.24075/brsmu.2019.030
26. Sutton M.D., Smith B.T., Godoy V.G., Walker G.C. The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu. Rev. Genet.*, 2000, vol. 34, pp. 479–497. doi: 10.1146/annurev.genet.34.1.479
27. Yamashkin S.A., Oreshkina E.A., Romanova I.S., Yurovskaya M.A. The potential use 6-amino-5-methoxy(methyl)-2,3-dimethyl- and 6-amino-5-methoxy(methyl)-1,2,3-trimethylindoles in synthesis pyrrolo[2,3-f]quinolines. *Chem. Heterocycl. Comd.*, 2006, vol. 42, no. 1, pp. 86–91. doi: 10.1002/chin.200641152
28. Yamashkin S.A., Oreshkina E.A., Yurovskaya M.A. Reaction of 2,3-dimethyl- and 1,2,3-trimethyl-6-amino-indoles with ethyl 4,4,4-trifluoroacetate. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2007, vol. 62, no. 2, pp. 105–108. doi: 10.3103/S0027131407020113

**Авторы:**

**Масейкина А.А.**, аспирант кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

**Степаненко И.С.**, д.м.н., доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

**Ямашкин С.А.**, д.х.н., профессор кафедры химии, технологии и методики обучения ФГБОУ ВО Мордовский государственный педагогический институт им. М.Е. Евсевьева, г. Саранск, Россия;

**Сластников Е.Д.**, студент ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия.

**Authors:**

**Maseykina A.A.**, PhD Student, Department of Immunology, Microbiology and Virology, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

**Stepanenko I.S.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

**Yamashkin S.A.**, PhD, MD (Chemistry), Professor, Department of Chemistry, Technology and Methods of Training, Mordovia State Pedagogical Institute named after M.E. Evseev, Saransk, Russian Federation;

**Slastnikov E.D.**, Student, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.04.2020  
Отправлена на доработку 21.05.2020  
Принята к печати 04.07.2020

Received 09.04.2020  
Revision received 21.05.2020  
Accepted 04.07.2020