

## ВОЗДЕЙСТВИЕ АНТИБИТИКОВ КАНАМИЦИНА И ДОКСИЦИКЛИНА НА ОБРАЗОВАНИЕ АВТОИНДУКТОРА N-БУТИРИЛ-L-ГОМОСЕРИН ЛАКТОНА КЛИНИЧЕСКИМИ ИЗОЛЯТАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

*Pseudomonas aeruginosa* является одним из ведущих возбудителей внутрибольничных инфекций. Важной особенностью этого патогена является образование биоплёнок и многочисленных секретлируемых факторов вирулентности, находящихся под контролем системы химической плотно-зависимой коммуникации («кворум сенсинга»). Разработка подходов к подавлению данной системы является неотъемлемым аспектом совершенствования антибиотикотерапии синегнойной инфекции.

В работе использованы четыре клинических изолята *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные в одном из родовспомогательных учреждений Оренбургской области и проявляющие способность к образованию ключевого автоиндуктора системы «кворум сенсинга» – N-бутирил-L-гомосерин лактона (C<sub>4</sub>-АГЛ). Установлено, что субингибиторные концентрации антибиотиков оказывают регуляторное воздействие на данную способность, имеющее различную направленность при использовании аминогликозидов (на примере канамицина сульфата) и тетрациклинов (на примере доксициклина гидрохлорида). В присутствии канамицина зарегистрировано выраженное подавление продукции C<sub>4</sub>-АГЛ, что в качестве мишени воздействия антибиотика позволяет предполагать систему биосинтеза автоиндуктора. В свою очередь эффектом доксициклина являлось накопление внеклеточного C<sub>4</sub>-АГЛ выше контрольных значений, что указывает на нарушение системы восприятия автоиндуктора бактериальными клетками-мишенями.

Выявленная способность аминогликозидов и тетрациклинов воздействовать на систему «кворум сенсинга» позволяет говорить о данных антибиотиках как регуляторах коллективного поведения патогенных бактерий, что открывает новые возможности для их использования при лечении инфекций, вызванных *P. aeruginosa*.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, кворум сенсинг, ацилированные лактоны гомосерина, аминогликозиды, тетрациклины, субингибиторные концентрации.

Внутрибольничные (госпитальные) инфекции – актуальная проблема современного здравоохранения [1], борьба с которой требует использования сложной антибиотикотерапии [2], направленной на образующие биопленки бактериальные патогены [3], [4]. При этом частая неэффективность подобной терапии определяется тем, что антибиотик уничтожает преимущественно планктонные клетки микроорганизмов, слабо проникая вглубь матрикса биопленки, в результате чего в ней формируются только относительно низкие (субингибиторные) концентрации препарата [5].

Среди возбудителей госпитальных инфекций ведущее значение имеют грамотрицательные микроорганизмы, доминирующим из которых является синегнойная палочка – *Pseudomonas aeruginosa* [6]. Региональная актуальность данного возбудителя подтверждается его регулярным выделением при случаях внутрибольничной инфекции в медицинских

учреждениях Оренбургской области. Патогенный потенциал *P. aeruginosa*, помимо способности к образованию биопленок [7], включает экзотоксины и разнообразные секретлируемые факторы вирулентности, биосинтез которых находится под контролем трехкомпонентной системы плотно-зависимой коммуникации, обозначаемой термином «кворум сенсинг» (англ. – Quorum Sensing; QS) [8].

Принципиальная организация систем «кворум сенсинга» заключается в образовании бактериальными клетками низкомолекулярных диффундирующих сигнальных молекул – автоиндукторов, накапливающихся в среде культивирования и при достижении высокой плотности популяции воспринимаемых специальными рецепторными белками, запускающими транскрипцию целевых генов [9], [10]. Так *P. aeruginosa* имеет сложную трехкомпонентную систему «кворум сенсинга» с тремя различными АИ: N-(3-

оксододеканоил)-L-гомосеринлактоном, N-бутирил-L-гомосеринлактоном (C<sub>4</sub>-АГЛ) и 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолоном [11]. При этом наибольшее значение в патогенезе синегнойной инфекции имеет опосредованная C<sub>4</sub>-АГЛ система *rhlI-rhlR* [12], под позитивным контролем которой находятся образованием биопленочного рамнолипида, пиоцианина и других факторов вирулентности.

Учитывая ключевую роль «кворум сенсинга» *P. aeruginosa* и ряда других микроорганизмов в патогенезе вызываемых ими инфекционных состояний, данные системы рассматриваются в качестве новой перспективной мишени, воздействие на которую позволит на новых принципах бороться с заболеваниями бактериальной этиологии [15], [16]. Отдельным направлением подобного поиска является анализ кворум-регулирующего эффекта антибиотиков, в последнее время рассматриваемых не только как факторы межмикробного антагонизма, но и как сигнальные молекулы [17], изменяющие профиль генной экспрессии воспринимающих их бактериальных клеток.

Однако, имеющиеся публикации об участии антибиотиков в регуляции систем «кворум сенсинга» относительно немногочисленны, а представленные в них данные часто противоречивы. Так, с одной стороны, имеются данные о способности цефтазидима и тобрамицина [18], а также цефтазидима, азитромицина и ципрофлоксацина [19] ингибировать эту систему у лабораторных штаммов *P. aeruginosa*. С другой стороны, в работе Shen et al. [20] субингибиторные концентрации азитромицина, ванкоми-

цина, тетрациклина и ампициллина, напротив, активировали экспрессию кворум-зависимых секретируемых факторов вирулентности данного микроорганизма.

В этой связи целью настоящего исследования явилось экспериментальное изучение регуляторных эффектов антибиотиков из групп аминогликозидов и тетрациклинов на систему «кворум сенсинга» у клинических изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в одном из медицинских учреждений Оренбургской области, с акцентом на образование ими бутирил-L-гомосеринлактона, являющегося ключевым фактором индукции биопленкообразования и факторов вирулентности.

### Материалы и методы

В работе использованы четыре штамма *P. aeruginosa*, выделенных из трупного материала (№1), кала (№2), мочи (№3) и содержимого желудка (№4) пациентов одного из родовспомогательных учреждений Оренбургской области в ноябре 2015 г. Данные об их чувствительности к антибиотикам приведены в таблице 1.

Оценка продукции C<sub>4</sub>-АГЛ клиническими изолятами *P. aeruginosa* проводилась с использованием сенсорного штамма *Escherichia coli* JLD271, *pAL101; rhlR+ rhlI\_luxCDABE; TetR p15A (E. coli pAL101)* [21]. Его особенностью являлось наличие плазмиды *pAL101*, в составе которой кассета *luxCDABE*-генов клонирована под контролем гена *rhlR*, кодируемый которым рецепторный белок при взаимодействии с C<sub>4</sub>-АГЛ активирует транскрипцию генов биолюминесценции. Кроме того, для повышения

Таблица 1 – Чувствительность клинических изолятов *P. aeruginosa* к антибиотикам из групп аминогликозидов и тетрациклинов, определенная методом диффузии в агар и охарактеризованная диаметрами зон подавления роста тест-штаммов (мм)

Антибиотик \ Штамм	№1	№2	№3	№4
Аминогликозиды				
Канамицин	0 (R)	0(R)	0(R)	0(R)
Гентамицин	0 (R)	10 (R)	0(R)	0(R)
Амикацин	22 (S)	20 (S)	21 (S)	20(S)
Тетрациклины				
Тетрациклин	0 (R)	0(R)	21 (S)	15 (I)
Доксициклин	0(R)	14 (I)	18(S)	19(S)

Обозначения в скобках: R – штамм устойчив к антибиотику, S –штамм чувствителен к антибиотику, I – штамм проявляет промежуточную чувствительность к антибиотику.

чувствительности данной репортерной системы, она клонирована в хозяйском штамме *E. coli* JLD271 с мутацией в гене *sdiA*, продукт которого также распознает АГЛ и мог бы конкурировать с *rhlR* за его связывание. Перед проведением исследований *E. coli* pAL101 выращивали в течение 18–24 часов при 37 °С в LB-агаре («Sigma», США). Непосредственно перед постановкой эксперимента культуру разводили LB-бульоном и дополнительно подращивали в течение 2–3 часов до достижения оптической плотности 0,5 ед. при 450 нм.

При исследовании продукции  $C_4$ -АГЛ клиническими изолятами *P. aeruginosa* их выращивали в LB-бульоне при 37 °С в течение 6, 12, 24 часов, центрифугировали при 13000 оборотах в течение 5 минут, отбирали супернатанты, которые тестировали на люминесцирующем штамме *E. coli* pAL101. Для этого в ячейки 96-луночного планшета из непрозрачного пластика (Thermo, США) вносили по 100 мкл культуры *E. coli* pAL101 и супернатанта *P. aeruginosa*. Отрицательными контролями являлись пробы сенсорного штамма с добавлением аналогичного объема LB-бульона, положительными – его смеси с химически чистым препаратом  $C_4$ -АГЛ (Sigma, США) в концентрации  $10^{-6}$  М. Динамическую регистрацию развития биолюминесценции в опытных и контрольных пробах

производили в термостатируемом блоке биолюминесценции LM 01T («Immunotech», Чехия) в течение 60 минут. Степень индукции биолюминесценции определяли как отношение интенсивности свечения исследуемого образца на *n*-ой и 0-ой минутах исследования, соотнося полученные величины с аналогичными значениями в контроле. Полученные данные выражали графически в виде зависимости выраженности биолюминесценции (отн. ед) от времени инкубации (с) (рис. 1).

В качестве потенциальных регуляторов «кворум сенсинга» данных микроорганизмов использованы антибиотики из групп аминогликозидов и тетрациклинов, основной мишенью действия которых является малая (30S) субъединица бактериальной рибосомы. В качестве модельного аминогликозидного антибиотика использовали канамицина сульфат (CAS 25389-94-0), тетрациклины были представлены доксициклина гидрохлоридом (CAS 10592-13-9).

При исследовании влияния данных антибиотиков на *P. aeruginosa* готовили три серии двукратных разведений канамицина и доксициклина в 2 мл LB-бульона в концентрации от 2500 мг/мл до 4,89 мг/мл, в одну из которых вносили по 20 мкл суточной культуры *P. aeruginosa*. Вторая и третья (контрольные) серии оставались стерильными, при этом в одну из

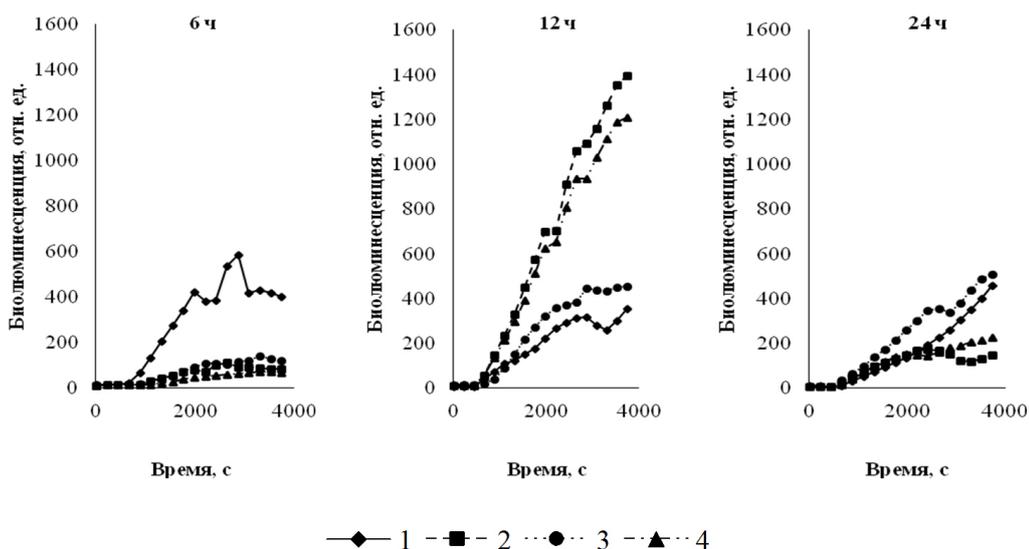


Рисунок 1 – Динамика биолюминесценции *E. coli* JLD271, pAL101; *rhlR*+ *rhlI* luxCDABE; TetR p15A в присутствии супернатантов *P. aeruginosa* (1-4), полученных после 6, 12 и 24 часов культивирования в LB-бульоне

них дополнительно вносили химически чистый препарат  $C_4$ -АГЛ в концентрации  $10^{-6}$  М, а в другую – использованный для его разведения растворитель. После культивирования при  $37^\circ\text{C}$  оценивали рост бактериальной культуры при 450 нм, после чего пробы центрифугировали при 13000 оборотах в течение 5 минут, а отобранные супернатанты и эквивалентные им по содержанию антибиотиков контрольные образцы тестировали в отношении *E. coli* pAL101 как описано выше. На основании полученных данных строили графики, характеризующие зависимость интенсивности роста *P. aeruginosa* (по значениям ОП<sub>450</sub>) и образования  $C_4$ -АГЛ (по интенсивности биолюминесценции) от воздействующей концентрации антибиотика (рис. 2).

### Результаты и обсуждение

Оценка способности *P. aeruginosa* к продукции  $C_4$ -АГЛ позволила зафиксировать ее у всех четырех исследованных клинических изолятов, одновременно продемонстрировав существование некоторых штаммовых различий (рис. 1). Так на ранних сроках инкубации (6 часов) детек-

тируемая продукция зафиксирована у штамма №1, однако в дальнейшем на 12 и 24 часах инкубации интенсивность индукции свечения *E. coli* pAL101 в присутствии супернатантов данного штамма не претерпевала существенных изменений. Для штаммов №2 и №4 был характерен максимум продукции  $C_4$ -АГЛ на 12 часе культивирования, после чего содержание данного аутоиндуктора существенно снижалось, вероятно, вследствие его восприятия и утилизации клетками *P. aeruginosa*, достигшими плотности популяции, достаточной для развития эффекта «кворум сенсинга». Наконец, супернатант штамма №3 обуславливал примерно одинаковый уровень индукции биолюминесценции *E. coli* pAL101 только на 12 и 24 часах инкубации, по своей интенсивности уступающей таковым у супернатантов штаммов №2 и №4.

Таким образом, полученные результаты, принципиально подтвердив наличие у клинических изолятов *P. aeruginosa* наличие систем «кворум сенсинга», опосредованных аутоиндуктором  $C_4$ -АГЛ, показали неидентичность количественных характеристик их функциони-

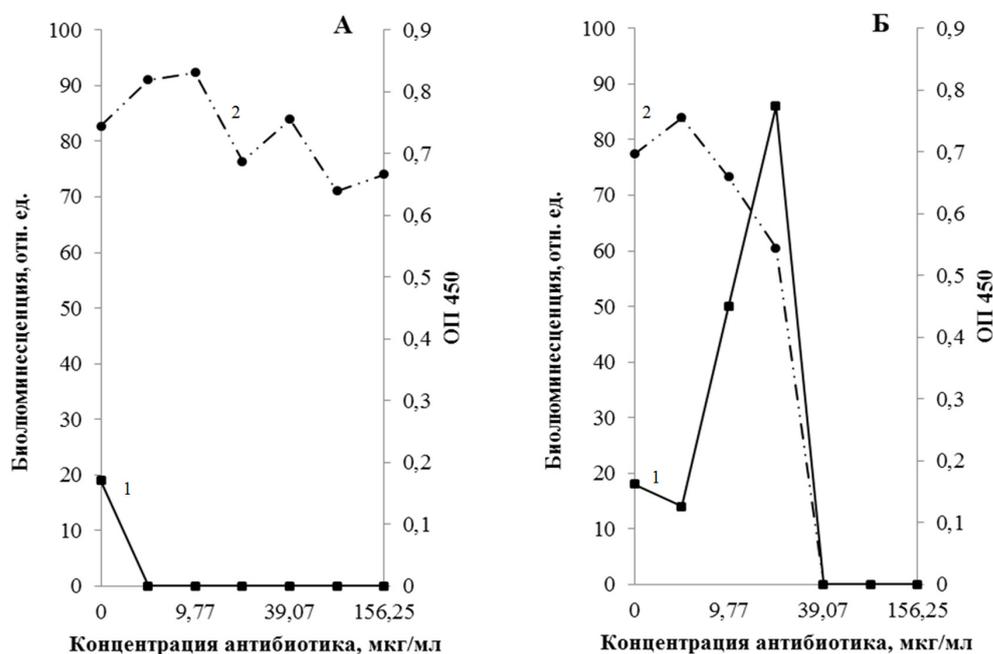


Рисунок 2 – Пример воздействия канамицина (А) и доксициклина (Б) на рост и образование  $C_4$ -АГЛ клиническим изолятом *P. aeruginosa* №2: 1 – интенсивность индукции биолюминесценции при использовании супернатантов *P. aeruginosa*, выросшей на среде с антибиотиками; 2 – оптическая плотность культуры *P. aeruginosa* при росте на среде с антибиотиком

рования, что в контексте основной задачи настоящего исследования одновременно послужило обоснованием для выбора основных модельных объектов для оценки кворум-регулирующей активности антибиотиков.

Другим результатом предварительной серии экспериментов явилась констатация отсутствия искажающего действия аминогликозидов и тетрациклинов на результат восприятия  $C_4$ -АГЛ сенсорным штаммом *E. coli* pAL101. Во-первых, исследованные антибиотики в использованном диапазоне концентраций самостоятельно не вызывали индукции биолюминесценции, а во-вторых, смеси антибиотиков с химически чистым  $C_4$ -АГЛ существенно не изменяли характера реакции сенсорного штамма на данный препарат.

Последующее определение зависимости биолюминесцентного отклика *E. coli* pAL101 супернатантов *P. aeruginosa*, выращенных в контакте с канамицином и доксициклином, позволило констатировать различный характер воздействия данных антибиотиков на достигаемое содержание внеклеточного  $C_4$ -АГЛ. Так канамицин, не проявивший выраженного ингибирующего эффекта на рост *P. aeruginosa*, привел к полному подавлению образования автоиндуктора, с использованием *E. coli* pAL101 не обнаруженного ни в одном из супернатантов во всем исследованном диапазоне концентраций этого антибиотика (рис. 2А). Напротив, доксициклин, в отношении тестируемых штаммов *P. aeruginosa* характеризуемый значением минимальной ингибирующей концентрации (МИК) на уровне 39,07 мг/мл (рис. 2Б), напротив, обуславливал повышенное присутствие  $C_4$ -АГЛ во всех анализируемых супернатантах, что свидетельствовало об избыточном накоплении автоиндуктора в среде культивирования.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что представители двух групп антибиотиков (аминогликозидов и тетрациклинов), имеющих одну и ту же мишень (малую 30S субъединицу бактериальной рибосомы), в экспериментальных условиях оказывают разно-

направленное воздействие на систему «кворум сенсинга» у клинических изолятов *P. aeruginosa*, а именно – на уровень образования ими ключевого автоиндуктора плотностно-зависимой коммуникации –  $C_4$ -АГЛ. При этом в присутствии канамицина в широком диапазоне концентраций зарегистрировано выраженное подавление продукции  $C_4$ -АГЛ, что в качестве мишени воздействия данного антибиотика позволяет предполагать систему биосинтеза автоиндуктора. В свою очередь эффектом доксициклина оказалась накопление внеклеточного  $C_4$ -АГЛ выше контрольных значений, что может указывать на то, что биологическая активность данного антибиотика реализуется через нарушение системы восприятия автоиндуктора бактериальными клетками-мишенями.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии у антибиотиков ранее неизвестного механизма биологической активности, заключающегося в модуляции (ослаблении или усилении) биосинтеза автоиндукторов системы «кворум сенсинга». В частности, у взятых в настоящее исследование антибиотиков этот эффект может быть связан с преимущественным эффектом их субингибиторных концентраций на трансляцию определенных групп белков: синтез автоиндуктора (при использовании аминогликозидов) или воспринимающих их рецепторов (при использовании тетрациклинов). В свою очередь практически ориентированный аспект полученного результата определяется обоснованием нового подхода к отбору антимикробных препаратов для терапии бактериальных инфекций, возбудители которых используют системы плотностно-зависимой коммуникации при образовании биопленок и экспрессии факторов вирулентности. В подобном контексте обнаружение у аминогликозидов (на примере канамицина) способности к выраженной репрессии ключевого автоиндуктора *P. aeruginosa* –  $C_4$ -АГЛ определяет перспективу их использования в качестве блокаторов системы «кворум сенсинга» патогенных бактерий.

08.09.2016

**Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ №16-44-56062 р\_а.**

## Список литературы:

1. Покровский, В.И. Внутрибольничные инфекции: проблемы и пути решения / В.И. Покровский, Н.А. Семина // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2000. – №5. – С. 12–14.
2. Внутрибольничные инфекции: новые горизонты профилактики / В.И. Покровский и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2011. – №1. – С. 4–7.
3. Николаев, Ю.А. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // Микробиология. – 2007. – Т. 76(2). – С. 149–163.
4. Kiivet, R.A. Changes in the use of antibacterial drugs in the countries of Central and Eastern Europe / R.A. Kiivet et al. // Eur J Clin Pharmacol. – 1995. – V. 48. – P. 299–304.
5. Гостев, В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С. В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – №3. – С. 4–14.
6. Госпитальные инфекции, вызванные *Pseudomonas aeruginosa*. Распространение и клиническое значение антибиотикорезистентности / С.В. Сидоренко и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – №3. – С. 25–34.
7. Spoering, A.L. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials / A.L. Spoering, K. Lewis // Journal of Bacteriology – 2001. – V. 183. – №23. – P 6746–51. doi:10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001.
8. Smith, R.S. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target / R.S. Smith, B.H. Iglewski // The Journal of Clinical Investigation. – 2003. – V. 112. – P. 1460–1465. doi:10.1172/JCI200320364.
9. Waters, C.M. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria / C.M. Waters, B.L. Bassler // Ann Rev Cell Dev Biol. – 2005. – V. 21. – P. 319–346.
10. Reading, N.C. Quorum sensing: the many languages of bacteria / N.C. Reading, V. Sperandio // FEMS Microbiol Lett. – 2006. – V. 254. – P. 1–11.
11. Pearson, J.P. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes / J.P. Pearson et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – V. 91. – P. 197–201.
12. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa* / J.P. Pearson et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – V. 92. – P. 1490–1494.
13. Chan, K-G Inhibiting N-acyl-homoserine lactone synthesis and quenching *Pseudomonas* quinolone quorum sensing to attenuate virulence / K-G Chan, Y-C Liu, C-Y Chang. // Front Microbiol. – 2015. – V. 6. – 1173 p. – doi: 10.3389/fmicb.2015.0117.
14. Favre-Bonté S., Köhler T., Van Delden C.J. // Antimicrob Chemother. – 2003. – V. 52(4). – P. 598–604.
15. Bhardwaj, A.K. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance / A.K. Bhardwaj, K. Vinothkumar, N. Rajpara // Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery – 2013. – V. 8. – P. 68–83.
16. Quorum sensing in gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 Quorum sensing pathways / W.R.J.D. Galloway et al. // Chem. Rev. – 2011. – V. 111. – P. 28–67.
17. Булгакова, В.Г. Действие антибиотиков как сигнальных молекул / В.Г. Булгакова и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 2014. – №1. – С. 36–43.
18. Sub-inhibitory concentrations of ceftazidime and tobramycin reduce the quorum sensing signals of *Pseudomonas aeruginosa* / L.A. Garske et al. // Pathology. – 2004. – V. 36. – P. 571–575.
19. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* / M.E. Skindersoe et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2008. – V. 52. – P. 3648–3663.
20. Modulation of secreted virulence factor genes by subinhibitory concentrations of antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* / L. Shen et al. // J. Microbiol. – 2008. – V. 46. – P. 441–447.
21. Lindsay, A. Effect of *sdiA* on biosensors of N-acylhomoserine lactones / A. Lindsay, B.M. Ahmer // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187(14). – P. 5054–5058.

## Сведения об авторах:

**Инчагова Ксения Сергеевна**, аспирант кафедры биохимии и микробиологии  
Оренбургского государственного университета, научный сотрудник  
Всероссийского научно-исследовательского института мясного скотоводства  
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, ауд. 2308, e-mail: ksenia.inchagova@mail.ru

**Галаджиева Анна Александровна**, научный сотрудник  
Всероссийского научно-исследовательского института мясного скотоводства,  
научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза  
Уральского отделения Российской академии наук, кандидат биологических наук  
460022, г. Оренбург, ул. Подурова, д 8/1, e-mail: annatolmacheva56@gmail.com