

На правах рукописи

Инчагова Ксения Сергеевна

**ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ
НА СИСТЕМУ «QUORUM SENSING» LUXI/LUXR-ТИПА
У БАКТЕРИЙ (НА ПРИМЕРЕ *Chromobacterium violaceum*)**

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оренбург – 2020

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий» Российской академии наук, Оренбург

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Дерябин Дмитрий Геннадьевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, заведующий лабораторией выживаемости микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского («ФИЦ Биотехнологии РАН»)
Николаев Юрий Александрович

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»)
Нестерова Лариса Юрьевна

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук («ИБФРМ РАН»)**
(410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13)

Защита состоится «__» ____ 20__ года в __. __ часов на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: +7(342)2809211. E- mail: info@iegm.ru.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.minobrnauki.gov.ru>) и сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permisc.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «ИЭГМ УрО РАН» и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permisc.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Обнаружение плотностно-зависимой химической коммуникации у бактерий, обозначенной термином «quorum sensing» (QS), стало одним из наиболее ярких открытий в микробиологии конца XX века (Greenberg et al., 1996). Первоначально этот феномен был описан у морских люминесцирующих бактерий *Aliivibrio fischeri*, где включали синтазу LuxI, образуемые под её контролем низкомолекулярные аутоиндукторы – ацилированные гомосерин лактоны (АГЛ), а также воспринимающий их рецепторный белок LuxR, запускающий транскрипцию генов биолуминесценции при достижении высокой плотности бактериальной популяции (Wai-Leung, Bassler, 2009). В дальнейшем оказалось, что стереотипно устроенные QS системы LuxI/LuxR-типа обнаруживаются у множества других протеобактерий и используется ими в различных процессах функциональной или морфологической дифференцировки (Whiteley et al., 2017). В частности, у почвенной бактерии *Chromobacterium violaceum* синтезируемый белком CviI аутоиндуктор N-гексаноил-L-ацилгомосеринлактон (C₆-АГЛ) при накоплении в среде культивирования выше критической концентрации взаимодействует с цитоплазматическим рецепторным белком CviR, что индуцирует транскрипцию ряда ранее молчащих генов (в том числе *vioABCDE*-оперона) и проявляется в образовании сине-фиолетового пигмента виолацеина (Stauff, Bassler, 2011). На этом фоне принципиально важно, что у многих других фито- и зоопатогенных бактерий под контролем QS также находится синтез факторов вирулентности и образование биопленок, что делает эту систему перспективной мишенью для создания антибактериальных средств нового принципа действия (Хмель, 2006; Defoirdt, 2018).

Степень разработанности темы. В качестве одного из возможных инструментов управления QS рассматриваются антибиотики, современные представления о которых не исчерпываются их оценкой как факторов межмикробного антагонизма, но предполагают возможную роль данных молекул в процессах межклеточной коммуникации (Yim et al., 2007; Кожевин, 2014). Однако, имеющиеся публикации об участии антибиотиков в регуляции QS относительно немногочисленны, а представленные в них данные часто противоречивы. Так в работе Liu et al. (2013) субингибиторные концентрации канамицина, амикацина, гентамицина, тетрациклина и эритромицина не подавляли, но напротив, активировали QS-регулируемый биосинтез виолацеина у *C. violaceum*. Аналогичное исследование эффектов ванкомицина, тетрациклина и азитромицина на модели *Pseudomonas aeruginosa* PA01 также показало стимуляцию экспрессии ряда QS-регулируемых факторов вирулентности (Shen et al., 2008). С другой стороны, хорошо документированной является анти-QS активность субингибиторных концентраций азитромицина (Swatton et al., 2016), цефтазидима и ципрофлоксацина (Skindersoe et al., 2008). При этом для некоторых антибиотиков (в частности, тобрамицина) удалось связать подобную активность с подавлением биосинтеза аутоиндуктора, в условиях дефицита которого система QS переставала функционировать (Babic et al., 2010). Кроме того, в ряде исследований для потенцирования анти-QS активности антибиотиков предлагается их комбинирование с химическими соединениями иного принципа действия, однако принципы формирования подобных композиций пока не определены.

Целью работы стало исследование воздействия субингибиторных концентраций антибиотиков из групп пенициллинов, аминогликозидов и тетрациклинов на систему «quorum sensing» (QS) LuxI/LuxR-типа (на примере *Chromobacterium violaceum*) и разработка на данной основе возможных подходов к усилению их QS-модулирующей активности.

Основные задачи исследования:

1. Определение направленности воздействия пенициллинов на систему QS у *C. violaceum* с анализом условий формирования подобного эффекта.
2. Характеристика QS-модулирующего эффекта тетрациклинов и аминогликозидов с исследованием воздействия этих антибиотиков на синтез аутоиндуктора C₆-АГЛ у *C. violaceum*.
3. Поиск возможностей усиления QS-модулирующего эффекта антибиотиков при их комбинированном использовании с неорганическими и органическими соединениями различного механизма действия.

Научная новизна работы. Впервые обнаружена способность антибиотиков из группы пенициллинов при субоптимальных температурах культивирования индуцировать QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у *C. violaceum* в отсутствие его естественного аутоиндуктора C₆-АГЛ. Показано, что разрушение пенициллинов под действием экзогенных бета-лактамаз I и II типа ведет к совместному исчезновению антибактериального и виолацеин-индуцирующего эффектов, в то время как ингибирование собственных бета-лактамаз *C. violaceum* с использованием сульбактама и клавулановой кислоты сопровождается сочетанным изменением рост-ингибирующей и виолацеин-индуцирующей активностей пенициллинов. Совокупность полученных результатов предполагает возможность функционирования пенициллинов в качестве АГЛ-мимикрирующих молекул.

Установлено, что аминогликозиды и тетрациклины в широком диапазоне субингибиторных концентраций ингибируют QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у *C. violaceum*. Продемонстрировано, что у антибиотиков из группы аминогликозидов подобный эффект связан с подавлением биосинтеза аутоиндуктора C₆-АГЛ, в то время как у тетрациклинов определяется иными, неидентифицированными в рамках настоящего исследования механизмами. Подавление образования аутоиндукторов при воздействии субингибиторных концентраций аминогликозидных антибиотиков подтверждено в отношении АГЛ-продуцирующего клинического изолята *P. aeruginosa*.

Показано, что последовательное применение аминогликозидного антибиотика амикацина, ингибирующего образование аутоиндуктора C₆-АГЛ в культуре *C. violaceum*, и активированного угля, сорбирующего остаточные концентрации C₆-АГЛ из среды культивирования, обеспечивает аддитивное подавление QS, в то время как их одновременное использование не ведет к формированию подобного эффекта, вероятно, за счет частичной сорбции антибиотика на частицах активированного угля. Впервые продемонстрирована возможность супераддитивного усиления анти-QS эффекта амикацина в комбинации с малыми молекулами растительного происхождения (пирогаллолом и кумарином), нарушающими процессы восприятия C₆-АГЛ. Новизна подобной композиции защищена патентом РФ на изобретение № 2616237.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты расширяют представления об антибиотиках как природных молекулах, вовлеченных не только в феномен межвидового антагонизма, но в субингибиторных концентрациях участвующих в процессах межвидовой химической коммуникации. При этом биологическая целесообразность действия пенициллинов в качестве индукторов системы QS для воспринимающих их микроорганизмов может определяться запуском защитных реакций при низкой численности популяции в неоптимальных условиях существования. В свою очередь анти-QS активность тетрациклинов и аминогликозидов может сообщать их продуцентам дополнительные селективные преимущества, предотвращая у соседствующих с ними бактериальных популяций возможность QS-регулируемого образования биопленок и биосинтеза «ответных» факторов межмикробного антагонизма.

Практически-ориентированный аспект полученных результатов заключается в определении дополнительных показаний и противопоказаний к использованию антибиотиков для борьбы с бактериальными патогенами растений, животных и человека, обладающими стереотипно устроенными QS-системами LuxI/LuxR-типа. При этом выраженная анти-QS активность аминогликозидных антибиотиков с идентификацией лежащего в основе этого механизма, а также успешный опыт усиления подобного эффекта при сочетании аминогликозидов с рядом неорганических и органических соединений определяет перспективу разработки и использования подобных композиций для совершенствования лечения и профилактики бактериальных инфекций, возбудители которых используют системы QS при образовании биопленок и индукции своего патогенного потенциала.

Методология и методы исследования. Оригинальность использованного методического подхода определяется разнообразием использованных природных и генно-инженерных штаммов с компонентами QS-системы LuxI/LuxR-типа, в том числе *C. violaceum* ATCC 31532 и *C. violaceum* NCTC 13274 (CV026), позволяющих оценить как общую направленность QS-модулирующего эффекта антибиотиков (индукция или ингибирование), так и расшифровать отдельные элементы механизма подобного воздействия, в том числе связанные с нарушением образования автоиндуктора C₆-АГЛ.

Возможность получения развернутых представлений о воздействии субингибиторных концентраций антибиотиков на систему QS и возможностях модуляции подобной биоактивности определялась использованием химически чистых субстанций пенициллинов, аминогликозидов и тетрациклинов, коммерчески доступных ферментов (бета-лактамаз), а также химических аналогов малых молекул растительного происхождения и фармакопейного препарата активированного угля.

Исследование QS-модулирующей активности антибиотиков и других химических соединений выполнено в контролируемых сериях экспериментов по индукции/ингибированию биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum* или биолюминесценции у рекомбинантных штаммов *E. coli* pAL101 и *E. coli* pAL103 с количественным инструментальным учетом результативных параметров.

Выбор использованных статистических методов соответствовал поставленным задачам и позволял охарактеризовать выявленные различия и тенденции с достаточной степенью достоверности.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Антибиотики пенициллинового ряда в субингибиторных концентрациях стимулируют QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у LuxI-дефицитного штамма *C. violaceum* CV026, что проявляется при субоптимальных температурах культивирования и может быть усилено в присутствии ингибиторов бета-лактамаз.

2. Антибиотики, ингибирующие синтез белка (тетрациклины и аминогликозиды) в субингибиторных концентрациях подавляют QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у *C. violaceum* ATCC 31532 с полноценной системой LuxI/LuxR-типа, что у аминогликозидных антибиотиков определяется подавлением биосинтеза автоиндуктора C₆-АГЛ.

3. Ингибирующий эффект аминогликозидов (на примере амикацина) на систему QS у *C. violaceum* ATCC 31532 может быть усилен путем их последовательного использования с активированным углем, сорбирующим C₆-АГЛ из среды культивирования, или при совместном использовании с малыми молекулами растительного происхождения (пирогаллолом и кумарином), нарушающими процесс восприятия C₆-АГЛ.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора.

Автором самостоятельно осуществлена постановка цели и определены основные задачи диссертационной работы, выбраны и обоснованы необходимые для их достижения методы исследований. Автором самостоятельно выполнена основная часть экспериментов, проведена их математическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов. Подготовка к печати научных работ, отражающих результаты диссертационного исследования, осуществлена автором самостоятельно или при участии соавторов.

Основной объем работ проведен в 2015-2019 годах на базе ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН. Исследования выполнялись при финансовой поддержке Государственного задания Министерства образования и науки РФ по проекту №148 «Антибактериальные и бактерио-регуляторные соединения, основанные на новых принципах действия», гранта РФФИ № 16-44-560692 р_а «Выявление и исследование регуляторных эффектов антибиотиков в отношении системы «чувства кворума» LuxI/LuxR-типа у бактерий», и гранта Правительства Оренбургской области для аспирантов № 18 «Способы усиления кворум-ингибирующей активности антибиотиков».

Степень достоверности и апробация работы. Научные положения и выводы обоснованы и базируются на воспроизводимых экспериментальных данных, степень достоверности которых доказана путем использования методов статистического анализа.

Отдельные фрагменты работы доложены и обсуждены на VIII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2016), научной конференции «История и методология физиолого-биохимических и почвенных исследований» (Пермь, 2017), а также XXI Международном конгрессе МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии (Москва, 2019).

Апробация работы состоялась 18.06.2020 г. на заседании Ученого совета ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в международные системы научного цитирования *Web of Science* и *Scopus*, а также 2 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований, получен 1 патент РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 137 страницах, содержит 11 таблиц и иллюстрирована 29 рисунками. Список литературы включает 230 наименований, из них 219 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. СИСТЕМА «QUORUM SENSING» – НОВАЯ ПЕРСПЕКТИВНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Проанализирован феномен «quorum sensing» (QS) у бактерий, история его открытия, принципы молекулярной организации и разнообразие вариантов, а также биологические проявления, находящиеся под контролем QS (Waters, Bassler, 2005; Хмель, 2006). Описаны возможные подходы к ингибированию QS бактериальных патогенов, использующих системы плотностно-зависимой химической коммуникации для индукции своего патогенного потенциала (Remy et al., 2018). Обобщены ранее полученные данные о способности антибиотиков к регуляции QS и проанализированы известные механизмы подобного эффекта (Skindersoe et al., 2008; Babic et al., 2010; Swatton et al., 2016). Обоснована актуальность изучения антибиотиков из групп пенициллинов, тетрациклинов и аминогликозидов как возможных модуляторов QS системы LuxI/LuxR-типа у бактерий.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные для исследования модулирующего воздействия антибиотиков на «quorum sensing» у бактерий. Основными инструментами исследования стали два генетически связанных штамма *Chromobacterium violaceum* с двухкомпонентной QS-системой, включающей синтазу CviI (функциональный аналог белка LuxI), ответственную за образование автоиндуктора N-гексаноил-L-ацилгомосерин лактона (C₆-АГЛ), и воспринимающего его рецепторного белка CviR (аналог LuxR), запускающего транскрипцию целевых генов (Таблица 1). Дикий штамм *C. violaceum* ATCC 31532 имеет полноценную систему CviI/CviR, в том числе контролирующую QS-зависимый биосинтез сине-фиолетового пигмента виолацеина с максимумом поглощения при 570-600 нм. В свою очередь производный от него штамм *C. violaceum* NCTC 13274 (CV026) имеет инсерцию транспозона mini-Tn5 в ген *cviI*, что ведет к необратимой утрате биосинтеза автоиндуктора C₆-АГЛ и блокирует самостоятельный синтез пигмента виолацеина. Данная способность может быть восстановлена при внесении в среду культивирования экзогенного C₆-АГЛ (Stauff, Bassler, 2011) или иных АГЛ-мимикрирующих химических соединений (Blosser, Gray, 2000).

Таблица 1. Характеристика штаммов, использованных для оценки эффектов антибиотиков на QS-системы LuxI/LuxR-типа

Характеристики использованных штаммов	<i>C. violaceum</i> ATCC 31532	<i>C. violaceum</i> CV026	<i>E. coli pAL101</i>	<i>E. coli pAL103</i>
Компоненты системы «quorum sensing»				
Синтаза автоиндуктора	CviI	инсерция транспозона mini-Tn5 в гене <i>cviI</i>	-	-
Рецепторный белок	CviR	CviR	RhlR (из <i>P. aeruginosa</i>)	LuxR (из <i>V. fischeri</i>)
Воспринимаемый автоиндуктор	C ₆ -АГЛ	C ₆ -АГЛ	C ₄ -АГЛ	C ₆ -оксо-АГЛ/ C ₆ -АГЛ
Признаки, находящиеся под контролем системы «quorum sensing»				
Индукцируемый оперон	<i>vioABCDE</i>	<i>vioABCDE</i>	<i>luxCDABE</i>	<i>luxCDABE</i>
Фенотипическое проявление	Пигмент виолацеин	Пигмент виолацеин	Биолюми- несценция	Биолюми- несценция
Дополнительные характеристики				
Генетические детерминанты резистентности	-	Km ^r (в транспозоне mini-Tn5)	Tet ^r (в плазмиде <i>pAL101</i>)	Tet ^r (в плазмиде <i>pAL103</i>)
Устойчивость	-	Аминогликозиды	Тетрациклины	Тетрациклины

Другими инструментами стала пара рекомбинантных биосенсоров *Escherichia coli pAL101* и *pAL103*, созданных на основе хозяйского штамма *E. coli* JLD271 с мутацией в гене *sdiA*, продукт которого распознает АГЛ и мог бы конкурировать с другими белками за его связывание (Lindsay, Ahmer, 2005). При этом *E. coli pAL101* несет плазмиду *pAL101* с геном *rhlR* из *P. aeruginosa*, продукт которого рецептирует автоиндуктор N-бутирил-L-ацилгомосеринлактон (C₄-АГЛ) и запускает транскрипцию кассеты *luxCDABE* генов с развитием свечения (биолюминесценции). В свою очередь *E. coli pAL103* несет плазмиду *pAL103* с геном рецепторного белка *LuxR* из *Vibrio fischeri*, воспринимающим N-(оксогексаноил)-L-ацилгомосеринлактон (C₆-оксо-АГЛ) или N-гексаноил-L-ацилгомосеринлактон (C₆-АГЛ), что также сопровождается индукцией биолюминесценции (Таблица 1).

Важной особенностью являлось наличие в составе транспозона mini-Tn5 генетической детерминанты Km^r, определяющей устойчивость к аминогликозидам, а в составе плазмид *pAL101* и *pAL103* детерминанты Tet^r, кодирующей устойчивость к тетрациклинам, что обеспечивало отсутствие искажающего воздействия названных антибиотиков на восприятие АГЛ у несущих их бактериальных штаммов.

В отдельной серии экспериментов использовали четыре клинических изолята *Pseudomonas aeruginosa* с экспериментально доказанной способностью к продукции АГЛ, выделенных из патологического материала в одном из родовспомогательных учреждений г. Оренбурга.

Для проверки завершенности ферментативной инактивации пенициллинов с использованием бета-лактамаз, а также при исследовании сорбции аминогликозидов на частицах активированного угля, использован штамм *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* FDA 209P (ATCC 6538P), проявляющий высокую чувствительность к широкому кругу антибактериальных препаратов.

Антибиотики и химические соединения, использованные для модулирования систем «quorum sensing» у бактерий. Исследованные антибиотики из группы пенициллинов были представлены природным соединением бензилпенициллином (CAS 61-33-6), а также полусинтетическими аминопенициллинами (ампициллин, CAS 69-53-4; амоксициллин, CAS 26787-78-0), изоксазолилпенициллином (оксациллин, CAS 66-79-5), карбоксипенициллинами (карбенициллин, CAS 4697-36-3; тикарциллин, CAS 34787-01-4) и уреидопенициллинами (азлоциллин, CAS 37091-66-0; пиперациллин, CAS 66258-76-2). Формой их использования явились диски производства компании HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия) с содержанием названных антибиотиков от 1 до 100 мкг/диск.

Ферментативную инактивацию пенициллинов проводили с использованием смеси бета-лактамаз I и II типа, образуемых *Bacillus cereus* (Sigma-Aldrich, США) с активностью 1,500-3,000 U/мг по бензилпенициллину и 10-30 U/мг по цефалоридину. Защиту пенициллинов от воздействия собственных бета-лактамаз *S. violaceum* осуществляли с использованием сульбактама и клавулановой кислоты.

Включенные в исследование антибиотики из группы тетрациклинов представляли собой химически чистые субстанции тетрациклина гидрохлорида (CAS 64-75-5) и доксициклина гидрохлорида (CAS 100929-47-3). В свою очередь использованные химически чистые субстанции аминогликозидов относились к I (канамицина сульфат, CAS 25389-94-0), II (гентамицина сульфат, CAS 1405-41-0) и III (амикацина сульфат, CAS 37517-28-5) поколениям данной группы антибиотиков.

В качестве потенциального сорбента C₆-АГЛ использован фармакопейный препарат активированного угля (CAS 16291-96-6) производства ОАО «Фармстандарт-Лексредства» (Россия) с показателем зольности менее 1% и значением йодного индекса 800-900 мг/г.

Химически синтезированные аналоги малых молекул растительного происхождения с потенциальной анти-QS активностью: пирогаллол (1,2,3-тригидроксибензол; CAS 87-66-1) и кумарин (2H-хромен-2он; CAS 91-64-5), были предоставлены компаниями «TCI EUROPE N.V.» (ЕС) и «Enamine Ltd» (Украина).

Для контрольной индукции систем «quorum sensing» у *S. violaceum* CV026 и *E. coli* pAL103 использовали химически синтезированный C₆-АГЛ (CAS 147852-83-3), а для аналогичных исследований на *E. coli* pAL101 – C₄-АГЛ (CAS 67605-85-0) с чистотой ≥95% (Cayman Chemicals, США).

Методы исследования QS-модулирующей активности антибиотиков, химических соединений и их комбинаций. Определение способности субингибиторных концентраций антибиотиков стимулировать либо подавлять систему «quorum sensing» у *S. violaceum* проводилось в биотесте индукции/ингибирования QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина методом диффузии в агар и методом серийных разведений.

Первый из них предусматривал внесение 200 мкл суточной культуры *C. violaceum* в 5 мл 0,5% LB-агара (Sigma, США) с 0,4% глюкозы и последующего настила на предварительно подготовленный плотный слой из 10 мл 1,5% LB-агара. На поверхности инокулированной среды размещали диски с исследуемыми антибиотиками (по 6 дисков одного наименования на чашку Петри); в центр помещали диск с С₆-АГЛ. Чашки культивировали при 17°C, 22°C, 27°C, 32°C и 37°C в течение 1-4 суток. Антибактериальный эффект оценивали по формированию прозрачных зон с полным отсутствием роста; QS-индуцирующий эффект регистрировали в тесте с мутантным штаммом *C. violaceum* CV026 по возникновению пигментированных ореолов; QS-ингибирующий эффект – в тесте с диким штаммом *C. violaceum* ATCC 31532 по депигментированным ореолам вокруг зон подавления роста. Выраженность QS-модулирующей активности выражали значениями площадей соответствующих зон (мм²), рассчитываемых по формулам: $S_{GI} = \pi \times R_{GI}^2 - S_{д}$, $S_{VI} = \pi \times R_{VI}^2 - S_{GI} - S_{д}$, где R_{GI} – радиус зоны подавления роста, R_{VI} – наружный радиус пигментированной или депигментированной зоны (Tolmacheva et al., 2014).

Во втором варианте в жидкой питательной среде (LB-бульоне) в объемах по 2 мл готовили серии двукратных разведений антибиотиков в диапазоне от 100 мкг/мл до 0,05 мкг/мл; пробы LB-бульона, не содержащие антибиотик, использовали в качестве положительного (рост тестерного штамма) и отрицательного (стерильного) контролей. Среда инокулировали 20 мкл суточной культуры *C. violaceum* ATCC 31532 и инкубировали в статическом режиме при 27°C в течении 24 ч. Оценку результатов эксперимента проводили с использованием микрострипового фотометра STAT FAX 303 VIS+ (Awareness Technology, США), последовательно регистрируя оптическую плотность бактериальной биомассы при 450±5 нм, а количественное присутствие пигмента виолацеина после его этанольной экстракции при 600±5 нм. Выраженность QS-модулирующего эффекта выражали величинами ЕС₁₀₀ и ЕС₅₀, соответствующими 100% и 50% подавлению биосинтеза пигмента виолацеина относительно положительного контроля при пересчете на единицу биомассы.

При исследовании QS-модулирующей активности комбинаций аминогликозидов (на примере амикацина) с другими химическими соединениями формировали панели стеклянных емкостей 8×12 (при сочетании с активированным углем) или использовали пластиковые 96-луночные планшеты (при сочетании с пирогаллолом и кумарином), в которые вносили двукратные разведения тестируемых соединений в перпендикулярных друг другу направлениях, что обеспечивало их различные концентрационные соотношения. Учет результата исследования проводили с использованием фотометра как описано выше.

Изучение продукции АГЛ диким штаммом *C. violaceum* ATCC 31532 и клиническими изолятами *P. aeruginosa*, оценку сорбции АГЛ на частицах активированного угля, а также ряд других экспериментов проводили в тесте индукции биолюминесценции у *E. coli* pAL101 и *E. coli* pAL103. Интенсивность развивающегося свечения регистрировали в 96-луночных планшетах из непрозрачного пластика «Microlite 2+» (Thermo, США) на биолуцинометре LM 01T (Immunotech, Чехия) с использованием программного обеспечения KILIA, выражая его величиной RLU (англ. – relative light units). Степень индукции биолюминесценции определяли как отношение интенсивности свечения исследуемого образца на 60 мин к исходной точке.

Методы статистической обработки результатов исследования. Все эксперименты выполнены не менее чем в пяти повторностях. Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики с использованием компьютерных программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и STATISTICA 10 (StatSoft, США). Для определения эффекта предложенных композиций использован изоболографический анализ (Tallarida, 2006).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение направленности воздействия пенициллинов на систему QS у *C. violaceum* с анализом условий формирования подобного эффекта. Исследование чувствительности *C. violaceum* CV026 к антибиотикам группы пенициллинов (Рисунок 1а) позволило констатировать широкий спектр эффектов: от отсутствия антибактериальной активности у бензилпенициллина, ампициллина, амоксициллина и оксациллина (с содержанием 1 мкг/диск) до выраженного подавления бактериального роста при использовании азлоциллина, пиперациллина и карбенициллина, характеризуемого площадью стерильных зон от 240 до 1267 мм². В свою очередь тикарциллин и оксациллин в дозе 5 мкг/диск обуславливали развитие умеренно выраженного антибактериального эффекта с площадью зон подавления бактериального роста от 157 до 382 мм². Проведение подобных экспериментов при температурах 17°C, 22°C, 27°C, 32°C и 37°C свидетельствовало об отсутствии зависимости рост-ингибирующего эффекта пенициллинов в отношении *C. violaceum* CV026 от температуры культивирования с экстремумами при 22°C и 37°C.

На этом фоне для ряда исследованных антибиотиков (пиперациллин, азлоциллин, тикарциллин, карбенициллин и оксациллин), в ореолах вокруг зон подавления бактериального роста, зафиксирована индукция биосинтеза сине-фиолетового пигмента виолацеина, оцениваемая как проявление QS-стимулирующего эффекта. Площадь подобных кольцевидных ореолов варьировала от 233 до 743 мм², при этом существенной особенностью являлось их возникновение только в субоптимальном для роста *C. violaceum* CV026 диапазоне температур (от 17°C и максимуме при 22°C) с исчезновением QS-стимулирующего эффекта при увеличении температуры культивирования до 27-37°C (Рисунок 1б). Отдельным наблюдением являлось развитие сине-фиолетовой пигментации диска с ампициллином (25 мкг/диск) на неизменном бактериальном газоне в отсутствие подобного эффекта при снижении содержания этого антибиотика до 10 мкг/диск, что также регистрировалось в субоптимальном диапазоне температур.

Сопоставление наличия и выраженности оцениваемых эффектов продемонстрировало существование положительной корреляционной взаимосвязи в паре «антибактериальная активность – индукция биосинтеза виолацеина» ($r = 0,82$; $P < 0,05$), что позволяет рассматривать их как взаимодополняющие проявления биологической активности антибиотиков из группы пенициллинов в отношении *C. violaceum* CV026, реализуемые при высоких (бактериостатических) и низких (субингибиторных) концентрациях.

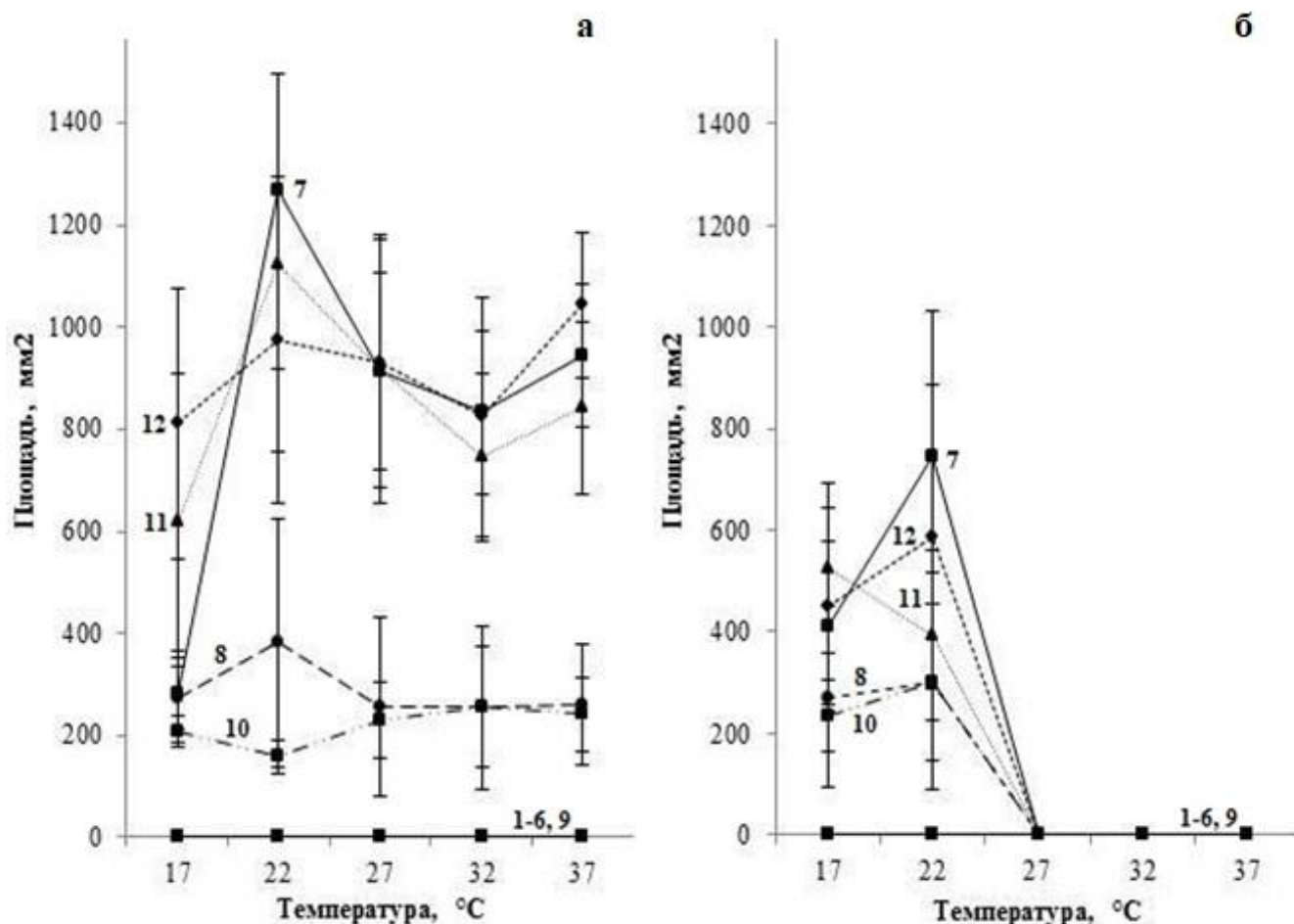


Рисунок 1 – Выраженность антибактериального (а) и QS-стимулирующего (б) эффектов пенициллинов в тесте на *C. violaceum* CV026. По оси абсцисс – температура культивирования; по оси ординат – площадь зон подавления роста (а) и зон пигментации (б) вокруг дисков с антибиотиками.

Обозначения: 1 – бензилпенициллин 2 U/диск; 2 – бензилпенициллин 10 U/диск; 3 – ампициллин 10 мкг/диск; 4 – ампициллин 25 мкг/диск; 5 – амоксициллин 10 мкг/диск; 6 – амоксициллин 25 мкг/диск; 7 – карбенициллин 100 мкг/диск; 8 – тикарциллин 75 мкг/диск; 9 – оксациллин 1 мкг/диск; 10 – оксациллин 5 мкг/диск; 11 – азлоциллин 75 мкг/диск; 12 – пиперациллин 100 мкг/диск

Для доказательства роли пенициллинов как индукторов QS-зависимого биосинтеза виолацеина у *C. violaceum* CV 026 была проведена серия экспериментов, оценивающая активность продуктов ферментативной деградации данных антибиотиков смесью бета-лактамаз I и II типа. При этом утрата их антибактериальной активности, контролируемая по отсутствию воздействия на высокочувствительный тест-штамм *S. aureus* 209 P (ATCC 6538P), сопровождалась и полным исчезновением QS-стимулирующего эффекта в отношении *C. violaceum* CV026. Тем самым полученные данные свидетельствовали в пользу идентичности материальных носителей (молекул/фрагментов молекул), необходимых для развития оцениваемых видов биологической активности.

С целью анализа значения собственной бета-лактамазной активности тестерного штамма *C. violaceum* CV026 для его реагирования на воздействие

пенициллинов, активность антибиотиков была исследована в присутствии ингибиторов бета-лактамаз: сульбактама и клавулановой кислоты (Таблица 2). При этом аминопенициллины (ампициллин в дозе 10 мкг/диск и амоксициллин в дозе 25 мкг/диск), самостоятельно не проявляющие детектируемых видов активности, в комбинации с сульбактамом (10 мкг/диск) начинали оказывать сочетанные антибактериальный и QS-индуцирующий эффекты. На этом фоне комбинация тикарциллина (75 мкг/диск) с клавулановой кислотой (10 мкг/диск) приводила к парадоксальному эффекту, заключающемуся в снижении выраженности регистрируемых эффектов в 1,36-1,44 раза, что, однако, также свидетельствовало в пользу взаимосвязи между антибактериальным и QS-стимулирующим действием данного антибиотика.

Таблица 2. Изменение выраженности антибактериального и QS-стимулирующего эффектов антибиотиков из группы пенициллинов при тестировании на *C. violaceum* CV026 в присутствии ингибиторов бета-лактамаз

Антибиотик	Площадь зон, мм ²			
	Собственный эффект		Эффект в присутствии ингибиторов бета-лактамаз	
	Подавление роста	Стимуляция QS (индукция виолацеина)	Подавление роста	Стимуляция QS (индукция виолацеина)
Ампициллин, 10 мкг	0	0	6,4*	12,6**
Амоксициллин, 25 мкг	0	0	9,4***	14,2***
Тикарциллин, 75 мкг	17	21,2	11,8*	15,6*

Обозначения: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Таким образом, совокупность полученных результатов расширяет представления о спектре биологических активностей антибиотиков из группы пенициллинов и указывает на наличие у них дополнительных информационно-коммуникационных функций, реализуемых в субингибиторном концентрационном диапазоне данных соединений. При этом биологическая целесообразность подобной видонеспецифической химической коммуникации у *C. violaceum* в естественных условиях существования (почве) может определяться запуском QS-регулируемых реакций этого микроорганизма, даже в условиях низкой плотности бактериальной популяции останавливающего деление и начинающего образование биопленки, что в совокупности способно повысить его устойчивость к более высоким концентрациям природных антибиотиков.

Вероятным механизмом QS-модулирующего эффекта пенициллинов является их функционирование в качестве АГЛ-мимикрирующих молекул, что обосновывается вызываемой ими индукцией биосинтеза пигмента виолацеина в условиях необратимой мутации гена *cvlI* у тест-штамма *C. violaceum* CV026, а также частичным сходством строения молекул пенициллинов и АГЛ, дополняемым филогенетическим родством и близкой субстратной специфичностью бета-лактамаз и АГЛ-лактоназ (Tang, Zhang, 2014). Косвенным подтверждением данного предположения является

развитие QS-стимулирующего эффекта пенициллинов только при субоптимальных для роста *C. violaceum* температурах: учитывая, что N-концевой АГЛ-связывающий домен LuxR-подобных белков одновременно является мишенью для шаперонина GroEL (Manukhov et al., 2010), релаксированное состояние белка CviR при низкой температуре в отсутствие белков-шаперонинов может являться важным условием для доступности его взаимодействия со структурно сходными, но не идентичными АГЛ молекулами пенициллинов, в то время как стабилизация белка CviR в результате взаимодействия с шаперонинами при повышении температуры сохраняет возможность подобного связывания только в отношении гомологичного автоиндуктора C₆-АГЛ.

Характеристика QS-модулирующего эффекта тетрациклинов и аминогликозидов с исследованием воздействия этих антибиотиков на синтез автоиндуктора C₆-АГЛ у *C. violaceum*. Предварительное тестирование тетрациклинов и аминогликозидов в отношении дикого штамма *C. violaceum* ATCC 31532 на плотных питательных средах позволило зарегистрировать формирование выраженных депигментированных ореолов вокруг дисков с данными антибиотиками, что указывало на проявление ими QS-ингибирующего эффекта. В свою очередь культивирование *C. violaceum* ATCC 31532 в жидкой питательной среде в присутствии широкого диапазона концентраций тетрациклинов и аминогликозидов позволило дать четкую количественную оценку воздействия названных антибиотиков на рост и QS-зависимый биосинтез виолацеина, охарактеризовав их значениями МИК₁₀₀ и МИК₅₀, ЕС₁₀₀ и ЕС₅₀ (Рисунок 2).

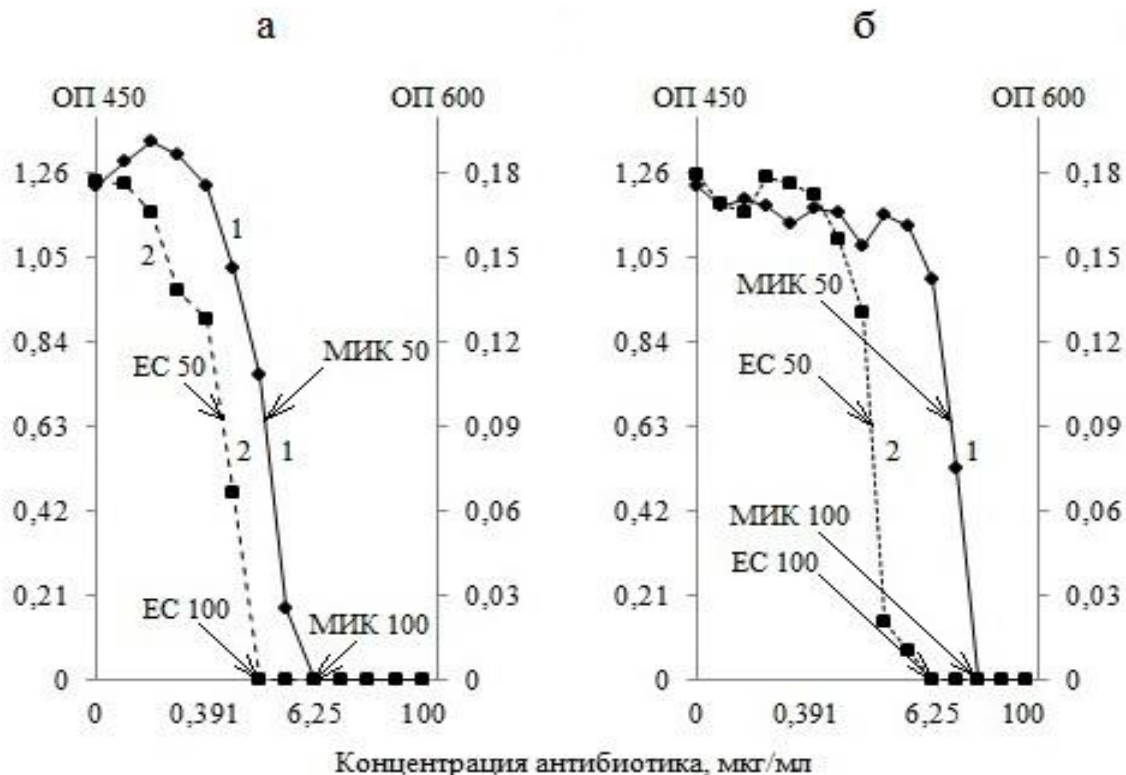


Рисунок 2 – Пример воздействия доксициклина гидрохлорида (а) и амикацина сульфата (б) на рост и пигментообразование *C. violaceum* ATCC 31532.

Обозначения: 1 (сплошная линия) – оптическая плотность биомассы (ОП₄₅₀), ось ординат слева; 2 (пунктирная линия) – оптическая плотность пигмента (ОП₆₀₀), ось ординат справа

Полученные результаты свидетельствовали о достаточно высокой чувствительности *C. violaceum* ATCC 31532 к тетрациклину ($\text{МИК}_{100} = 3,13$ мкг/мл) и доксициклину ($\text{МИК}_{100} = 6,25$ мкг/мл) при несколько меньшей рост-ингибирующей активности аминогликозидов, возрастающей в ряду (МИК_{100}): канамицин (100 мкг/мл) → гентамицин (50 мкг/мл) → амикацин (25 мкг/мл). Одновременно было установлено, что все исследуемые антибиотики в субингибиторных концентрациях подавляли QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина, хотя выраженность подобного эффекта, а также его соотношение с прямой рост-ингибирующей активностью была различной. Так для полного подавления биосинтеза виолацеина с использованием тетрациклина и доксициклина требовались концентрации 0,39 мкг/мл и 1,56 мкг/мл, соответственно, в то время как для достижения 50% эффекта достаточными являлись их концентрации 0,27 мкг/мл и 0,75 мкг/мл. В свою очередь аналогичные значения EC_{100} и EC_{50} для канамицина составили 6,25 мкг/мл и 1,80 мкг/мл, для гентамицина – 3,13 мкг/мл и 0,18 мкг/мл, а для амикацина – 6,25 мкг/мл и 1,07 мкг/мл. При этом соотношение концентраций, обуславливающих полное подавление роста (МИК_{100}) и пигментообразования (EC_{100}) равнялось 4-8 в группе тетрациклинов и достигало 16 при использовании аминогликозидов. Наконец, соотношение $\text{МИК}_{50}/\text{EC}_{50}$, наиболее полно характеризующее диапазон концентраций антибиотиков, вызывающих подавление QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина в отсутствие рост-ингибирующего эффекта, оказывалось на уровне 2,5-3,7 в группе тетрациклинов против 10,8-44,4 в группе аминогликозидов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии у исследуемых антибиотиков двух видов биологической активности: рост-ингибирующей, реализуемой при их высоких концентрациях и более характерной для тетрациклинов, а также QS-ингибирующей, проявляющейся при субингибиторных концентрациях и типичной для антибиотиков из группы аминогликозидов.

Совокупность полученных результатов определила задачу изучения возможных механизмов действия субингибиторных концентраций тетрациклинов и аминогликозидов, в том числе как модуляторов синтеза химических сигналов, опосредующих систему плотностно-зависимой коммуникации. При этом дизайн проведенного эксперимента заключался в культивировании дикого штамма *C. violaceum* ATCC 31532 в присутствии (опыт) и в отсутствии (контроль) антибиотиков с последующим отделением супернатанта и его тестированием на сенсорных штаммах *E. coli* *pAL103* с детерминантой Tet^r и *C. violaceum* CV026 с детерминантой Km^r , в предварительных экспериментах показавших сопоставимый ответ как на интактный C_6 -АГЛ, так и на его смеси с тетрациклинами или аминогликозидами, соответственно. На основании калибровочных кривых, построенных с использованием химически чистого C_6 -АГЛ, присутствие автоиндуктора в супернатантах выражалось в мкМ в пересчете на 1 ед. ОП₄₅₀ культуры-продуцента.

Результаты проведенного исследования свидетельствовали о неидентичном характере воздействия субингибиторных концентраций тетрациклинов и аминогликозидов на накопление C_6 -АГЛ в среде культивирования дикого штамма *C. violaceum* ATCC 31532 (Таблица 3).

Таблица 3. Влияние тетрациклинов и аминогликозидов на продукцию С₆-АГЛ в культуре *C. violaceum* ATCC 31532

Концентрация антибиотика, мкг/мл	Концентрация С ₆ -АГЛ в образце: в числителе – мкМ в пересчете на 1 ед. ОП ₄₅₀ ; в знаменателе – в % от контрольных значений				
	Тетрациклин	Доксициклин	Канамицин	Гентамицин	Амикацин
Контроль	<u>1,30</u> 100,0	<u>1,30</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0
0,05	<u>1,30</u> 100,0	<u>1,30</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>67,21</u> 98,0
0,10	<u>1,30</u> 100,0	<u>1,30</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0
0,20	<u>1,50</u> 115,0	<u>1,30</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0	<u>68,10</u> 100,0
0,40	<u>1,90</u> 146,0	<u>1,43</u> 110,0	<u>62,03</u> 91,0	<u>66,71</u> 98,0	<u>54,52</u> 79,0
0,80	<u>0,97</u> 74,0	<u>1,69</u> 130,0	<u>60,75</u> 89,2	<u>68,10</u> 100,0	<u>2,72</u> 4,0
1,56	<u>0,56</u> 42,0	<u>1,08</u> 83,0	<u>58,63</u> 86,0	<u>2,04</u> 3,0	<u>2,04</u> 3,0
3,13	н/р	<u>0,60</u> 46,0	<u>58,63</u> 86,0	<u>1,36</u> 2,0	<u>0,68</u> 1,0
6,25	н/р	н/р	<u>22,52</u> 33,0	<u>0,54</u> 0,8	<u>0</u> 0
12,50	н/р	н/р	<u>2,04</u> 3,0	<u>0</u> 0	<u>0</u> 0
25,00	н/р	н/р	<u>0,34</u> 0,5	<u>0</u> 0	н/р
50,00	н/р	н/р	<u>0</u> 0	н/р	н/р
100,00	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р

Примечание: н/р – отсутствие роста

Так, наиболее близкие к МИК концентрации тетрациклина (0,8-1,56 мкг/мл) и доксициклина (1,56-3,13 мкг/мл) приводили к умеренному снижению содержания автоиндуктора: до 42-83% от контрольных значений. Последующее же уменьшение концентраций данных антибиотиков сопровождалось парадоксальным накоплением внеклеточного С₆-АГЛ в среде культивирования, содержание которого достигало 130-146% по сравнению с соответствующим контролем. Таким образом, развивающийся в присутствии субингибиторных концентраций тетрациклинов в диапазоне от 1/2 до 1/16 МИК эффект имел двухфазный характер с последовательным снижением и повышением концентраций внеклеточного автоиндуктора, потенциально определяемым соотношением интенсивностей его синтеза и потребления из среды культивирования.

В свою очередь содержание автоиндуктора в культуральной жидкости *C. violaceum* ATCC 31532, выращенного в присутствии антибиотиков группы аминогликозидов в диапазоне от 1/2 до 1/4 МИК, характеризовалось нулевыми значениями (Таблица 3). Дальнейшее снижение концентраций канамицина с 50 до

1,56 мкг/мл, гентамицина с 25 до 0,8 мкг/мл и амикацина с 12,5 до 0,2 мкг/мл сопровождалось постепенным восстановлением синтеза внеклеточного C_6 -АГЛ у сенсорного штамма до 95-100% от контрольных значений. Таким образом, полученные результаты позволили констатировать, что действие аминогликозидов в широком диапазоне их субингибиторных концентраций (до 1/32 – 1/64 МИК) связано с выраженным подавлением биосинтеза автоиндуктора, в условиях дефицита которого двухкомпонентная система «quorum sensing» у *C. violaceum* ATCC 31532 перестает функционировать.

Предполагаемый механизм QS-модулирующего эффекта тетрациклинов (на примере доксициклина) и аминогликозидов (на примере канамицина) был дополнительно проанализирован на примере четырех клинических изолятов *P. aeruginosa*, способность которых к образованию N-бутирил-L-гомосерин лактона (C_4 -АГЛ) предварительно показана с использованием сенсорного штамма *E. coli* *pAL101* с клонированным геном *rhlR*, продукт которого рецептирует C_4 -АГЛ и запускает транскрипцию кассеты *luxCDABE* генов с развитием свечения (биолюминесценции). При этом культивирование *P. aeruginosa* в присутствии канамицина вело к полному подавлению образования автоиндуктора, с использованием *E. coli* *pAL101* не обнаруженного ни в одном из проанализированных супернатантов во всем исследованном диапазоне субингибиторных концентраций данного антибиотика. В свою очередь эффектом доксициклина являлось накопление внеклеточного C_4 -АГЛ в среде культивирования выше контрольных значений, что может указывать на нарушение восприятия этого автоиндуктора бактериальными клетками-мишенями.

Таким образом, совокупность полученных результатов указывает на наличие у двух групп антибиотиков – ингибиторов биосинтеза белка (тетрациклинов и аминогликозидов) дополнительной QS-модулирующей активности, что согласуется с полученными на других моделях данными об аналогичной активности субингибиторных концентраций доксициклина (Husain, Ahmad, 2013) и аминогликозидного антибиотика тобрамицина (Babic et al., 2010). При этом особенностью действия названных групп антибиотиков на модельный штамм *C. violaceum* ATCC 31532 являлся различный баланс их прямого антибактериального и QS-ингибирующего эффектов, первый из которых превалировал у тетрациклинов, а второй был выражен у аминогликозидов. Другим важным наблюдением являлось обнаружение связи QS-ингибирующего эффекта аминогликозидов с подавлением синтеза автоиндуктора C_6 -АГЛ у лабораторного штамма *C. violaceum* ATCC 31532 или C_4 -АГЛ у клинических изолятов *P. aeruginosa*, что вновь находит согласование с данными о сходном механизме действия тобрамицина (Babic et al., 2010) и в целом формирует представления о названной группе антибиотиков как перспективном средстве подавления плотностно-зависимой химической коммуникации у микроорганизмов, использующих систему «quorum sensing» для индукции своего патогенного потенциала.

Поиск возможностей усиления QS-модулирующего эффекта антибиотиков при их комбинированном использовании с неорганическими и органическими соединениями различного механизма действия. Полученные результаты сформировали основу для решения итоговой задачи, связанной с возможностью потенцирования QS-ингибирующего эффекта аминогликозидов (на примере

амикацина) при его сочетании с химическими соединениями, проявляющими иные механизмы подавления химической коммуникации у бактерий.

В качестве первого из подобных соединений был выбран фармакопейный препарат активированного угля, обладающий высокой сорбционной активностью в отношении широкого круга органических соединений, а в рамках проведенного исследования тестированный на способность к сорбции АГЛ. Количественная характеристика подобной активности была дана в отдельной серии экспериментов, предусматривающей контакт фиксированных количеств C_6 -оксо-АГЛ или C_6 -АГЛ с навесками активированного угля в статических условиях с последующим отделением супернатантов и их оценкой в биотесте на рекомбинантном штамме *E. coli pAL103*, отвечающем дозозависимым свечением на присутствие в среде культивирования АГЛ с шестью атомами углерода в ацильной цепи. Сравнение количеств C_6 -оксо-АГЛ или C_6 -АГЛ до и после сорбции на частицах активированного угля позволило охарактеризовать его сорбционную емкость значениями $(9 \pm 0,8) \times 10^{-9}$ мг/мг и $(11 \pm 0,9) \times 10^{-9}$ мг/мг, соответственно. Тем самым результаты проведенного исследования позволили расширить представления об активированном угле как поливалентном физико-химическом антидоте (Senderovich, Vierhout, 2018), в том числе эффективно сорбирующем малые ауторегуляторные молекулы бактериального происхождения, вследствие чего он может быть назван вторым после алкиламин-модифицированного циклодекстрина (Morohoshi et al., 2013) неорганическим соединением, обеспечивающим эффективный «перехват» внеклеточных АГЛ.

На следующем этапе тестирование композиций амикацина и активированного угля проводили в панелях стеклянных емкостей 8×12 , в которые двукратные разведения названных соединений вносили в перпендикулярных друг другу направлениях, формируя различные соотношения действующих компонентов. Смеси инокулировали культурой *S. violaceum* ATCC 31532 и после инкубации оценивали выраженность антибактериального и QS-модулирующего эффектов. Итоговую оценку эффектов сформированных композиций проводили с использованием изоболографического анализа, заключающегося в определении положения экспериментальных точек, координатами которых (x; y) являются концентрации действующих компонентов, необходимых для достижения EC_{50} , относительно наклонной прямой (изоболы), соединяющей значения EC_{50} для каждого из них по отдельности. При этом расположение экспериментальной точки на линии изоболы характеризует эффект композиции как «аддитивный», под изоболой – «супераддитивный» (взаимное усиление), а выше её – как «инфрааддитивный» (взаимное ослабление эффекта).

Так интегральная оценка эффекта композиций амикацина и активированного угля (Рисунок 3а) показала смещение большинства экспериментальных точек выше изоболы, что характеризовало действие этих компонентов как инфрааддитивное. На этом фоне единственным исключением являлась комбинация 3,54 мкг/мл антибиотика и 4738,52 мкг/мл сорбента, при изоболографическом анализе оцененная как аддитивная: действие компонентов суммируется, а индекс комбинированного воздействия расположен на линии изоболы.

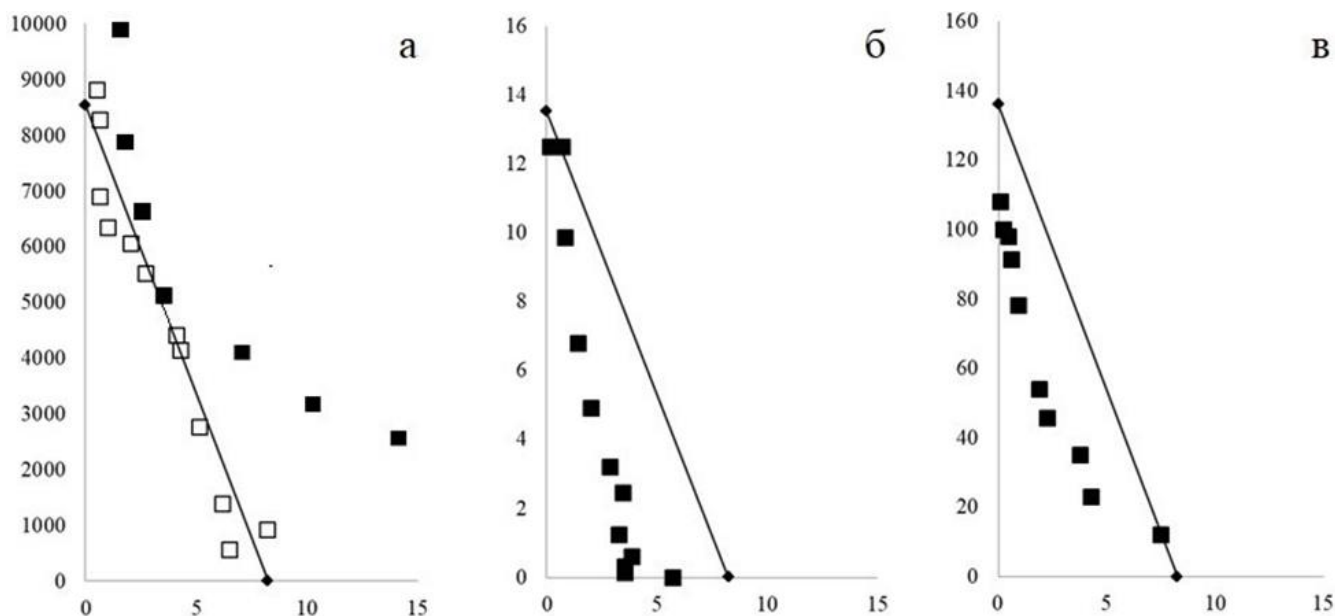


Рисунок 3 – Изоболографический анализ совместного воздействия комбинаций амикацина с активированным углем (а), пирогаллолом (б) и кумарином (в) на QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина в культуре *C. violaceum* ATCC 31532.

Обозначения: черные квадраты – одновременное использование действующих компонентов; белые квадраты – последовательное использование (при тестировании композиции амикацина с активированным углем)

Объяснением причин подобного эффекта стала сорбция амикацина на частицах активированного угля, изменяющая биодоступную концентрацию антибиотика в среде культивирования. В результате проведенного исследования на чувствительном к амикацину штамме *S. aureus* FDA 209P установлено, что степень сорбционного извлечения антибиотика из среды культивирования активированным углем достигала 50-75%, что соответствовало 2-4 кратному увеличению МИК₁₀₀ амикацина в отношении данного биосенсора.

С учетом указанного обстоятельства второй вариант комбинированного использования антибиотика и сорбента включал: 1) воздействие амикацина 0,05-100 мкг/мл на дикий штамм *C. violaceum* ATCC 31532; 2) разделение биомассы и культуральной жидкости с накопленным в ней автоиндуктором; 3) контакт последней с навесками активированного угля 1000-30000 мкг/мл; 4) финальную оценку остаточных количеств автоиндуктора в биотесте с сенсорным штаммом *C. violaceum* CV026, специфически отвечающим биосинтезом пигмента виолацеина на присутствие С₆-АГЛ. В результате изменения дизайна эксперимента зарегистрировано выраженное смещение кривых дозозависимого эффекта амикацина в сторону более низких концентраций антибиотика, а индексы его комбинированного использования с активированным углем расположились на или вдоль изоболы, соединяющей значения ЕС₅₀ антибиотика и сорбента (Рисунок 3а), что характеризовало действие тестируемой композиции как аддитивное.

Другим использованным подходом явилось тестирование комбинаций амикацина с малыми молекулами – пирогаллолом и кумарином, ранее идентифицированными в составе растительных экстрактов с выраженной анти-QS активностью (Ni et al., 2008). Проведенное в рамках настоящей работы исследование

биологической активности полных химических аналогов названных соединений в отношении *C. violaceum* ATCC 31532 подтвердило наличие подобной активности: субингибиторные концентрации пирогаллола подавляли QS-зависимую продукцию виолацеина на 50% в дозе 13,5 мкг/мл и приводили к полному угнетению пигментообразования в дозе 19,71 мкг/мл и выше. Аналогичный QS-ингибирующий эффект кумарина регистрировался в более узком концентрационном диапазоне, характеризуясь величинами $EC_{50}=136,0$ мкг/мл и $EC_{100}=182,69$ мкг/мл.

Дополнительный анализ механизма биоактивности пирогаллола и кумарина был проведен в серии экспериментов с использованием сенсорного штамма *E. coli pAL103* в двух вариантах исполнения. Первый из них, в котором в культуру сенсорного штамма одновременно вносили C_6 -АГЛ и пирогаллол или кумарин, не выявил достоверных изменений в сроке индукции и уровне биолюминесценции *E. coli pAL103*, что свидетельствовало против возможной конкуренции исследуемых молекул за связывание с АГЛ-распознающим участком белка LuxR. С другой стороны, предварительная 60-минутная инкубация сенсорного штамма с пирогаллолом или кумарином с последующей индукцией внесением C_6 -АГЛ существенно снижала интенсивность люминесцентного отклика *E. coli pAL103*. Тем самым полученный результат позволял связать вероятный механизм QS-ингибирующей активности исследуемых молекул с нарушением чувствительности бактериальных клеток к действию автоиндуктора, детали которого требуют своего дальнейшего изучения.

В частности, не исключается возможность анти-QS эффекта пирогаллола как дополнительного проявления его прооксидантной активности (Defoirdt et al., 2013). В свою очередь аналогичные эффекты кумарина хорошо согласуются с представлениями о нем как новом эффективном растительном ингибиторе «quorum sensing» у бактерий (Reen et al., 2018), механизм действия которого также связан со снижением чувствительности к природным и химически синтезированным автоиндукторам у клеток *Vibrio splendidus* (Zhang et al., 2016). При этом тонким механизмом действия кумарина, вероятно, является ингибирование метаболизма циклического 3',5'-дигуанилата – внутриклеточного посредника, вовлеченного в регуляцию синтеза бактериальных экзополисахаридов, образования биопленок, адгезии и вирулентности (D'Almeida et al., 2017).

Итоговое проведение исследований в перекрестной матрице концентраций пирогаллола (0,15-157,64 мкг/мл) или кумарина (1,43-1461,52 мкг/мл) с амикацином (в диапазоне 0,05-100 мкг/мл) выявило их повышенную биоактивность в тесте подавления QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина, проявляющуюся в смещении кривых совместного дозозависимого эффекта относительно соответствующего контроля. При этом изоболографический анализ (Рисунок 3б, в) свидетельствовал о супераддитивном характере действия подобных композиций, проявляющемся в расположении всех экспериментальных точек воздействия под прямыми, соединяющими значения EC_{50} антибиотика и малых молекул растительного происхождения. Одновременно, на фоне принципиального сходства биоактивности тестируемых композиций, изоболографический анализ фиксировал и некоторые особенности их QS-ингибирующего эффекта. Так в присутствии низких концентраций пирогаллола (0,154-12,5 мкг/мл) концентрация амикацина, необходимого для 50% подавления биосинтеза виолацеина, снижалась в 2-3 раза (Рисунок 3б), в то время как

сам амикацин в минимальных концентрациях (0,11-7,5 мкг/мл) обеспечивал аналогичный эффект в отношении анти-QS активности кумарина (Рисунок 3в).

Таким образом, проведенное исследование позволило определить принципы формирования комбинаций антибиотиков с иными химическими соединениями, совместное использование которых позволяет достичь усиления присущих каждому из них QS-модулирующего эффекта (Рисунок 4).

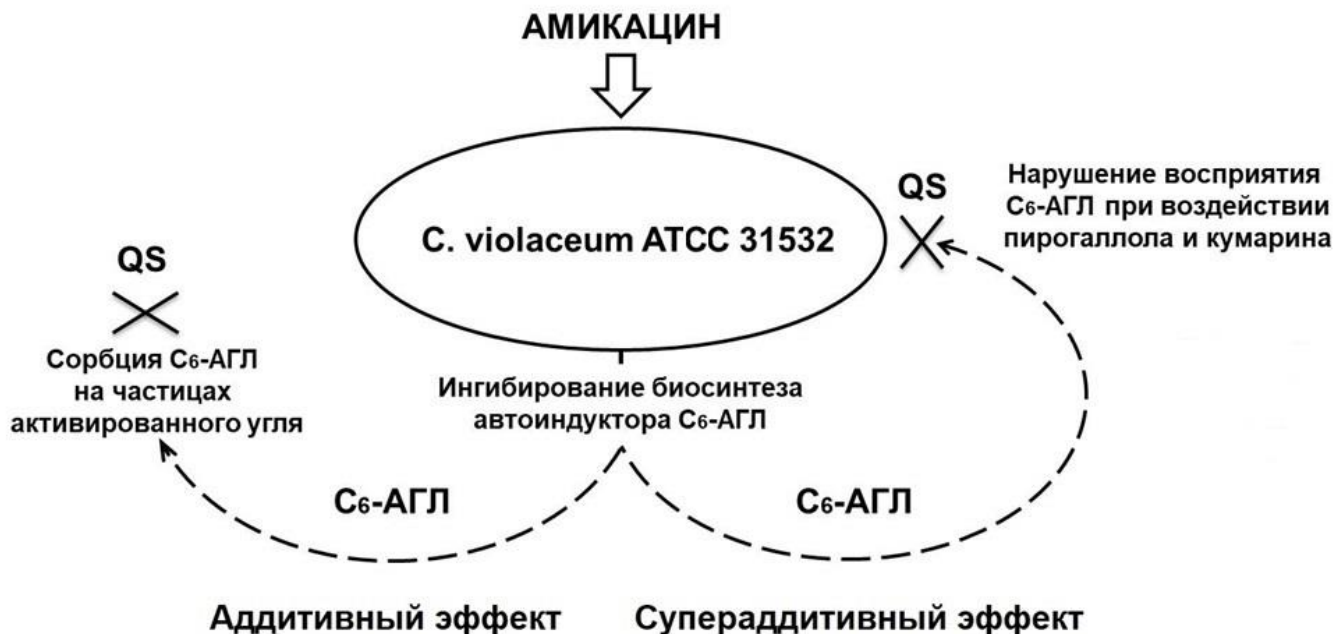


Рисунок 4 – Вероятные механизмы действия композиций аминогликозидного антибиотика амикацина с активированным углем (слева) и малыми молекулами растительного происхождения – пирогаллолом или кумарином (справа) в отношении системы «quorum sensing» у *C. violaceum* ATCC 31532

Первый предложенный принцип заключается в использовании аминогликозидного антибиотика (в частности, амикацина), субингибиторные концентрации которого ведут к полному или частичному подавлению биосинтеза автоиндуктора, и активированного угля, сорбирующего остаточные количества автоиндуктора из среды культивирования. При этом важным условием для достижения искомого результата является разобщенное во времени использование антибиотика и сорбента, а характер их совместного применения описывается как «аддитивный». В свою очередь второй предложенный принцип заключается в одновременном использовании амикацина (а в перспективе – и других антибиотиков из группы аминогликозидов с аналогичным механизмом действия) в комбинации с малыми молекулами растительного происхождения пирогаллолом или кумарином, нарушающих восприятие остаточных концентраций автоиндуктора, биосинтез которого подавлен под воздействием антибиотика. При этом характер действия подобных композиций описывается как «супераддитивный», что определяет перспективу их дальнейшего доклинического и клинического исследования.

ВЫВОДЫ

1. В субоптимальном для роста *C. violaceum* диапазоне температур (17-22°C) субингибиторные концентрации антибиотиков пенициллинового ряда – пиперациллина, азлоциллина, тикарциллина, карбенициллина и оксациллина вызывают QS-зависимую индукцию пигмента виолацеина в отсутствие собственного природного автоиндуктора C₆-АГЛ.

2. Обработка пенициллинов смесью бета-лактамаз I и II типа ведет к совместной утрате ими антибактериальной и QS-индуцирующей активностей, в то время как ингибирование собственных бета-лактамаз *C. violaceum* сульбактамом сопровождается проявлением сочетанной антибактериальной и QS-индуцирующей активностей у ампициллина и амоксициллина, а использование клавулановой кислоты оказывает комплексное воздействие на аналогичные эффекты тикарциллина.

3. Антибиотики из групп тетрациклинов (тетрациклин, доксициклин) и аминогликозидов (канамицин, гентамицин, амикацин) в субингибиторных концентрациях подавляют QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина у *C. violaceum* с двухкомпонентной системой автоиндукции LuxI/LuxR-типа.

4. Механизм QS-ингибирующей активности аминогликозидов связан с нарушением продукции автоиндуктора C₆-АГЛ, в условиях дефицита которого QS-система *C. violaceum* перестает функционировать.

5. Последовательное использование аминогликозидного антибиотика амикацина, нарушающего образование автоиндуктора C₆-АГЛ, и фармакопейного препарата активированного угля, сорбирующего остаточные количества C₆-АГЛ из среды культивирования, обеспечивает аддитивное ингибирование QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum*, в то время как одновременное использование амикацина и активированного угля снижает их совместную анти-QS активность за счет частичного связывания антибиотика на частицах сорбента.

6. Комбинированное использование амикацина и малых молекул растительного происхождения (пирогаллола и кумарина), нарушающих процессы восприятия C₆-АГЛ, ведет к формированию выраженного супераддитивного ингибирующего эффекта в отношении QS-системы *C. violaceum*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ для публикации результатов диссертационных исследований

1. Дерябин, Д.Г. Субингибиторные концентрации антибиотиков группы пенициллина индуцируют кворум-зависимый синтез виолацеина у *Chromobacterium violaceum* / Д.Г. Дерябин, **К.С. Инчагова** // Микробиология. – 2017. – Т.86 (4). – С.448-454 (Web of Science).

2. Дерябин, Д.Г. Ингибирующий эффект аминокликозидов и тетрациклинов на систему «кворум сенсинга» *Chromobacterium violaceum* / Д.Г. Дерябин, **К.С. Инчагова** // Микробиология. – 2018. – Т.87(1). – С.3-11 (Web of Science).

3. **Инчагова, К.С.** Подавление «кворум сенсинга» *Chromobacterium violaceum* при воздействии комбинаций амикацина с активированным углем или малыми молекулами растительного происхождения (пирогаллолом и кумарином) / К.С. Инчагова, Г.К. Дускаев, Д.Г.Дерябин // Микробиология. – 2019. – Т.88(1). – С.72-82 (Web of Science).

4. **Инчагова, К.С.** Сорбционные свойства активированного угля в отношении N-(бета-кетокaproил)-L-гомосерин лактона, оцененные с использованием индуцибельного бактериального LUX-биосенсора / К.С. Инчагова, Е.А. Строганова, Д.Г. Дерябин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – Т. 19 (11). – С.11-15.

5. **Инчагова, К.С.** Воздействие антибиотиков канамицина и доксициклина на образование аутоиндуктора N-бутирил-L-гомосерин лактона клиническими изолятами *Pseudomonas aeruginosa* / К.С. Инчагова, А.А. Галаджиева // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2016. – Т. 197 (9). – С.54-59.

Публикации в других журналах и сборниках

6. **Инчагова, К.С.** Воздействие антибиотиков на систему Quorum Sensing luxI/luxR типа у бактерий (на примере *Chromobacterium violaceum*) / К.С. Инчагова, А.А. Толмачева // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: материалы конференции, VIII Всероссийская конференция молодых учёных. – Саратов: Научная книга. – 2016. – С. 89.

7. **Инчагова, К.С.** Усиление кворум-ингибирующей активности антибиотиков / К.С. Инчагова // История и методология физиолого-биохимических и почвенных исследований. Сборник научных трудов. – Пермь. – 2017. – С. 68.

8. Дерябин, Д.Г. Антибиотики как потенциальные регуляторы системы «Quorum sensing» у бактерий / Д.Г. Дерябин, **К.С. Инчагова** // XXI Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии. – Москва. – 2019. – С. 25.

Патенты

9. Дерябин Д.Г., **Инчагова К.С.** Толмачёва А.А. Применение кумарина и его производных в качестве ингибиторов системы «кворум сенсинга» LuxI/LuxR-типа у бактерий // Патент РФ на изобретение № 2616237. – опубл. 13.04.2017. – Бюл. № 11.

Инчагова Ксения Сергеевна

**ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ
НА СИСТЕМУ «QUORUM SENSING» LUXI/LUXR-ТИПА
У БАКТЕРИЙ (НА ПРИМЕРЕ *Chromobacterium violaceum*)**

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать __.__.2020.
Формат 60×90/16.
Усл. печ. л. 1,69. Тираж 100 экз. Заказ №
Набор компьютерный

Отпечатано в