

УДК 547.913

ДЕЙСТВИЕ МАСЕЛ КОРИЦЫ И ЛАВАНДЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *FtsZ Staphylococcus aureus* ATCC 29213

© 2013 г. А. Герман*, Ж. Боченек**, А. П. Герман**

*Академия косметики и здравоохранения, 00-252 Варшава, Польша

**Институт физиологии животных и питания им. Келановского, Польская академия наук, лаборатория молекулярной биологии, 05-110 Яблоня, Польша

e-mail: anna.herman @ wszkipz.pl

Поступила в редакцию 25.10.2012 г.

Показано влияние масел лаванды и корицы на экспрессию гена *FtsZ* у штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Эти масла частично ингибировали транскрипцию *FtsZ*, что приводило к нарушению клеточного деления на уровне формирования септы. Механизм действия масел аналогичен механизму действия лекарственных препаратов, применяемых в терапии стафилококковых инфекций. Представленные результаты могут быть основой дальнейших более детальных исследований влияния эфирных масел корицы и лаванды на синтез белков *FtsZ* на посттранскрипционном уровне и других стадиях клеточного деления как у *S. aureus*, так и других патогенных бактерий.

DOI: 10.7868/S0555109913050048

Рост устойчивости бактерий к действию антибиотиков делает чрезвычайно актуальным поиск других веществ для антибактериальной терапии. Противомикробные средства синтетического или природного происхождения, ингибирующие рост бактерий, – альтернативный метод антимикробной химиотерапии. Антимикробная активность эфирных масел и их компонентов, в том числе их способность подавлять рост бактерий, хорошо изучена [1]. Биологические свойства эфирных масел и их антимикробную активность приписывали различным соединениям, входящим в его состав, таким как флавоноиды, терпеноиды и фенилпропаноиды [2]. Действие этих веществ основано на денатурации белков мембран, вызывающей разрушение внешних мембранных структур. Как следствие инактивируются ферменты, участвующие в синтезе структурных компонентов бактериальных клеток, происходит дестабилизация систем переноса протонов и электронов, а также нарушение активного транспорта. В дальнейшем происходит коагуляция содержимого клетки, нарушение барьера, ингибирование синтеза ДНК, РНК, белков и полисахаридов бактериальной клетки, что приводит к нарушению обмена веществ и деления [3].

Белок *FtsZ*, формирующий Z-кольцо, является консервативным бактериальным цитоскелетным белком, который играет важную роль в инициации процесса деления клеток и поэтому может служить хорошей мишенью при разработке антибактериальных средств [4]. *FtsZ* – бактериальная ГТФ-зависимая гуанозинтрифосфатаза. При делении *FtsZ* включает и другие белки кле-

точного деления в процесс синтеза перегородки, необходимой для отделения дочерней клетки [5]. Потеря или ингибирование функции *FtsZ* приводит к нарушению синтеза клеточной стенки, к формированию вытянутых цепей клеток, делает их механически нестабильными и приводит к их разрушению [4]. Антимикробные агенты, имеющие сродство к *FtsZ*, подавляют экспрессию этого белка и перспективны для разработки новых лекарственных средств.

Цель работы – выяснение действия масел лаванды и корицы, двух антимикробных агентов естественного происхождения, на экспрессию гена *FtsZ* у штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

МЕТОДИКА

Подбор концентрации масел лаванды и корицы и времени инкубации для исследования экспрессии генов. Штамм *S. aureus* ATCC 29213 активировали с помощью двукратного пересева и выращивания на триптиказно-соевом агаре (ТСА, “BioMerieux”, Франция) при 37°C 48 ч. Несколько колоний ночной культуры суспендировали в LB среде (“Sigma”, США) с таким расчетом, чтобы плотность полученной суспензии клеток достигала 4.0 по шкале прозрачности МакФарланда ($\sim 1.2 \times 10^9$ КОЕ/мл).

Пробирки с культурой делили на 7 экспериментальных групп: контрольная (необработанная культура), культуры с 2.5, 0.25 и 0.025%-ными (об./об.) концентрациями масел *Cinnamomum zeylanicum* или *Lavandula officinalis*, полученными из (“Avicenna-Oil”, Польша), в каждой по 3 повторности. Для анализа количества жизнеспособных

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

№ в GenBank	Ген	Размер ампликона, п.о.	Прямой/обратный	Последовательность 5' → 3'
EU914258.1	<i>FtsZ</i> , температурозависимый мутант <i>Z (FtsZ)</i>	120	прямой	AAAGCTGCAGAGGAATCTCG
			обратный	TTTAGCAACGACTGGTGCTG
D83357.1	16S rРНК 16S рибосомальная РНК	136	прямой	GGGTCATTGGAAACTGGAAA
			обратный	CGCACATCAGCGTCAGTTAC
NC_002952.2	<i>gyr A</i> , субъединица ДНК-гиразы	126	прямой	CGTGAAGCGGTTGTAAATGA
			обратный	TTCTTCAACACGGTCCATGA
NC_002952.2	<i>gyr B</i> , субъединица ДНК-гиразы	138	прямой	GGTGGCGACTTTGATCTAGC
			обратный	GGTGGCGACTTTGATCTAGC
EF680394	<i>tfu</i> , фактор элонгации трансляции	138	прямой	CTGTAATCGCTGGTTCAGCA
			обратный	CTGGCATCATGAATGGTTTG
JQ740586	<i>tip</i> , триозофосфат-изомераза	125	прямой	ACGAAGAGCGTGAAAGTGGT
			обратный	GATTGCCAGATTGGTTCAT

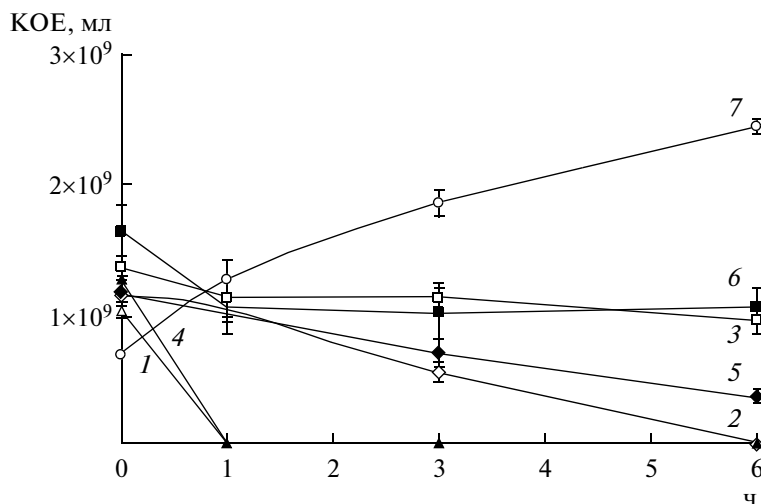
клеток отбирали пробы по 0.1 мл через 0, 1, 3 и 6 ч после начала инкубации, с момента добавления масла лаванды или корицы к исследуемой культуре. Разведенные аликвоты наносили на поверхность стерильных чашек с агаризованной средой LB и инкубировали 24 ч при 37°C. Кривые роста бактерий построены на основании подсчета среднего значения КОЕ/мл для трех повторностей и стандартного отклонения. Стандартное отклонение при расчете жизнеспособности бактерий не превышало 0.3 КОЕ.

Определение относительной экспрессии гена *FtsZ* в культуре *S. aureus*. Для исследования действия масел лаванды и корицы была выбрана концентрация 0.025% (об./об.) и длительность инкубации 3 ч, поскольку в таких условиях рост *S. aureus* эффективно подавлялся без быстрой гибели клеток. Через 3 ч отбирали аликвоты по 1.0 мл культуры, содержащей эфирные масла/ физиологический раствор (в 5 повторностях) и центрифугировали при 6000 g 3 мин. Бактериальный осадок ресуспендировали в 100 мкл ТЕ-буфера (10 mM трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 8.0; “Sigma”, США), содержащего 2 мг/мл лизоцима (“Sigma”, США), после чего полученную смесь инкубировали при 37°C 5 мин. Затем выделяли РНК в соответствии со стандартным протоколом производителя NucleoSpin® RNA II (“Macherey-Nagel GmbH and Co”, Германия) с применением ферментативного расщепления геномной ДНК. Количество и чистоту полученной РНК оценивали количественно по оптической плотности при 260 и 280 нм на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Целостность РНК проверяли методом гель-электрофореза в 1%-ной агарозе.

Синтез кДНК проводили с использованием компонентов DyNAmo™ SYBR® Green 2-Step qRT-PCR kit (“Finnzymes”, Финляндия) в соответствии с инструкцией изготовителя.

ПЦР проводили в режиме реального времени (РТ-ПЦР) с использованием компонентов того же комплекта олигонуклеотидных праймеров хроматографической чистоты, синтезированных в “Genomed” (Польша). Праймеры были разработаны с использованием программного обеспечения Primer 3 Whitehead Institute for Biomedical Research (США). В тех случаях, когда исследуемые последовательности генов не были найдены в базе данных GenBank, праймеры создавали для консервативных участков гена, которые были сконструированы на основании множественного выравнивания последовательностей для других штаммов *S. aureus* с использованием программного обеспечения BLAST. Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Реакции проводили на Rotor-Gene 6000 (“Qiagen”, Германия) с использованием следующего протокола: 95°C в течение 15 мин для инициации горячего старта ДНК-полимеразы, затем 30 циклов при 94°C 5 с для денатурации, затем 56°C 20 с для отжига и 72°C 15 с для наращивания. После проведения циклов для подтверждения специфичности амплификации проводили анализ кривых плавления с непрерывным измерением флуоресценции. Все данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Rotor Gene 6000 v.1.7 (“Qiagen”, Германия). Относительную экспрессию генов определяли с помощью программного обеспечения 2008 Corbett Research, Australia and M. Pfaffl, Technical University



Ингибирование роста *S. aureus* ATCC 29213 в присутствии различных концентраций масел *L. officinalis* (1–3) и *C. zeylanicum* (4–6). 2.5 (1), 0.25 (2), 0.025% (3) – концентрации масел лаванды; 2.5 (4), 0.25 (5), 0.025% (6) – концентрации масла корицы. Контроль – необработанная культура (7). Приведены средние значения, полученные в 3 экспериментах, и стандартное отклонение.

Munich, Germany (Австралия, Германия), используя алгоритм коррекции эффективности ПЦР, разработанный Пфафл с соавт. [6]. Чтобы компенсировать колебания в концентрациях кДНК и эффективности ПЦР в разных пробирках проводили амплификацию 16S рРНК или эндогенных генов контроля, т.е. *gyrA*, *tuf*, *tpi*, в каждом образце, результаты которой использовались для нормализации. Результаты были представлены в виде отношения экспрессии исследуемого гена к экспрессии гена сравнения. Статистическая достоверность различий между результатами оценки экспрессии генов в контроле и в пробах, инкубированных с эфирными маслами, определяли с использованием U-теста Манн-Витни (STATISTICA™, StatSoft, Польша). Результаты с $P < 0.1$ считали значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор концентрации масел лаванды, корицы и времени инкубации для исследования экспрессии генов. Масла корицы и лаванды в концентрации 2.5, 0.25 и 0.025% (об./об.) ингибировали рост *S. aureus* ATCC 29213 в зависимости от времени инкубации (рисунок). Было показано, что присутствие масла в концентрации 2.5% полностью убивало клетки микроорганизмов после 1 ч инкубации. При использовании масел корицы и лаванды в интервале концентраций от 0.25 до 0.025% наблюдали ингибирование роста микроорганизмов, начиная с 1 ч инкубации. Присутствие 0.025%-ного масла оказывало скорее бактериостатический, чем бактерицидный эффект. Благодаря мягкому, но эффективному воздействию эфирных масел на *S. aureus* ATCC 29213 в этой концентрации, эта доза была

выбрана как оптимальная для исследования экспрессии гена *FtsZ*.

Антимикробное действие масел лаванды и корицы и их основных компонентов хорошо описано и используется в фитотерапии [7, 8]. Иноу с соавт. [9] подтвердили, что основной компонент масла корицы – коричный альдегид (63.1%) – обладает более высокой антимикробной активностью по отношению к *S. aureus* FDA 209P, чем масло лаванды, содержащее линалоол (30.1%). Было показано также, что антимикробная активность масел корицы и лаванды идентична антимикробной активности их основных составляющих – коричневого альдегида и линалоола, для которых минимальные ингибирующие дозы были определены как 6.25 и 50 мг/л соответственно. Масло корицы в концентрации 0.125% обладало высокой антибактериальной активностью по отношению *S. aureus* ATCC 29213. Через 60 мин после начала инкубации в присутствии масла корицы в концентрации 0.125% (об./об.) происходило уменьшение жизнеспособности клеток на 42.86%, что согласовывалось с нашими результатами, полученными ранее [10].

Определение относительной экспрессии гена *FtsZ* в культуре *S. aureus*. Было обнаружено, что масла и корицы и лаванды в концентрации 0.025% снижали экспрессию гена *FtsZ* в культуре *S. aureus* ATCC 29213 по отношению к 16S рРНК и всем исследованным эндогенным генам: 16S рРНК, *gyrA*, *gyrB*, *tuf* и *tpi* (табл. 2). Было показано впервые, что масла лаванды и корицы способны подавлять активность *FtsZ*.

Механизм воздействия масел корицы и лаванды на *S. aureus* в настоящее время не ясен. В рабо-

те [10] было показано, что механизм действия масла корицы на *S. aureus* ATCC 29213 основан на разрушении мембранной оболочки, однако оказалось, что мембрана не является первой мишенью антибактериального действия. Первоначально клетки *S. aureus*, обработанные маслом корицы, оставались жизнеспособными, но некультивируемыми, что сопровождалось значительным снижением метаболической активности, сокращением транспорта питательных веществ, интенсивности дыхания и способности к репликации. Некультивируемое состояние является одной из стратегий выживания бактерий в ответ на стресс или одной из физиологических стадий на этапе гибели клеток. В дальнейшем масло корицы приводило к разрушению мембран и гибели *S. aureus*. Однако, это не единственный механизм воздействия эфирных масел на рост *S. aureus*. Авторами работы [11] было показано, что коричная кислота ингибирует ферменты, участвующие в поглощении глюкозы и синтезе АТФ у *S. aureus*. Домадиа с соавт. [12] обнаружили, что коричный альдегид ингибирует ГТФ-зависимую полимеризацию FtsZ, связывается с этим белком, что препятствует формированию Z-цикла, уменьшает частоту Z-колец на единицу длины клетки *E. coli*. Кроме того, Квон с соавт. [13] показали, что коричный альдегид эффективно инактивировал клетки *Bacillus cereus*, а также и ингибировал деление клеток без существенного снижения их плотности, что происходит, когда белок FtsZ инактивирован. Исследовано влияние различных фенольных соединений травянистых растений, таких как эвгенол, транс-коричная кислота, 4-формил-коричной кислоты, нарингенина и кофеиновой кислоты на *E. coli* [5]. Самым эффективным ингибитором полимеризации FtsZ оказалась транс-коричная кислота, тогда как 4-формил коричная кислота была наименее эффективным ингибитором из всех исследованных соединений.

Другие примеры природных соединений, подавляющих функцию FtsZ, могут служить куркумин, виридитоксин, дихаментин, тотарол, сангвинарин, берберин, хризофаентины, а из синтетических ингибиторов, такие как 3-[(6-хлор [1,3] тиазоло [5,4-b] пиридин-2-ил) метокси]-2,6-дифторобензамид (PC190723), 5-1,3-2- PC190723 (PC190723 аналог 8j), этил-(8-((4-(диэтиламино)-1-метилбутил)амино)-2,3-дифенилпиридо(2,3-b) пиазин-6-ил) карбамат (SRI-3072), этил (6-амино-2,3-дигидро-4-фенил-1H-пиридо (4,3-b) (1,4) диазепин-8-ил)карбамат (SRI-7614) и 3-{5-[4-оксо-2-тиоксо-3-(3-трифторметилфенил)-тиазолидин-5-илиденметил]фуран-2-ил} бензойная кислота (OTBA) [4, 14]. Эти соединения оказывали действие путем ингибирования ГТФазной активности FtsZ. Они воздействовали также и на полимеризацию FtsZ, нарушая образование Z-кольца, что в свою очередь приводило к ингибированию

Таблица 2. Эффект эфирных масел *L. officinalis* и *C. zeylanicum* на экспрессию гена *FtsZ* в культуре *S. aureus* ATCC 29213

Гены сравнения или рНК	Экспрессия гена <i>FtsZ</i> , % от контроля	
	масло лаванды	масло корицы
<i>gyrA</i>	69 ± 3*	73 ± 2*
<i>gyrB</i>	65 ± 12*	70 ± 13*
<i>tuf</i>	51 ± 13*	67 ± 16*
<i>tpi</i>	54 ± 10*	52 ± 8*
16S рНК	44 ± 4*	62 ± 12*

* $P < 0.01$ – значения, которые статистически достоверно отличаются от контроля, оцениваемого в рамках Ман-Уитни U теста.

клеточного деления [4, 14]. Парадиз-Бле с соавт. [15] показали, что аналоги ГТФ – по основной структуре, состоящие из остатков гуанина, связанных с Ала боковой цепью (ГАЛ) с различными N- и C-заместителями на концах, имитируют естественный субстрат ГТФ, что делает их перспективными ингибирами ГТФазной активности FtsZ. Гуанил – из структуры ГАЛ связывается с активным центром FtsZ и блокирует доступ ГТФ, таким образом выступая в роли ингибитора FtsZ. Было показано, что среди 9 синтезированных аналогов ГТФ, 5 ингибировали рост *S. aureus* ATCC 25923, при этом 2 из них были наиболее перспективными антибактериальными агентами. Таким образом, белок FtsZ является хорошим объектом для разработки и поиска потенциальных антибиотиков и природных соединений различной химической структуры (алкалоиды, фенолы и полифенолы) [14].

Результаты исследования показали, что одним из механизмов, с помощью которого масла лаванды и корицы могут ингибировать рост *S. aureus* ATCC 29213, является подавление экспрессии гена *FtsZ* и как следствие ингибирование деления бактерий. Представленные результаты могут служить основой для дальнейших детальных исследований, которые необходимы для выяснения действия эфирных масел на синтез FtsZ на посттранскрипционном уровне и на других стадиях клеточного деления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics / Ed. D. Chattopadhyay, Kerala (India): Research Signpost, 2010.
2. Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R.L. // Front. Microbiol. 2012. V. 3. P. 1–24.
3. Silva N.C.C., Fernandes Júnior A. // J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis. 2010. V. 16. № 3. P. 402–413.

4. Foss M.H., Eun Y.J., Weibel D.B. // Biochemistry. 2011. V. 50. № 36. P. 7719–7734.
5. Rastogi N., Domadia P., Shetty S., Dasgubta D. // Indian J. Exp. Biol. 2008. V. 46. № 11. P. 783–787.
6. Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. P. E36.
7. Cavanagh H.M.A., Wilkinson J.M. // Phytother. Res. 2002. V. 16. № 4. P. 301–308.
8. Sandigawad B.M., Patil C.G. // Asian J. Exp. Biol. Sci. 2010. V. 1. № 2. P. 434–439.
9. Inouye S., Takizawa T., Yamaguchi H. // J. Antimicrob. Chemother. 2001. V. 47. № 5. P. 565–573.
10. Bouhdid S., Abrini J., Amensour M., Zhiri A., Espuny M.J., Manresa A. // J. Appl. Microbiol. 2010. V. 109. № 4. P. 1139–1149.
11. Dorantes L., Colmenero R., Hernandez H., Mota L., Jaramillo M.E., Fernandez E., Solano C. // Intern. J. Food Microbiol. 2000. V. 57. № 1–2. P. 125–128.
12. Domadia P., Swarup S., Bhunia A., Sivaraman J., Dasgupta D. // Biochem. Pharmacol. 2007. V. 74. № 6. P. 831–840.
13. Kwon J.A., Yu C.B., Park H.D. // Lett. Appl. Microbiol. 2003. V. 37. № 1. P. 61–65.
14. Schaffner-Barbero C., Martín-Fontecha M., Chacon P., Andreu J.M. // ACS Chem. Biol. 2012. V. 7. № 2. P. 269–277.
15. Paradis-Bleau C., Beaumont M., Sanschagrín F., Voyer N., Levesque R.C. // Bioorg. Med. Chem. 2007. V. 15. № 3. P. 1330–1340.

Effect of Cinnamon and Lavender Oils on *FtsZ* Gene Expression in the *Staphylococcus aureus* ATCC 29213¹

A. Herman^a, J. Bochenek^b, and A. P. Herman^b

^a Academy of Cosmetics and Health Care Podwale 13 street, 00-252 Warsaw, Poland

^b The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Laboratory of Molecular Biology, Instytutcka 3 street, 05-110 Jablonna near Warsaw, Poland

e-mail: anna.herman@wszkipz.pl

Received October 25, 2012

Abstract—This study was designed to determine the effect of lavender and cinnamon oils on *FtsZ* gene expression in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. The cinnamon and lavender oils at least partially results from the inhibition of *FtsZ* transcription and disruption of cell division process at the level of the septum synthesis, what is similar to mechanisms of drug action used in anti-staphylococcal therapies. The presented results could be an important background for the further detailed research, which is needed to clarify the effect of essential oils on *FtsZ* synthesis at the posttranscriptional level and other stages of cell division process of *S. aureus* and other pathogenic bacteria.