

Антимикробные свойства амикумацина А

О. В. ЕФРЕМЕНКОВА^{1*}, Н. И. ГАБРИЭЛЯН², И. А. МАЛАНИЧЕВА¹, Т. А. ЕФИМЕНКО¹, И. Г. СУМАРУКОВА¹, А. А. ГЛУХОВА¹, Ю. В. БОЙКОВА¹, Е. А. РОГОЖИН¹, А. М. КОРОЛЕВ¹, В. А. КОРШУН¹, И. В. ДРАБКИНА²

¹ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

² Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И.Шумакова Минздрава России, Москва

Antibacterial Properties of Amicoumycin A

O. V. EFREMENKOVA^{1*}, N. I. GABRIELIAN², I. A. MALANICHEVA¹, T. A. EFIMENKO¹, I. G. SUMARUKOVA¹, A. A. GLUKHOVA¹, YU. V. BOYKOVA¹, E. A. ROGOZHIN¹, A. M. KOROLEV¹, V. A. KORSHUN¹, I. V. DRABKINA²

¹ Gause Institute of Antibiotics, Moscow

² Academician V. I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

Изучена *in vitro* активность антибиотика амикумацина А в отношении 22 коллекционных тест-штаммов и 24 клинических изолятов бактерий и грибов. Показано, что амикумацин А обладает широким антимикробным спектром действия. Установлены минимальные подавляющие концентрации (МПК) амикумацина А в отношении метициллинорезистентного золотистого стафилококка (MRSA) и устойчивого к ванкомицину (VR) тест-штамма *Leuconostoc mesenteroides*, составляющие 0,06 мкг/диск. При изучении клинических изолятов с множественной лекарственной устойчивостью амикумацин А проявлял активность в отношении штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *C.krusei*, *Cr.neoformis* и *Prototheca spp.*

Ключевые слова: амикумацин А, патогенные микроорганизмы, устойчивость к антибиотикам, MRSA.

The *in vitro* activity of the antibiotic amikumacin A against 22 collective test strains and 24 clinical isolates of bacteria and fungi was studied. It is shown that amicoumycin A has a broad antimicrobial spectrum of activity. The minimum inhibitory concentration (MIC) of amicoumycin A against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and resistant to glycopeptide antibiotics of vancomycin group (VR) test strain *Leuconostoc mesenteroides* of 0.06 µg/disk were established. In the study of multidrug-resistant clinical isolates, amikumacin A exhibited activity against *S.aureus*, *S.epidermidis*, *C.krusei*, *Cr.neoformis* and *Prototheca spp.* strains.

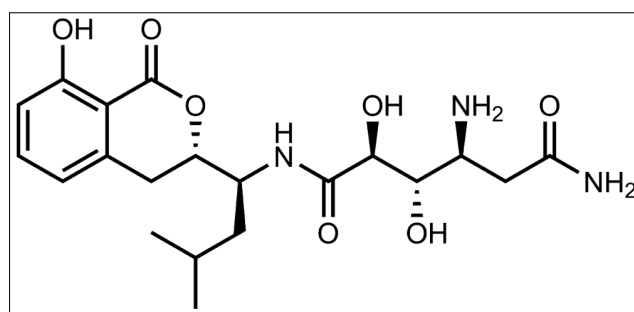
Keywords: amicoumycin A, antibiotic resistance, MRSA, pathogens.

Введение

В последние годы по мере распространения резистентности у болезнетворных бактерий к лекарственным препаратам всё актуальнее становится изыскание и введение в медицинскую практику антибиотиков, активных в отношении таких бактерий [1, 2]. В ходе поиска новых перспективных соединений нами был выделен из почвы штамм *B.pumilus* ИНА 01087 — продуцент антибиотика, активного в отношении тест-штамма метициллинорезистентного золотистого стафилококка (MRSA). Было установлено, что этот антибиотик является амикумацином А, относящимся к классу дигидроизокумаринов (рисунок) [3, 4].

Амикумацин А впервые был описан в 1981 г. в качестве средства для лечения язвы желудка и снятия отёков, но также было отмечено и его антибактериальное действие [5]. В последующий период показано, что амикумацин обладает ак-

тивностью в отношении возбудителя язвы желудка *Helicobacter pylori*, а также ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий, патогенных и фитопатогенных грибов, простейших и онкогенных клеток, но эти данные носят разрозненный и иногда противоречивый характер [6]. Также была установлена его активность в отношении MRSA, вызывающих нозокомиальные инфекции, которые не поддаются антибиотикотерапии [7]. По механизму действия, заключающемуся в специфическом



Амикумацин А.

© Коллектив авторов, 2016

*Адрес для корреспонденции: Москва 119021, ул. Б. Пироговская, 11. ФГБНУ «НИИНА». E-mail: ovefr@yandex.ru

ингибировании функционирования рибосомы, амикумацин А отличается от других антибиотиков, используемых в медицине, что подтверждает перспективность его дальнейшего изучения с целью применения в отношении патогенных бактерий, устойчивых к современным антибиотикам медицинского назначения [8].

Цель настоящей работы — определение *in vitro* антимикробного спектра амикумацина А в отношении коллекционных тест-штаммов и активности в отношении клинических изолятов патогенных микроорганизмов.

Материал и методы

Объект исследования. Антибиотик амикумацин А был получен из культуральной жидкости штамма *Bacillus pumilus* INA 01087, выделенного нами ранее из почвы [3, 4].

Штаммы микроорганизмов. В качестве тест-штаммов для определения антимикробной активности использовали 22 коллекционных тест-штамма (табл. 1). 24 клинических изолята получены от пациентов Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова в 2016 году (табл. 2). Идентификацию клинических изолятов и определение их чувствительности к антибиотикам проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе для идентификации микроорганизмов Siemens MicroScan Walk Away — 96 Plus System (США). Чувствительность определяли в отношении следующих антибиотиков: антибактериальных — азтреонама (АТМ), амикацина (АН), амоксициллина/клавулановой кислоты (АмС), ампициллина (АМ), ампициллина/сульбактама (SAM), ванкомицина (Va), гентамицина (GM), даптомицина (DM), имипенема (IPM), клиндамицина (CC), левофлоксацина (LVX), линезолида (LZD), меропенема (MEM), моксифлоксацина (MXF), оксациллина (OX), пиперациллина (PIP), пиперациллина/тазобактама (TZP), рифампицина (RA), синерцида (SR), тетрациклина (Te), тигециклина (TGC), тобрамицина (NN),

триметоприма/сульфаметоксазола (SXT), хлорамфеникола (С), цефазолина (CZ), цефепима (FEP), цефокситина (FOX), цефотаксима (CTX), цефтазидима (CAZ), цефтриаксона (CRO), цефуроксима (СХМ), ципрофлоксацина (CIP), эритромицина (Е), эртапенема (ETP); противогрибковых — амфотерицина В (Am), итраконазола (Itr), кетоконазола (Ket), миконазола (Mc), флуконазола (Flc), флуорцитозина (Flr).

Определение антимикробной активности. Антимикробную активность амикумацина А определяли методом диффузии в агар с применением дисков. На поверхность агаровой среды №2 Гаузе с высевным газонем тест-штаммов или клинических изолятов помещали бумажные диски диаметром 6 мм с нанесённым амикумацином А. После инкубирования в течение 20 ч определяли зоны задержки роста микроорганизмов. Для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) на диски наносили амикумацин А в максимальной концентрации 32 мкг/диск с последующим двукратным серийным разведением до концентрации 0,03 мкг/диск. Для определения чувствительности/резистентности клинических изолятов использовали диски, содержащие 32 мкг амикумацина А.

Результаты и обсуждение

На первом этапе были установлены величины МПК амикумацина А в отношении коллекционных тест-штаммов (табл. 1). Из табл. 1 следует, что амикумацин А активен в отношении большинства грамположительных бактерий, в том числе в отношении штамма *L.mesenteroides* VKPM В-4177 с высоким уровнем устойчивости к гликопептидному антибиотику ванкомицину (VR) — МПК 400 мкг/мл и метициллинорезистентного штамма *S.aureus* INA 00761 (MRSA) с устойчивостью к бета-лактамам антибиотикам (>32 мкг/мл), для которых МПК амикумацина составляла 0,06 мкг/мл. Также следует отметить, что один из двух тест-штаммов *M.smegmatis* 155 mc²

Таблица 1. Активность амикумацина А в отношении коллекционных тест-штаммов

Тест-штаммы	МПК амикумацина А, мкг/диск
Грамположительные бактерии	
<i>Bacillus mycoides</i> 537	>32
<i>B.pumilus</i> NCTC 8241	>32
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	4,0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM В-4177 (VR)	0,06
<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	0,25
<i>Mycobacterium smegmatis</i> 155 mc ²	2,0
<i>M.smegmatis</i> VKPM Ac 1339	>32
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	0,12
<i>S.aureus</i> INA 00761 (MRSA)	0,06
Грамотрицательные бактерии	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,0
<i>Comamonas terrigena</i> VKPM В-7571	>32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>32
Грибы	
<i>Aspergillus niger</i> INA 00760	>32
<i>A.niger</i> ATCC 9642	>32
<i>A.niger</i> ATCC 16404	>32
<i>A.ochraceus</i> INA 01112	>32
<i>Candida albicans</i> ATCC 14052	>32
<i>Chaetomium</i> sp. INA 01114	>32
<i>Cryptococcus lumicolus</i> ATCC 3949	>32
<i>Fusarium oxysporum</i> VKPM F 140	>32
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	8,0
<i>Trichoderma viride</i> INA 01111	>32

Таблица 2. Активность амикумацина А в отношении клинических изолятов патогенных бактерий*

Микроорганизмы	Диаметр зоны подавления роста, мм
Грамположительные бактерии	
<i>Staphylococcus aureus</i> 2476	15
<i>S.epidermidis</i> 2432	18
<i>S.epidermidis</i> 2480	19
<i>S.epidermidis</i> 2624	19
<i>S.epidermidis</i> 2688	17
Грамотрицательные бактерии	
<i>Acinetobacter baumannii</i> 1630	0
<i>A.baumannii</i> 1839	0
<i>A.baumannii</i> 2050	0
<i>A.baumannii</i> 2455	0
<i>A.baumannii</i> 2617	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1878	0
<i>K.pneumoniae</i> 2080	0
<i>K.pneumoniae</i> 2266	0
<i>K.pneumoniae</i> 2427	0
<i>K.pneumoniae</i> 2663	0
Грибы	
<i>Candida albicans</i> 1610	0
<i>C.albicans</i> 2122	0
<i>C.albicans</i> 2356	0
<i>C.catenulate</i> 1507	0
<i>C.krusei</i> 247	10
<i>Cryptococcus neoformis</i> 245	33
<i>C.parapsilosis</i> 1380	0
Водоросли	
<i>Prototheca</i> sp. 1376	32
<i>Prototheca</i> sp. 2109	0

Примечание. * — использовались диски, содержащие 32 мкг амикумацина А.

чувствителен к амикумацину А, что позволяет предположить, что амикумацин А может проявлять активность в отношении представителей другого вида микобактерий, а именно возбудителя туберкулеза *M.tuberculosis*. Из грамотрицательных бактерий к амикумацину чувствителен тест-штамм *E.coli* ATCC 25922. Из 10 грибных штаммов чувствительность установлена только у пекарных дрожжей *S.cerevisiae* RIA 259 с относительно высокой МПК — 8 мкг/диск.

Таким образом, амикумацин А способен проявлять активность в отношении представителей всех трёх исследованных групп микроорганизмов: грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов.

На следующем этапе определяли активность амикумацина А в отношении клинических изолятов патогенных микроорганизмов (табл. 2). Штаммы эпидермальных стафилококков (*S.epidermidis* 2480, 2624, 2688) устойчивы к 13 и штамм *S.epidermidis* 2432 — к 14 антибиотикам, а штамм золотистого стафилококка *S.aureus* 2476 устойчив только к одному антибиотику (С) из 20 антибиотиков медицинского назначения (AmC, SAM, CZ, CRO, С, CC, Dap, E, GM, IPM, LVX, LZD, MEM, MXF, OX, RA, Syn, Te, SXT, Va). Все перечисленные штаммы чувствительны к амикумацину А.

Грамотрицательные бактерии двух видов, приведённые в табл. 2, обладают множественной лекарственной устойчивостью ко всем исследованным антибиотикам: штаммы *A.baumannii* устойчивы к 15 антибиотикам из 15 (AN, SAM, FEP, CTX, CAZ, CRO, CIP, GM, IMP, LVX, MEM, PIP, Te, NN, SXT) и только штамм 1839 обладает промежуточной чувствительностью к SAM; штаммы *K.pneumoniae* из 24 антибиотиков чувствительны к TGC (штаммы 2266, 2427, 2663) или обладают промежуточной чувствительностью к нему (штаммы 1878 и 2080); один штамм (2266) чувствителен к CAZ из 24 антибиотиков (AN, AmC, SAM, AM, ATM, CZ, FEP, CTX, FOX, CAZ, CRO, CXM, CIP, ETP, GM, IPM, LVX, MEM, TZP, PIP, Te, TGC, NN, SXT). В отношении указанных клинических изолятов амикумацин А не активен.

Из 7 клинических изолятов представителей рода *Candida* амикумацин А был активен в отношении 2 штаммов: *C.krusei* 247 и *Cr.neoformis* 245, из которых первый штамм устойчив к шести противогрибковым антибиотикам (Am, Mc, Ket, Flc, Flr, Itr), второй — только к Mc.

В нашем распоряжении было 2 клинических изолята возбудителя опасного заболевания прототекоза — бесхлорофильной одноклеточной водоросли *Prototheca* sp. Прототекоз лечат противогрибковыми антибиотиками. Штамм 1376 был чувствителен к Mc, Am, Ket, Flc и к амикумацину А.

Заключение

Из-за распространения патогенных микроорганизмов, устойчивых к современным антибиотикам, требуются разработка и внедрение в медицинскую практику новых эффективных препаратов. В ходе изыскания антибиотиков, активных в отношении устойчивых тест-штаммов, а именно *S.aureus* INA 00761 (MRSA) и *L.mesenteroides* VKPM B-4177 (VR), нами был выделен штамм-продуцент ранее описанного антибиотика амикумацина А. Результаты проведённого исследования свидетельствуют, что амикумацин А обладает широким спектром действия, охватывающим грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также грибы. При анализе активности амикумацина А в отношении клинических изолятов с множественной лекарственной устойчивостью установлена чувствительность к нему ряда клинических штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *C.krusei*, *Cr.neoformis* и *Prototheca* sp., устойчивых к антибиотикам медицинского назначения. На основании полученных результатов можно рассматривать амикумацин А перспективным антибиотиком для дальнейшего исследования с целью определения токсичности и эффективности *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance. 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
2. Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J Antibiot* 2013; 66: 10: 571—591.
3. Ефименко Т.А., Маланicheva И.А., Зенкова В.А., Королев А.М., Остерман И.А., Сергиев П.В., Ефременкова О.В. Изыскание антибиотиков, эффективных в отношении бактерий с лекарственной устойчивостью, на примере *Bacillus pumilus* — продуцента антибиотика амикумацина А. *Вестник Оренбургского университета* 2014; 13: 27—31, 150—151. / Efimenko T.A., Malanicheva I.A., Zenkova V.A., Korolev A.M., Osterman I.A., Sergiev P.V., Efremenkova O.V. Izyskanie antibiotikov, jeffektivnykh v otnoshenii bakterij s lekarstvennoj ustojchivost'ju, na primere *Bacillus pumilus* — producenta antibiotika amikumacina A. *Vestnik Orenburgskogo universiteta* 2014; 13: 27—31, 150—151. [in Russian]
4. Маланicheva И.А., Ефименко Т.А., Зенкова В.А., Королев А.М., Остерман И.А., Сергиев П.В., Ефременков О.В. Бактерии рода *Bacillus* — продуценты антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость болезнетворных микроорганизмов. *Известия УНЦ РАН* 2015; 4 (1): 98—101. / Malanicheva I.A., Efimenko T.A., Zenkova V.A., Korolev A.M., Osterman I.A., Sergiev P.V., Efremenkov O.V. Bakterii roda *Bacillus* — producenty antibiotikov, preodolevajushihh lekarstvennuju ustojchivost' boleznetvornyx mikroorganizmov. *Izvestija UNC RAN* 2015; 4 (1): 98—101. [in Russian]
5. Itoh J., Omoto S., Shomura T., Nishizawa N., Miyado S., Yuda Y., Shibata U. Amicoumacin-A, a new antibiotic with antiinflammatory and antiulcer activity. *J Antibiot* 1981; 34: 611—613.
6. Tyurin A.P., Efimenko T.A., Prokhorenko I.A., Rogozhin E.A., Malanicheva I.A., Zenkova V.A., Efremenkova O.V., Korshun V.A. Amicoumacins and related compounds: chemistry and biology. 2016; принята к печати.
7. Lama A., Pané-Farré J., Chon T., Wiersma A. M., Sit C. S., Vederas J. C., Hecker M., Nakano M. M. Response of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to amicoumacin A. *PLoS One* 2013; 7: e34037.
8. Polikanov Y.S., Osterman I.A., Szal T., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Kusochek P., Bulkley D., Malanicheva I.A., Efimenko T.A., Efremenkova O.V., Konevega A.L., Shaw K.J., Bogdanov A.A., Rodnina M.V., Dontsova O.A., Mankin A.S., Steitz T.A., Sergiev P.V. Amicoumacin A inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome. *Mol Cell* 2014; 56: 531—540.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ефременкова О.В. — руководитель сектора, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Габриэлян Н.И. — заведующая отделом, ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова» Минздрава России, Москва

Маланicheva И.А. — с.н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Ефименко Т.А. — н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Сумарукова И.Г. — н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Глухова А.А. — н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Бойкова Ю.В. — н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва.

Рогожин Е.А. — н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Королев А.М. — в.н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Коршун В.А. — зав. лаборатории, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Драбкина И.В. — врач-бактериолог, ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова» Минздрава России, Москва