

УДК 577.181.5

Антибактериальное действие тиосульфидов на мультирезистентные штаммы бактерий, выделенные от больных муковисцидозом

В. В. Куликова¹, М. Ю. Чернуха², Е. А. Морозова¹, С. В. Ревтович¹, А. Н. Родионов¹,
В. С. Коваль¹, Л. Р. Аветисян², Д. Г. Кулястова², И. А. Шагинян², Т. В. Демидкина^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

*E-mail: tvd@eimb.ru, tvdemidkina@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.10.2017

Принята к печати 26.06.2018

РЕФЕРАТ Установлена мультирезистентность штаммов *Achromobacter ruhlandii* 155В, *Burkholderia cepacia* 122 и *Pseudomonas aeruginosa* 48В, выделенных от больных муковисцидозом. Показан антибактериальный эффект аллицина, диметилтиосульфидата и дипропилтиосульфидата на мультирезистентные штаммы. В зависимости от микроорганизма и концентрации тиосульфидаты могут оказывать как бактериостатическое, так и бактерицидное действие. Исследованные тиосульфидаты могут рассматриваться в качестве кандидатов для разработки альтернативных лекарственных препаратов, эффективных при инфекциях, вызванных возбудителями, мультирезистентными к антибиотикам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аллицин, антибактериальная активность, метионин-γ-лиаза, муковисцидоз, тиосульфидаты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МГЛ – метионин-γ-лиаза; МПК – минимальная подавляющая концентрация; МБК – минимальная бактерицидная концентрация.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых подходов к созданию эффективных антибактериальных препаратов актуальна из-за широкого распространения антибиотикорезистентных штаммов бактерий. Мультирезистентные микроорганизмы вызывают внутрибольничные инфекции, которые могут быть причиной осложнений у ослабленных больных. Серьезную проблему представляет хроническая легочная инфекция у больных муковисцидозом, вызванная ассоциацией таких возбудителей, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* complex и др. [1], при которой под воздействием длительной антибиотикотерапии происходит формирование мультирезистентных штаммов микроорганизмов, что обуславливает неэффективность терапии антибиотиками.

Тиосульфидаты, обнаруженные в растениях рода *Allium*, обладают антимикробным действием [2].

Антибактериальный эффект аллицина, основного тиосульфидата чеснока, обусловлен сочетанием снижения уровня клеточного глутатиона и инактивации ключевых метаболических ферментов вследствие модификации их тиоловых групп [3, 4]. Поскольку аллицин, окисляющий тиоловые группы ферментов и белков, имеет много мишеней в клетке, аллицин и другие тиосульфидаты, скорее всего, не должны вызывать резистентность [5].

В растениях рода *Allium* аллииназа [КФ 4.4.1.4] катализирует разложение сульфоксидов S-замещенных аналогов L-цистеина с образованием тиосульфидатов. Нами показано, что тиосульфидаты могут быть получены при помощи метионин-γ-лиазы (МГЛ, [КФ 4.4.1.11]) (схема). Тиосульфидаты, образующиеся при расщеплении сульфоксидов S-аллил-L-цистеина, S-метил-L-цистеина и S-этил-L-цистеина, катализируемом как МГЛ дикого типа, так и ее более эффективной мутантной

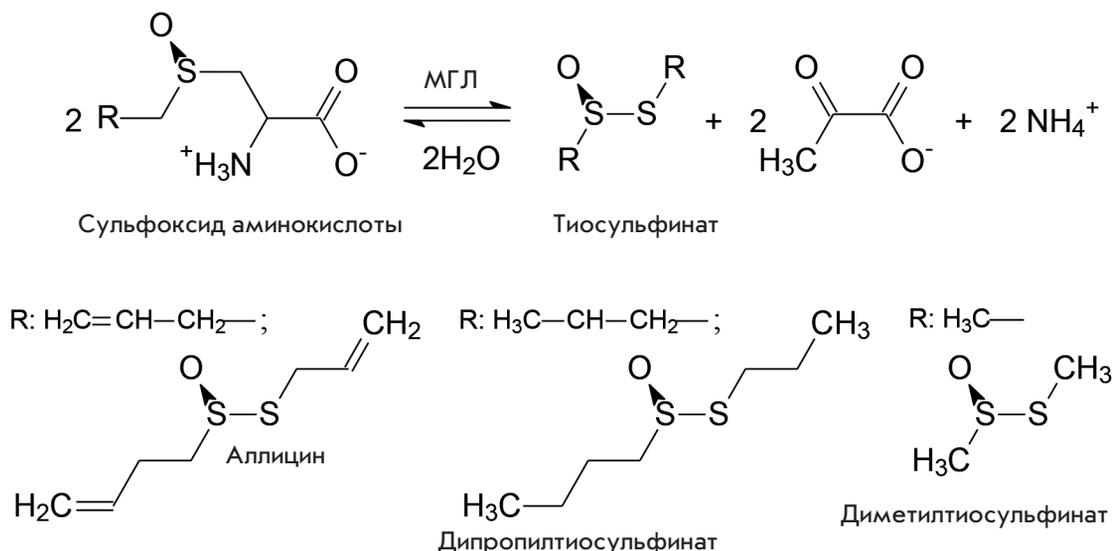


Схема. Реакция β-элиминирования сульфоксидов S-замещенных аналогов L-цистеина

формой С115Н, ингибируют рост грамположительных и грамотрицательных бактерий [6], в том числе *P. aeruginosa*, выделенной из кишечника мышей [7].

Целью данной работы было исследование антибактериального действия тиосульфидов, полученных в реакции β-элиминирования трех сульфоксидов S-замещенных аналогов L-цистеина (схема), катализируемой С115Н МГЛ, на мультирезистентные штаммы грамотрицательных бактерий *Achromobacter ruhlandii* 155В, *B. cenosepacia* 122 и *P. aeruginosa* 48В, выделенных от больных муковисцидозом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение фермента, определение его активности, синтез сульфоксидов S-замещенных аналогов L-цистеина и получение тиосульфидов проводили как описано ранее [6]. Концентрацию тиосульфидов определяли согласно [8].

Антибактериальную активность тиосульфидов определяли методом двукратных серийных разведений и методом диффузии в агаре.

При определении антибактериальной активности тиосульфидов методом двукратных серийных разведений [9] использовали бульон Мюллера–Хинтона и разведение культур штаммов 10⁵ КОЕ/мл с добавлением препаратов в концентрациях от 1 до 0.0039 мг/мл с последующим высевом на плотную питательную среду (среда № 1 для *P. aeruginosa* 48В и кровяной агар для *A. ruhlandii* 155В и *B. cenosepacia* 122).

Антибактериальную активность препаратов на твердой среде определяли при концентрации от 2 до 0.05 мг/мл путем посева из разведений культур

штаммов от 10⁴ до 10⁷ КОЕ/мл на агар Мюллера–Хинтона диско-диффузионным методом и методом непосредственного нанесения исследуемых образцов в объеме 10 мкл.

Резистентность штаммов к действию стандартных антибиотиков, назначаемых при муковисцидозе, определяли методом серийных разведений согласно клиническим рекомендациям о пограничных значениях МПК для каждого антибиотика [10].

Антибактериальную эффективность тиосульфидов и антибиотиков сравнивали, используя диско-диффузионный метод при высеве из разведений культур штаммов 10⁶ КОЕ/мл на агар Мюллера–Хинтона.

Время инкубации культур на твердой питательной среде во всех экспериментах составляло 24–48 ч.

В работе использовались штаммы *A. ruhlandii* 155В, *B. cenosepacia* 122 и *P. aeruginosa* 48В из коллекции культур лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций, НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, выделенные от больных муковисцидозом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определяли антибактериальную активность аллицина, диметил- и дипропилтиосульфидов против штаммов *A. ruhlandii* 155В, *B. cenosepacia* 122 и *P. aeruginosa* 48В, выделенных от больных муковисцидозом (табл. 1). Выявлены различия в характере и степени выраженности антимикробного действия тиосульфидов.

Наиболее активными в отношении *B. cenosepacia* 122 и *P. aeruginosa* 48В оказались аллицин и диме-

тилтиосульфидат, дипропилтиосульфидат был менее активным.

Величины МПК и МБК тиосульфидатов при действии на *B. ceposercacia* оказались равными или близкими, что свидетельствует о бактерицидном действии этих двух соединений. Значение МПК аллицина лежит в диапазоне, полученном для коммерческого аллицина против нескольких штаммов *B. seracia complex* (0.008–0.062 мг/мл) [11].

На штамм *P. aeruginosa* 48В тиосульфидаты оказывают бактериостатическое действие, поскольку в исследуемом диапазоне концентраций тиосульфидатов значение МБК (1 мг/мл) определяется только для аллицина. Значения МПК и МБК аллицина для штамма *P. aeruginosa* 48В соответствуют величинам МПК (0.064–0.512 мг/мл) и МБК (0.128–1.024 мг/мл) аллицина против трех клинических штаммов *P. aeruginosa* [12].

Антибактериальное действие тиосульфидатов на штамм *A. ruhlandii* 155В было наименее значимым. Значения МПК, полученные в опыте по определению антибактериальной активности на твердой питательной среде диско-диффузионным методом (табл. 1), составили 2 мг/мл для диметил- и дипропилтиосульфидатов, что превышало максимальную концентрацию, используемую в методе серийных разведений. Наиболее эффективным против *A. ruhlandii* 155В оказался аллицин, обладающий бактерицидным действием в концентрации 1 мг/мл.

Изменение антибактериальной эффективности тиосульфидатов определяли в зависимости от концентрации бактериальных клеток. Эксперимент был проведен диско-диффузионным методом (табл. 2) и методом нанесения образцов на твердую питатель-

Таблица 1. Значения МПК и МБК тиосульфидатов

Бактериальный штамм	Тиосульфидат	МПК	МБК
		мг/мл	
<i>A. ruhlandii</i> 155В	Аллицин	0.50	1
	Диметилтиосульфидат	2.00*	-
	Дипропилтиосульфидат	2.00*	-
<i>B. ceposercacia</i> 122	Аллицин	0.03	≥0.03**
	Диметилтиосульфидат	0.03	≥0.03**
	Дипропилтиосульфидат	0.25	0.5
<i>P. aeruginosa</i> 48В	Аллицин	0.06	1
	Диметилтиосульфидат	0.06	-
	Дипропилтиосульфидат	0.50	-

Примечание. «-» – отсутствие бактерицидного действия.

*Данные получены из эксперимента по определению антибактериальной активности на твердой питательной среде диско-диффузионным методом.

**Но не более 0.06.

ную среду. Результаты, полученные обоими методами, совпали.

Тиосульфидаты в концентрации 2 мг/мл эффективно подавляют рост *A. ruhlandii* 155В и *B. ceposercacia* 122 при концентрации клеток до 10⁷ КОЕ/мл включительно. Антибактериальное действие тиосульфидатов на *P. aeruginosa* 48В выражено слабо. Аллицин в максимальной концентрации незначительно подавляет рост *P. aeruginosa* 48В даже при минимальной концентрации клеток. Интересно, что среди тиосульфидатов только диметилтиосульфидат в концентрации 0.4 мг/мл (табл. 2) подавляет рост *P. aeruginosa*. Результаты, полученные для ал-

Таблица 2. Антибактериальная эффективность тиосульфидатов при различных концентрациях клеток

Бактериальный штамм	Тиосульфидат	Диаметр зон ингибирования (мм) при концентрации клеток, КОЕ/мл							
		10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
		и концентрации тиосульфидата*, мг/мл							
		2				0.4			
<i>A. ruhlandii</i> 155В	Аллицин	30	30	30	30	0	0	0	0
	Диметилтиосульфидат	30	30	30	30	0	0	0	0
	Дипропилтиосульфидат	30	30	30	30	0	0	0	0
<i>B. ceposercacia</i> 122	Аллицин	25	25	25	25	0	0	0	0
	Диметилтиосульфидат	25	25	25	25	0	0	0	0
	Дипропилтиосульфидат	20	20	20	20	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> 48В	Аллицин	10	0	0	0	0	0	0	0
	Диметилтиосульфидат	15	15	15	15	10	-	-	-
	Дипропилтиосульфидат	15	15	0	0	0	0	0	0

*Концентрации тиосульфидатов 0.2, 0.1 и 0.05 мг/мл в таблице не представлены, так как при этих концентрациях антибактериальный эффект отсутствовал.

Таблица 3. Резистентность (+) бактериальных штаммов к антибиотикам

Штамм	Азтреонам	Амикацин	Гентамицин	Доксициклин	Имипенем	Колистин	Левифлоксацин	Норфлоксацин	Офлоксацин	Тобрамицин	Хлорамфеникол	Цефепим	Цефотаксим	Цефтазидим	Цефтриаксон	Цефуроксим	Ципрофлоксацин
<i>A. ruhlandii</i> 155В	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. cenocepacia</i> 122		+	+							+		+		+			+
<i>P. aeruginosa</i> 48В			+				+		+	+	+		+	+	+		+

Таблица 4. Антибактериальная эффективность тиосульфидов и антибиотиков при концентрации клеток 10⁶ КОЕ/мл

Концентрация, мкг/диск	Тиосульфид	Диаметр зоны ингибирования, мм		
		<i>A. ruhlandii</i> 155В	<i>B. cenocepacia</i> 122	<i>P. aeruginosa</i> 48В
20	Аллицин	25	20	0
20	Диметилтиосульфидат	16	30	30
20	Дипропилтиосульфидат	30	5	0
5	Имипенем	0	30	30
10	Тобрамицин	0	0	0
10	Ципрофлоксацин	0	0	0

лицина и диметилтиосульфидата, хорошо соотносятся с данными для *P. aeruginosa* из кишечного тракта мышей [7].

Отсутствие зон задержки роста в опыте на твердой среде при низких концентрациях аллицина и диметилтиосульфидата, вероятно, обусловлено медленной диффузией веществ в агар Мюллера–Хинтона. Таким образом, оптимальным методом определения антибактериальной активности исследуемых тиосульфидов является метод серийных разведений.

Резистентность штаммов *A. ruhlandii* 155В, *B. cenocepacia* 122 и *P. aeruginosa* 48В оценивали с использованием 17 антибиотиков, наиболее часто назначаемых при муковисцидозе (табл. 3). Штамм *A. ruhlandii* 155В оказался резистентным к 16 антибиотикам, штамм *B. cenocepacia* 122 – к шести, а *P. aeruginosa* 48В – к девяти антибиотикам. Полученные данные подтвердили формирование резистентности у этих штаммов после длительной антибиотикотерапии. Примечательно, что ни один из протестированных антибиотиков не оказывал антибактериального действия на все три бактериальных штамма.

Мы сравнили эффективность антибактериального действия тиосульфидов и антибиотиков широкого спектра действия, принадлежащих к трем различным группам, наиболее часто назначаемым при муковисцидозе: имипенема из группы карбапенемов,

тобрамицина из группы аминогликозидов и ципрофлоксацина из группы фторхинолонов (табл. 4). Как и в случае двукратных серийных разведений, при определении антибактериальной активности диско-диффузионным методом на плотной питательной среде три штамма оказались резистентными к тобрамицину и ципрофлоксацину в стандартных концентрациях 10 мкг/диск. Диаметры зон ингибирования имипенема при действии на *B. cenocepacia* 122 и *P. aeruginosa* 48В сравнимы со значениями для диметилтиосульфидата и незначительно больше зоны ингибирования *B. cenocepacia* 122 аллицином. Аллицин и диметилтиосульфидат подавляют рост *A. ruhlandii* 155В, в то время как к действию имипенема данный штамм резистентен.

Полученные данные открывают возможность разработки препаратов для антибактериальной терапии хронической легочной инфекции у больных муковисцидозом. ●

Авторы благодарят НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ за возможность проведения экспериментов по определению антимикробной активности препаратов на клинических изолятах.

Работа поддержана грантом РФ
№ 15-14-00009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шагинян И.А., Капранов Н.И., Чернуха М.Ю., Алексеева Г.В., Семькин С.Ю., Аветисян Л.Р., Каширская Н.Ю., Пивкина Н.В., Данилина Г.А., Батов А.Б., Бусуек Г.П. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009. № 5. С. 15–20.
2. Cavallito C.J., Bailey J.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1944. V. 66. P. 1950–1951.
3. Rabinkov A., Miron T., Konstantinovski L., Wilchek M., Mirelman D., Weiner L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1379. P. 233–244.
4. Muller A., Eller J., Albrecht F., Prochnow P., Kuhlmann K., Bandow J.E., Slusarenko A.J., Leichert L.I.O. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 11477–11490.
5. Ankri S., Mirelman D. // *Microb. Infect.* 1999. V. 2. P. 125–129.
6. Morozova E.A., Kulikova V.V., Rodionov A.N., Revtovich S.V., Anufrieva N.V., Demidkina T.V. // *Biochimie.* 2016. V. 128–129. P. 92–98.
7. Kulikova V.V., Anufrieva N.V., Revtovich S.V., Chernov A.S., Telegin G.V., Morozova E.A., Demidkina T.V. // *IUBMB Life.* 2016. V. 68. P. 830–835.
8. Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Weiner L., Wilchek M. // *Anal. Biochem.* 1998. V. 265. P. 317–325.
9. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лепахин В.К., Коробов Н.В., Меркулов В.А., Орехов С.Н., Сакаева И.В. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
10. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2015-02). М.: Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, 2015.
11. Wallock-Richards D., Doherty C.J., Doherty L., Clarke D.J., Place M., Govan J.R.W., Campopiano D.J. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 12. e112726.
12. Reiter J., Levina N., van der Linden M., Gruhlke M., Martin C., Slusarenko A.J. // *Molecules.* 2017. V. 22. P. 1711.