

Синергидное действие катионного пептида хоминина и нового дезинфектанта на основе изохинолина на образование биоплёнок полирезистентных стафилококков

*Л. И. КОНОНОВА¹, И. А. ПЬЯНКОВ², А. А. СМОЛЯК³, Ю. В. ШКЛЯЕВ³, В. П. КОРОБОВ^{1,2}

¹ «Институт экологии и генетики микроорганизмов» — филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь

² Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь

³ «Институт технической химии» — филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь

Synergistic Effect of the Cationic Peptide Hominin and a New Disinfectant Based on Isoquinoline on Formation of Biofilms in Multidrug-Resistant Staphylococci

*L. I. KONONOVA¹, I. A. PYANKOV², A. A. SMOLYAK³, YU. V. SHKLYAEV³, V. P. KOROBV^{1,2}

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm

² Perm National Research Polytechnic University, Perm

³ Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm

Растущая угроза распространения образующих биоплёнки госпитальных штаммов коагулазонегативных стафилококков, резистентных к антибиотикам, определяет необходимость экстренного поиска новых эффективных антибактериальных соединений, а также разработки методов совместного использования традиционных и альтернативных антибиотиков. В статье представлены результаты исследования совместного действия препарата «СА» — нового синтетического производного алкалоида изохинолина и низкомолекулярного катионного пептида семейства лантибиотиков хоминина, ингибирующего развитие биоплёнок бактерий клинического штамма *Staphylococcus haemolyticus* и его ванкомициноустойчивого варианта. Обнаружено, что комбинации этих соединений обладают синергидным эффектом, подавляющим формирование плёнок обоих исследованных штаммов стафилококков при сниженных концентрациях этих антибактериальных соединений.

Ключевые слова: стафилококки; адгезия; биоплёнки; дезинфектанты; изохинолин; хоминин; минимальная концентрация, ингибирующая развитие биоплёнок; синергизм.

The growing threat of proliferation of biofilm-forming hospital strains of coagulase-negative staphylococci resistant to antibiotics determines the need for an urgent search for new effective antibacterial compounds, as well as the development of methods for the combined use of traditional and alternative antibiotics. The article presents the results of a study of the combined effect of the drug «SA» — a new synthetic derivative of the alkaloid isoquinoline and a low-molecular-weight cationic peptide of the lantibiotic family hominin, which inhibits the development of bacterial biofilms of the clinical strain of *Staphylococcus haemolyticus* and its vancomycin-resistant isolates. It was found that combinations of these compounds have a synergistic effect that suppresses the formation of biofilms of both studied strains of staphylococci at reduced concentrations of these antibacterial compounds.

Keywords: staphylococci, adhesion, biofilms, disinfectants, isoquinoline, hominin, minimal biofilm inhibitory concentration, synergism.

Бактерии рода *Staphylococcus* — перманентные симбионты человека и животных, являются важными компонентами их кожных покровов и слизистых оболочек. Известно, что сапрофитные бактерии сравнительно редко вызывают развитие патогенных процессов [1]. Однако, ввиду достаточно высокой устойчивости условно-патогенных микроорганизмов к агрессивным факторам окружающей среды, в том числе и к антибактериальным препаратам, бактерии этой группы заслуживают особого внимания, что определяет необходимость постоянного сбора клиническими лабораториями информации о состоянии уровня антибиотикорезистентности в конкретных лечебных стационарах. Имеющиеся данные указывают на то, что коагула-

зонегативные стафилококки (КНС) являются одной из главных причин возникновения клинически значимых инфекций. Прежде всего, это связано с выраженной способностью микроорганизмов этих видов формировать биоплёнки [2]. Так, при изучении наличия КНС на объектах внутренней среды больничных стационаров (воздуха, пола, стен и медицинского оборудования) по количеству образующих биоплёнки штаммов лидируют бактерии видов *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus haemolyticus* [3], которые при попадании в организм пациентов с ослабленным иммунитетом могут вызывать их тотальное инфицирование с развитием выраженных болезненных состояний.

Известно, что бактерии в составе биоплёнок менее уязвимы к действию антибактериальных препаратов и факторов иммунной системы человека [4]. Устойчивость бактерий в биоплёнках к лекарственным факторам, возможно, связана с

© Коллектив авторов, 2020

Адрес для корреспонденции: 614081, Пермь, ул. Голева, 13. ПФИЦ УрО РАН

уменьшением свободной части их поверхностей за счёт формирования межклеточных контактов с образованием элементов единой генетической системы в виде плазмид и появлением персистеров — субпопуляций бактериальных клеток, которые, находясь в дормантном состоянии, характеризуются пониженной чувствительностью к воздействию различных стрессорных факторов, в том числе, антибиотиков. Внеклеточный матрикс плёнок, состоящий из синтезируемых клеточными элементами полимеров, по-видимому, также способен связывать или инактивировать используемые для терапии антибиотики. Таким образом, формирование биоплёнок обеспечивает бактериям физиологическую и функциональную стабильность и является основой конкурентного выживания их в оккупированной экологической нише [5].

Для предупреждения бактериальной колонизации медицинских учреждений проводится регулярная обработка их внутренних поверхностей различными дезинфицирующими и антисептическими средствами. В качестве новых дезинфектантов могут быть использованы неизвестные ранее производные природного алкалоида изохинолина [6–8]. Так, ранее нами было установлено подавление развития планктонных культур полирезистентных клинических изолятов стафилококков препаратом «СА» — ((2,3,5,6-Тетрагидрооксазоло[2,3-а] изохинолин-4-иум-2-ил) метил) ртуть (II) хлоридом (рис. 1) [9].

Исследованиями последних лет показано, что в качестве альтернативы традиционным антибиотикам в подавлении развития бактерий рода *Staphylococcus* могут быть использованы низкомолекулярные катионные пептиды семейства лантибиотиков варнерин [10] и хоминин [11]. В экспериментах *in vitro* была также выявлена антистафилококковая активность субингибиторных концентраций препарата «СА» при совместном использовании его с этими пептидами, а также с антибиотиками ванкомицином, даптомицином и хлорамфениколом [9]. В связи с тем, что многие широко используемые дезинфицирующие средства являются токсичными соединениями, комбинационный подход открывает реальные возможности снижения их негативного действия на макроорганизмы.

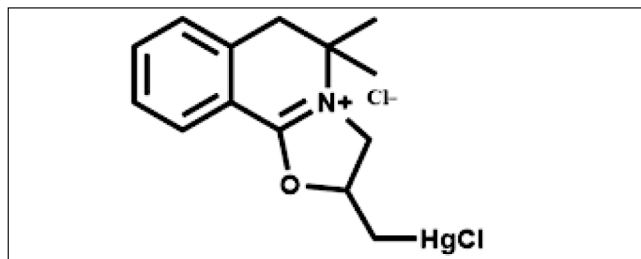


Рис. 1. Структура ((2,3,5,6-Тетрагидрооксазоло [2,3-а] изохинолин-4-иум-2-ил) метил) ртуть (II) хлорида.

Цель работы — изучение чувствительности адгезионных и биоплёнкообразующих способностей полирезистентных коагулазонегативных стафилококков к действию нового химического производного изохинолина — препарата «СА» в кооперации с низкомолекулярным катионным пептидом семейства лантибиотиков хоминином.

Материал и методы

В работе использованы бактериальные штаммы коагулазонегативных стафилококков: клинический изолят *S.haemolyticus* 18, а также полученный лабораторной селекцией его производный штамм *S.haemolyticus* 18₃₃, обладающий средним уровнем устойчивости к ванкомицину [9].

Для определения спектра антибактериальной активности препарата «СА» был использован достаточно широкий ряд грамположительных бактерий (*Staphylococcus epidermidis* GISK 33 и его ванкомициноустойчивый вариант *S.epidermidis* GISK 33 Van^r [12], *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* NCIBM 8884, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Mycobacterium smegmatis* GISK 607, *Mycobacterium avium* GISK 168) и штаммы грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* ATCC 25922 и *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603).

Бактерии культивировали в колбах на среде LB, содержащей (в г/л): триптон («Panreac», Испания) — 10, дрожжевой экстракт («Becton, Dickinson and Company», США) — 5, KCl («Вектон», Россия) — 6,4, pH 7,2, на орбитальном шейкере Certomat IS («Sartorius», Германия) при 150 об./мин и температуре 37°C. За динамикой развития бактериальных культур следили по изменению их оптической плотности при 600 нм, используя спектрофотометр PD-303 («APEL», Япония) и кюветы с длиной оптического пути 1 см.

Для характеристики чувствительности бактерий изучаемых штаммов к антибиотикам использовали метод диффузии с дисков («НИЦФ», Россия) по стандартной процедуре [13]. Минимальные ингибиторные концентрации (МИК) пептида и препарата «СА» для изучаемых штаммов определяли методом двукратных серийных разведений в бульоне [14]. Титрование проводили в 96-луночных полистироловых планшетах («Медполимер», Россия) с использованием питательной среды LB (без KCl). Инокуляты бактерий готовили из суточных агаровых культур, суспендируя их в питательном бульоне до оптической плотности ~0,2 (10⁸ КОЕ/мл) при 600 нм, и вносили в лунки планшетов до конечной концентрации 10⁷ КОЕ/мл. Культивирование проводили при 37°C в течение 24 ч. Минимальные концентрации тестируемых соединений, при которых в лунках отсутствовал рост бактерий, принимали как МИК.

Минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) препарата «СА» выявляли методом Flash microbiocide [15].

Степень гидрофобности поверхностей бактериальных клеток определяли ВАТН-тестом в двухфазной системе с гексадеканом [16].

Для характеристики адгезионной активности бактерий изучаемых штаммов их клеточные суспензии, приготовленные из свежих агаровых культур и содержащие 10⁷ КОЕ/мл, вносили в объёме 2 мл в полистироловые чашки Петри (диаметр 40 мм, «Медполимер», Россия) и инкубировали без перемешивания в течение 30 мин при 37°C. После окончания инкубации планктонные клетки осторожно удаляли аспирацией, а адгезированные на донной поверхности чашек бактерии трижды осторожно промывали 10 мМ фосфатным буфером, pH 7,2, в течение 2 мин окрашивали генцианвиолетом (0,1%), отмывали от красителя деионизованной водой, высушивали на воздухе и определяли их численность на микровизоре μVizo-103 («Ломо», Россия), просматривая 10 полей зрения при увеличении ×1250. Влияние препарата «СА» на адгезию бактерий к полистиролу оценивали, внося суспензии клеток в чашки Петри после предварительного высушивания в них растворов препарата «СА» различной концентрации.

В качестве сред культивирования при изучении биоплёнок образующих способностей изучаемых штаммов использовали питательные среды LB и LB с добавлением 0,25% глюкозы, а также коммерческую среду TSB («Sigma-Aldrich», США), содержащую в своем составе глюкозу в той же концентрации. В качестве инокулятов служили 18 ч (ночные) жидкие бактериальные культуры после проведения концентрации клеток в них питательным бульоном до 10^6 КОЕ/мл. Формирование бактериальных плёнок проводили в 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах («Медполимер», Россия) при 37°C в течение 48 ч в статических условиях. После окончания культивирования планктонные клетки удаляли аспирацией, лунки планшетов осторожно двукратно промывали 10 мМ фосфатным буфером, pH 7,2. Сформировавшиеся биоплёнки фиксировали этанолом (20 мин), а затем высушивали при 37°C в течение 1 ч, после чего окрашивали 0,1% генцианвиолетом в течение 30 мин при комнатной температуре. Избыток красителя отмывали проточной водой и биоплёнки высушивали при комнатной температуре. Сорбированный биоплёнками краситель экстрагировали этанолом и его количество определяли измерением оптической плотности полученных спиртовых экстрактов на микропланшетном спектрофотометре Benchmark Plus («Bio-Rad», США) при 570 нм.

Для определения минимальных концентраций хоминина и препарата «СА», ингибирующих формирование биоплёнок (БИК) штаммами *S.haemolyticus* 18 и *S.haemolyticus* 18₃₃, проводили титрование исследуемых соединений в среде LB без KCl с глюкозой до конечных концентраций хоминина в пределах 655,37–0,64, а препарата «СА» — 83,33–0,01 мкг/мл. Инокулирование, культивирование и оценку ингибирования плёнок образования проводили, как указано выше. За БИК принимали те минимальные концентрации хоминина и препарата «СА», при которых окрашивание генцианвиолетом было равным окрашиванию этим красителем лунок планшетов после инкубации в них стерильной питательной среды (отрицательный контроль).

Совместное действие препарата «СА» и хоминина на развитие биоплёнок бактерий исследуемых штаммов определяли с помощью метода «шахматной доски» [17], используя комбинации двукратных серийных разведений препарата «СА» с двукратными серийными разведениями хоминина. Диапазон концентраций каждого соединения в комбинациях соответствовал $< 1/32 - > 4 \times \text{БИК}$.

Критериями оценки эффектов комбинаций «СА» и хоминина служили индекс фракционной ингибиторной концентрации для биоплёнки (ФБИК) и изоболографический анализ. Индекс ФБИК рассчитывали по формуле:

Индекс ФБИК = ФБИК А + ФБИК В, где ФБИК А = БИК А в комбинации / БИК А, ФБИК В = БИК В в комбинации / БИК В; А — препарат «СА», В — хоминин. Эффект комбинации считали синергидным при индексе ФБИК $\leq 0,5$ и антагонистическим при индексе ФБИК > 1 . Результаты экспериментов между проявлением синергизма и тенденцией к антагонизму определяли как индифферентные или нейтральные [18].

Для построения изоболограмм, согласно рекомендациям [19, 20], концентрации соединений в комбинациях, ингибирующих рост биоплёнок, были фиксированы и нанесены на график, оси которого представляют собой концентрации индивидуальных агентов ($\times \text{БИК}$). По оси X — концентрация препарата «СА», по оси Y — концентрация хоминина. Прямая линия, соединяющая максимальные значения концентраций индивидуальных препаратов — это прямая аддитивности, означающая отсутствие взаимодействия, то есть эффект комбинаций равен сумме эффектов индивидуальных агентов. Таким образом, при расположении точек ниже прямой эффект свидетельствует о синергизме, а выше — об антагонистическом действии.

Способность сорбции препарата «СА» бактериальными клетками оценивали после внесения его в водные суспензии до конечной концентрации 33 мкг/мл. Использовали бактериальные суспензии с оптической плотностью 0,2 (600 нм, спектрофотометр PD-303 («APEL», Япония) и кюветы с ди-

ной оптического пути 1 см). Суспензии бактерий готовили из свежих (18–24 ч) агаровых культур. Уровень содержания препарата «СА» в растворах после его взаимодействия с клетками в течение 0, 1, 2 и 24 ч устанавливали титрованием стерилизованных фильтрованием («Millipore», США, 0,45 мкм) супернатантов в LB с использованием в качестве тест-штамма *S.haemolyticus* 18. Инокуляцию планшетов, инкубацию и учёт результатов проводили, как описано выше для определения МИК «СА». Одновременно определяли количество живых клеток в суспензиях чашечным методом [21] и изменение оптической плотности суспензий бактерий по времени, инкубируя их в статических условиях при температуре 37°C. В качестве контролей служили бактериальные суспензии без внесения в них препарата «СА» и его стерильный водный раствор с концентрацией препарата 33 мкг/мл.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 («GraphPad Software Inc.», США) с использованием метода ANOVA. Данные представляли в виде $M \pm SD$ трёх независимых экспериментов. Различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Изучение чувствительности к препарату «СА» ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий различных родов, результаты которого представлены в табл. 1, выявило практически одинаковые значения МИК, равные 1,3–2,6 мкг/мл для большинства исследованных штаммов. Менее чувствительными к действию препарата оказались микобактерии, по-видимому, вследствие уникальной архитектуры их клеточных стенок и *K.pneumonia*, благодаря наличию полисахаридной капсулы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что препарат «СА» обладает выраженным бактерицидным действием в отношении всех использованных коллекционных штаммов, так как соотношение их МБК/МИК было < 4 [22].

Анализ чувствительности штаммов стафилококков *S.haemolyticus* 18 и *S.haemolyticus* 18₃₃ к антибактериальным соединениям, результаты которого представлены в табл. 2, показал, что бактерии обоих штаммов обладают устойчивостью к бета-лактамам антибиотикам, а также и к препаратам с иными механизмами антибактериального действия — аминогликозидам, макролидам и хинолонам. Полученный селекцией родительского штамма *S.haemolyticus* 18 его устойчивый к ванкомицину вариант *S.haemolyticus* 18₃₃, обладающий средним уровнем устойчивости к этому антибиотику, явля-

Таблица 1. Антибактериальная активность препарата «СА»

Штаммы	МИК «СА», мкг/мл
<i>S.epidermidis</i> GISK 33	1,3
<i>S.epidermidis</i> GISK 33 Van ^r	1,3
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	1,3
<i>S.pyogenes</i> NCIBM 8884	2,6
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	2,6
<i>M.smegmatis</i> GISK 607	10,4
<i>M.avium</i> GISK 168	10,4
<i>E.coli</i> ATCC 25922	2,6
<i>K.pneumonia</i> ATCC 700603	41,6

Таблица 2. Чувствительность бактерий *S. haemolyticus* 18 и *S. haemolyticus* 18₃₃ к использованным в работе антибиотикам

Антибиотики	<i>S. haemolyticus</i> 18	<i>S. haemolyticus</i> 18 ₃₃
Бета-лактамы		
Бензилпенициллин	Устойчивые	Устойчивые
Цефазолин		
Оксациллин		
Аминогликозиды		
Гентамицин	Устойчивые	Устойчивые
Макролиды		
Эритромицин	Устойчивые	Устойчивые
Кларитромицин		
Хинолоны		
Ципрофлоксацин	Устойчивые	Устойчивые
Гликопептиды		
Ванкомицин	Чувствительные	Средний уровень устойчивости
Липопептиды		
Даптомицин	Чувствительные	Нечувствительные*

Примечание. * — категория чувствительности, используемая для изолятов с МИК даптомицина > 1 мкг/мл [23].

ющемся альтернативой для подавления возбудителей инфекций, устойчивых к бета-лактамам антибиотикам, становится также нечувствительным и к липопептидному антибиотику даптомицину и, как показали дополнительные исследования, менее чувствительным к пептидам семейства лантибиотиков варнерину и хоминину с более чем двукратным возрастанием значений их МИК [9].

Сравнение сорбционной активности бактерий использованных в работе штаммов стафилококков на гидрофобной поверхности полистирола представлено на рис. 2, из данных которого следует, что производный штамм *S. haemolyticus* 18₃₃ обладает пониженной адгезионной способностью, возможно, обусловленной изменением физико-химических характеристик клеточных оболочек бактерий в процессе их адаптации к ванкомицину. Как показало исследование состояния поверхностей бактериальных клеток при адгезии к углеводородам, родительский штамм *S. haemolyticus* 18 обладал большей гидрофобностью их поверхностей ($75,3 \pm 0,9$ %) по сравнению с бактериями производного штамма ($63,6 \pm 2,9$ %) (см. рис. 7).

Обращает на себя внимание выраженное снижение адгезионной способности бактерий обоих штаммов к полистиролу под действием препарата «СА» (см. рис. 2). В присутствии на атакуемой поверхности даже незначительных количеств этого соединения (0,5 и 1 мкг) происходит существенное снижение сорбции бактериальных клеток, в среднем, на 50%.

Сравнительный анализ интенсивности образования биоплёнок бактериями изучаемых штаммов в зависимости от состава среды их культивирования представлен на рис. 3. Выявлено, что при культивировании в среде LB, бактерии производного штамма *S. haemolyticus* 18₃₃ образуют умерен-

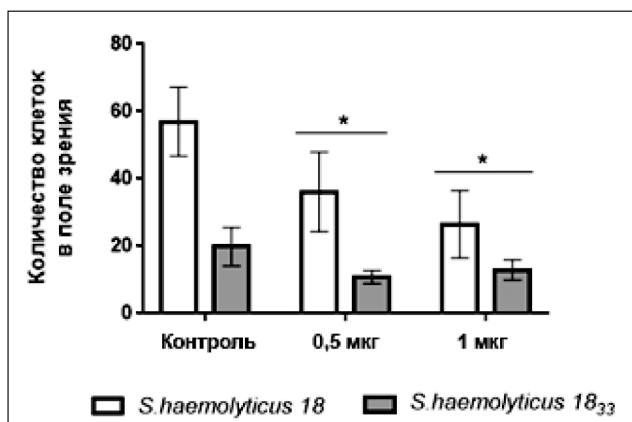


Рис. 2. Адгезия бактерий *S. haemolyticus* 18 и *S. haemolyticus* 18₃₃ к поверхности полистирола.

* — различия статистически значимы при сравнении с контролем ($p < 0,05$).

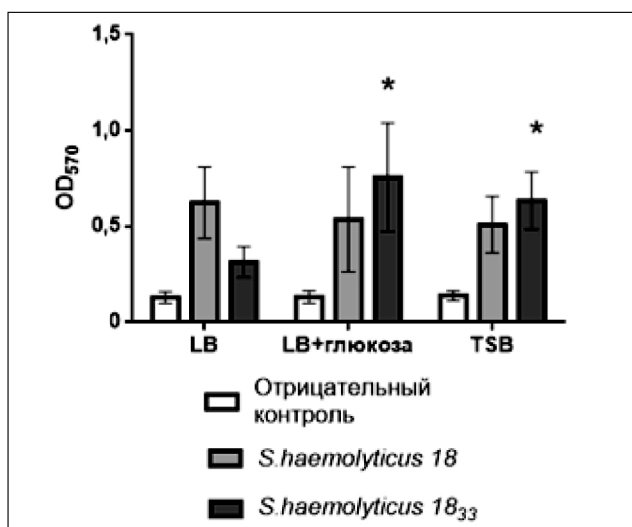


Рис. 3. Зависимость интенсивности образования биоплёнок бактериями *S. haemolyticus* 18 и *S. haemolyticus* 18₃₃ от состава питательных сред.

* — различия статистически значимы при сравнении с данными формирования их на LB ($p < 0,05$).

ные плёнки по сравнению с бактериями родительского штамма, формирующими биоплёночные структуры более интенсивно, а добавление в среду роста глюкозы значительно стимулировало процесс формирования плёнок производным штаммом. В связи с полученными данными, дальнейшее изучение антибактериального действия препарата «СА» и катионного пептида хоминина на образование плёнок проводилось с использованием среды LB с добавлением 0,25% глюкозы.

Результатами этих экспериментов обнаружено, что бактерии обоих штаммов как свободно живущие, так и в составе биоплёнок одинаково чувствительны к использованным в работе антибактериальным соединениям — хоминину и препарату «СА». Значения минимальных concentra-

Таблица 3. Чувствительность планктонных бактерий и в составе биоплёнок *S.haemolyticus* 18 и *S.haemolyticus* 18₃₃ к использованным антибактериальным соединениям

Штаммы	МИК, БИК (мкг/мл)	
	Хоминин	«СА»
<i>S.haemolyticus</i> 18	82	1,3
<i>S.haemolyticus</i> 18 ₃₃	328	1,3

ций этих препаратов, ингибирующих развитие планктонных клеток (МИК) и формирование биоплёнок (БИК), представлены в табл. 3.

Дальнейшее изучение совместного действия хоминина и препарата «СА» на формирование плёнок (в среде LB без KCl с добавлением 0,25% глюкозы) показало выраженное подавление плёнокообразования бактериями, как родительского, так и производного штаммов, субингибиторными концентрациями обоих соединений при их комбинациях (табл. 4), что особенно важно для снижения токсического действия на макроорганизм ранее неизвестных химических соединений, предлагаемых в качестве антисептиков и дезинфектантов.

Синергизм действия на процессы образования стафилококками биоплёнок использованных соединений, обнаруженный с помощью метода «шахматной доски», показан для обоих использованных в экспериментах штаммов стафилококков. Индексы ФБИК, равные 0,5, демонстрируют четырёхкратное снижение ингибирующих плёнокообразование концентраций хоминина и «СА» при их совместном использовании. Другие сочетания субингибиторных концентраций этих препаратов от 0,125× до 0,5×БИК дают нейтральный эффект, характеризующийся индексами ФБИК = 0,625. Однако при существующих иных интерпретациях результатов совместного действия антибактериальных соединений, полученных методом «шахматной доски» [20, 24], эти сочетания приводят к частичным синергидным или аддитивным эффектам.

Графическим представлением природы взаимодействия двух антибактериальных соединений на формирование плёнок стафилококков является изоболограммный анализ, интерпретация которого по результатам использования метода «шахматной доски» показана на рис. 4. Диагональная линия, соединяющая максимальные концентрации индивидуальных соединений является прямой аддитивности. Экспериментальные данные, отражающие собой различные эффекты доз хо-

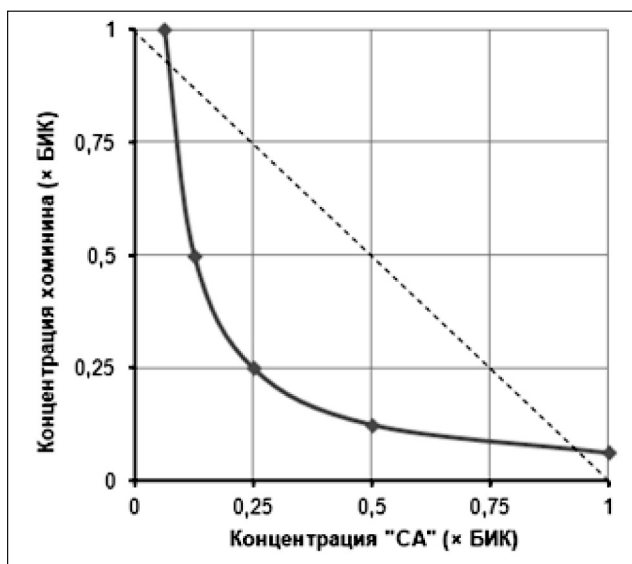


Рис. 4. Изоболограммный анализ совместного действия хоминина и «СА» на формирование плёнок *S.haemolyticus* 18 и *S.haemolyticus* 18₃₃.

минина и препарата «СА», располагающиеся ниже этой прямой, свидетельствуют о синергизме совместного действия этих соединений.

Следует отметить, что результаты изоболограммного анализа и установленных уровней индексов ФБИК не являются противоречивыми и свидетельствуют об их комплиментарности [25], так как изоболограммный анализ отражает степень взаимодействия как функцию соотношения концентраций соединений, при этом, чем дальше данные располагаются от линии аддитивности, тем больший эффект — максимальный синергизм или антагонизм. В то же время анализ индексов ФБИК позволяет математически оценить степень синергии в зависимости от дозы индивидуальных компонентов.

При изучении динамики связывания бактериями *S.haemolyticus* 18 и *S.haemolyticus* 18₃₃ препарата «СА» из его водных растворов (рис. 5) снижения оптической плотности суспензий в присутствии «СА» не обнаружено в течение 24 ч. В то же время было установлено практически мгновенное бактерицидное действие препарата «СА» на клетки обоих штаммов в использованной концентрации. Так, практически сразу после его внесения в бактериальные суспензии живые клетки в них не выявлялись.

При отсутствии лизиса бактериальных клеток в течение 24 ч как в контроле (без «СА»), так и в опы-

Таблица 4. Фракционные ингибиторные концентрации хоминина и препарата «СА» для биоплёнок, ФБИК и индексы ФБИК

Комбинация	ФБИК, мкг/мл			Индекс ФБИК
	<i>S.haemolyticus</i> 18	<i>S.haemolyticus</i> 18 ₃₃	×БИК	
Хоминин + «СА»	82/82+0,081/1,3	328/328+0,081/1,3	1+0,062	1,062
	41/82+0,163/1,3	164/328+0,163/1,3	0,5+0,125	0,625
	20,5/82+0,325/1,3	82/328+0,325/1,3	0,25+0,25	0,5
	10,25/82+0,65/1,3	41/328+0,65/1,3	0,125+0,5	0,625
	5,13/82+1,3/1,3	20,5/328+1,3/1,3	0,062+1	1,062

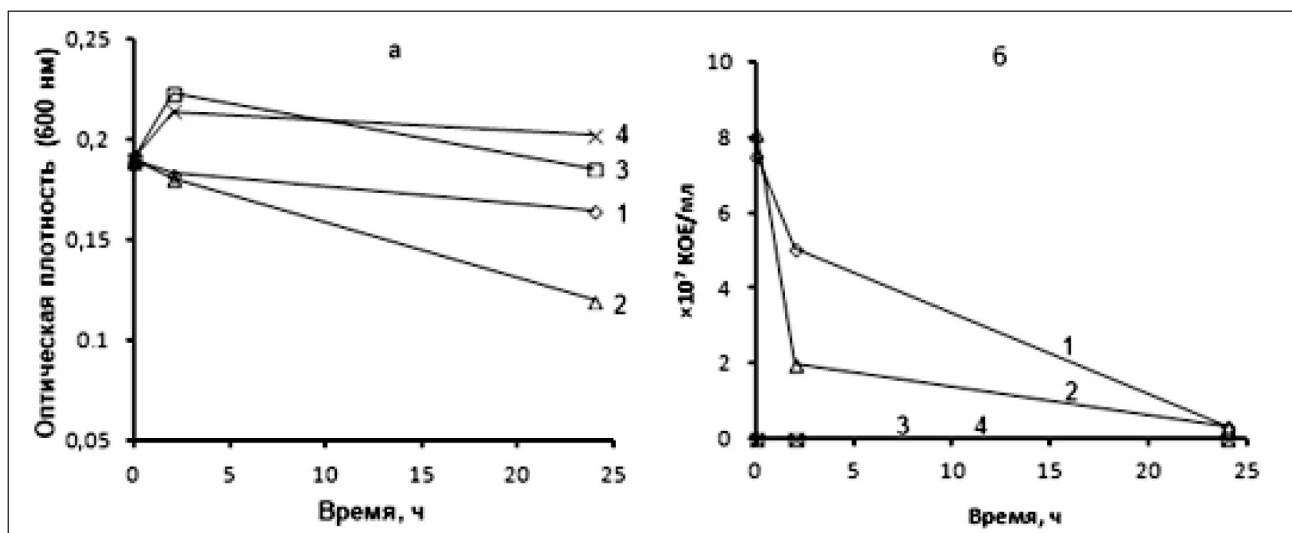


Рис. 5. Изменение оптической плотности бактериальных суспензий (а) и числа живых клеток (б).

1 — контроль, *S. haemolyticus* 18; 2 — контроль, *S. haemolyticus* 18₃₃; 3 — опыт, *S. haemolyticus* 18; 4 — опыт, *S. haemolyticus* 18₃₃.

те, косвенно подтверждённого анализом оптических плотностей бесклеточных супернатантов на спектрофотометре UV-1700 («SHIMADZU», Япония), не выявившим повышения их поглощения в ультрафиолетовой области спектра при 260 и 280 нм, свидетельствующего об отсутствии выхода из клеток в среду культивирования нуклеиновых кислот и белков, установлено значительное снижение содержания препарата «СА» в среде инкубации (рис. 6).

Как видно из данных, представленных на рис. 6, препарат «СА» эффективно сорбируется клетками обоих бактериальных штаммов сразу же после внесения его в среду культивирования (0 ч) и его концентрация в среде снижается в течение 24 ч. Возможно, степень связывания препарата «СА» поверхностями бактериальных клеток зависит от их физиологического состояния и характеризуется максимальным значением при его связывании с ещё живыми клетками.

Интересно, что сорбция препарата «СА» бактериальными клетками приводит, согласно результатам ВАТН-теста, к выраженному повышению уровня гидрофобности их клеточных поверхностей. В большей степени это выявлено для штамма *S. haemolyticus* 18₃₃ (рис. 7). При этом важно отметить, что уровень гидрофобности клеток не зависел от внесённого количества препарата, так как в дополнительных экспериментах было показано, что препарат «СА» в конечных концентрациях 1–33 мкг/мл не приводил к появлению достоверных отличий в показателях гидрофобности клеточных поверхностей бактериальных клеток.

Обсуждение

Алкалоиды — широко распространённые биологически активные азотсодержащие органические соединения основного характера, выделенные

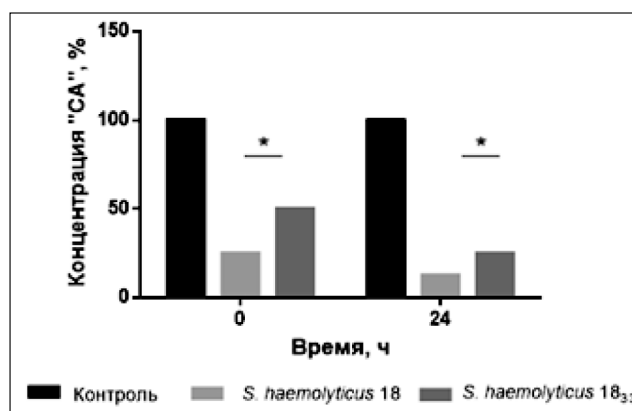


Рис. 6. Изменение концентрации препарата «СА» в средах инкубации бактерий *S. haemolyticus* 18 и *S. haemolyticus* 18₃₃.

* — различия статистически значимы при сравнении с контролем — стерильным раствором «СА» ($p < 0,05$).

из продуктов метаболизма микроорганизмов, морских организмов, наземных животных, грибов и растений [26–28], многие из которых обладают выраженной противомикробной активностью [29]. Многочисленные исследования структуры и функции этих соединений сделали возможным синтез их аналогов и проведение химических модификаций с целью получения препаратов направленного действия [30], в том числе и разработки эффективных терапевтических агентов [31, 32].

Направленным синтезом нового производного изохинолина — препарата «СА», ((2,3,5,6-Тетрагидрооксазола[2,3-а] изохинолин-4-иум-2-ил) метил) ртуть (II) хлорида, нами получено высокоактивное соединение широкого спектра антибактериального действия.

В настоящей работе установлено выраженное ингибирование этим соединением адгезии бакте-

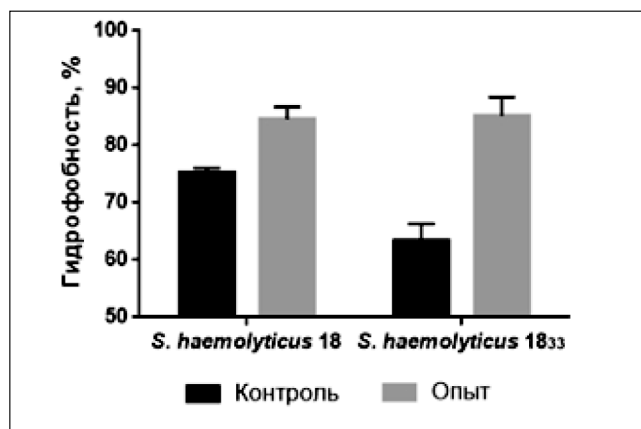


Рис. 7. Влияние сорбции препарата «СА» бактериями *S. haemolyticus* 18 (1) и *S. haemolyticus* 18₃₃ (2) на уровень гидрофобности клеточных поверхностей. Контроль — исходный уровень; опыт — после связывания с «СА» (1 или 33 мкг/мл).

рий *S. haemolyticus* 18 и *S. haemolyticus* 18₃₃, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам, к гидрофобной поверхности полистирола. Ранее нами была выявлена способность низкомолекулярных катионных пептидов семейства лантибиотиков варнерина и хоминина снижать сорбционную активность ряда стафилококков, в том числе их метициллинорезистентного штамма, к полистиролу и, тем самым, отрицательно влиять на формирование и рост бактериальных плёнок [33] на поверхностях этого полимера.

Важно отметить, что относительно меньший уровень сорбции препарата «СА» клетками производного штамма *S. haemolyticus* 18₃₃, не отражающийся на его чувствительности к СА, может быть обусловлено рядом обстоятельств, которые возникают при появлении устойчивости стафилококков к ванкомицину. Это, как известно, обусловлено снижением метаболической активности бактерий и утолщением их клеточных стенок [34]. Известно, что важными характеристиками полученных лабораторной селекцией ванкомициноустойчивых стафилококков являются снижение общего отрицательного заряда клеток [35] и изменение степени

гидрофобности их поверхностей [36], что придаёт им устойчивость к гидрофобным катионным соединениям, таким как липопептидный антибиотик даптомицин и лантибиотики варнерин и хоминин.

Результаты выполненных исследований позволяют констатировать, что низкомолекулярный катионный пептид хоминин и новый антибактериальный препарат «СА» эффективно подавляют развитие биоплёнок клинического изолята стафилококков штамма *S. haemolyticus* 18 и его производного штамма *S. haemolyticus* 18₃₃ при концентрациях, равных минимальным подавляющим рост планктонных культур этих бактерий, и синергидно влияют на формирование их биоплёнок при совместном использовании.

Механизм сочетанного действия «СА» и хоминина требует более детального изучения. Тем не менее, результаты проведённых исследований позволяют предполагать, что быстрое неспецифическое связывание молекул «СА», имеющих в своём составе ионы металла, с поверхностью стафилококков приводит к значительным изменениям электростатических свойств их поверхностей и повышает степень гидрофобности атакуемых бактериальных клеток, что во многом одновременно способствует возрастанию чувствительности бактерий к низкомолекулярному катионному пептиду хоминину. Синергизм комбинированного использования этих соединений может быть использован для профилактики распространения формирующих плёнки стафилококков, в том числе, обладающих множественной резистентностью к антибиотикам, что может быть особенно полезно при местной деколонизационной терапии.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН в рамках Госзадания по теме «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды», регистрационный номер: АААА-А19-119112290009-1 и теме «Разработка методов синтеза новых азотсодержащих гетероциклических систем», регистрационный номер: АА-АА-А18-033090090-0.

ЛИТЕРАТУРА

- Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. Микробные биоплёнки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск: ВГМУ: 2017. — 300 с. / Okulich V.K., Kabanova A.A., Plotnikov F.V. Mikrobnye bioplenki v klinicheskoy mikrobiologii i antibakterial'noy terapii. Vitebsk: VGMU: 2017; 300. [in Russian]
- Shrestha L.B., Bhattarai N.R., Khanal B. Comparative evaluation of methods for the detection of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci and correlation with antibiogram. Infect Drug Resist 2018; 11: 607–613.
- Wojtyczka R.D., Orlewska K., Kepa M., Idzik D., Dziedzic A., Mularz T. et al. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from a hospital environment. Int J Environ Res Public Health 2014; 11: 5: 4619–4633.
- Тец В.В., Тец Г.В. Микробные биоплёнки и проблемы антибиотикотерапии. Атмосфера. Пульмонология и аллергология. — 2013. — № 4. — С. 60–64. / Tets V.V., Tets G.V. Mikrobnye bioplenki i problemy antibiotikoterapii. Atmosfera. Pul'monologiya i allergologiya 2013; 4: 60–64. [in Russian]
- Lebeaux D., Ghigo J.-M., Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. Microbiol Mol Biol Rev 2014; 78: 3: 510–543.
- Михайловский А.Г., Погорелова Е.С., Першина Н.Н., Махмудов Р.Р., Новикова В.В. Синтез, аналгетическая, антигипоксическая и противомикробная активность (2)-(2-арилгидразон)-2-(3,3-диметил-3,4-дигидроизохинолин-1-ил)ацетамидов. Химико-фармацевтический журнал. — 2019. — Т. 53. — № 11. — С. 25–29. / Mikhajlovskij A.G., Pogorelova E.S., Pershina N.N., Makhmudov R.R., Novikova V.V. Sintez, anal'geticheskaya, antigipoksicheskaya i protivomikrobnaya aktivnost' (2)-(2-arilgidrazono)-2-(3,3-dimetil-3,4-digidroizokhinolin-1-il)atsetamidov. Khimiko-farmatsevticheskij zhurnal 2019; 53: 11: 25–29. [in Russian]
- Шкляев Ю.В. Синтез алкалоидов изохинолинового ряда. Бутлеровские сообщения. — 2002. — № 7. — С. 21–34. / Shklyayev Yu.V. Sintez alkaloidov izokhinolinovogo ryada. Butlerovskie soobshcheniya 2002; 7: 21–34. [in Russian]
- Шкляев Ю.В. Изохинолиновые алкалоиды *Amaryllidaceae*. Часть 1. Криановые алкалоиды (обзор литературы). Вестник Пермского университета. Химия. — 2012. — Т. 4. — № 8. — С. 25–46. / Shklyayev Yu.V. Izokhinolinovye alkaloidy Amaryllidaceae. Chast' 1. Krinanovye

- alkaloidy (obzor literatury). Vestnik Permskogo universiteta. Khimiya 2012; 4: 8: 25–46. [in Russian]
9. Пьянков И.А., Кононова Л.И., Коробов В.П., Смоляк А.А., Шкляев Ю. В. Изучение антибактериального эффекта комбинаций низкомолекулярных катионных пептидов и нового соединения «СА» на основе изохинолина. Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология. — 2018. — № 4. — С. 59–73. / Pyankov I.A., Kononova L.I., Korobov V.P., Smolyak A.A., Shklyayev Yu. V. Izuchenie antibakterial'nogo efekta kombinatsij nizkomolekulyarnykh kationnykh peptidov i novogo soedineniya «SA» na osnove izokhinolina. Vestnik PNIPU. Khimicheskaya tekhnologiya i biotekhnologiya 2018; 4: 59–73. [in Russian]
 10. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В., Акименко В.К. Выделение и характеристика нового низкомолекулярного антибактериального пептида семейства лантибиотиков. Микробиология. — 2010. — Т. 79. — № 2. — С. 228–238. / Korobov V.P., Lemkina L.M., Poljudova T.V., Akimenko V.K. Vydelenie i kharakteristika novogo nizkomolekulyarnogo antibakterial'nogo peptida semejstva lantibiotikov. Mikrobiologiya 2010; 79: 2: 228–238. [in Russian]
 11. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В. Антибактериальный пептид хоминин klp-1 широкого спектра действия. Патент РФ 2528055 С2, 2014. / Korobov V.P., Lemkina L.M., Poljudova T.V. Antibakterial'nyj peptid khominin klp-1 shirokogo spektra dejstviya. Patent RF 2528055 S2, 2014. [in Russian]
 12. Kononova L.I., Korobov V.P. Physiological properties of the vancomycin-resistant strain *Staphylococcus epidermidis* 33 GISK VANR. Microbiology 2015; 84: 1: 41–48.
 13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. M100-S17, 27: 1; 2007.
 14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard — ninth edition. M07-A9, 32: 2; 2012.
 15. Hernandez C., Coppede J.da.S., Bertoni B.W., Franca S.deC., Pereira A.M.S. Flash microbiocide: a rapid and economic method for determination of MBC and MFC. Am J Plant Sci 2013; 4: 850–852.
 16. Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett 1980; 9: 29–33.
 17. Orhan G., Bayram A., Zer Y., Balci I. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. J Clin Microbiol 2005; 43: 1: 140–143.
 18. Hallander H.O., Dornbusch K., Gezelius L., Jacobson K., Karlsson I. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. Antimicrob Agents Chemother 1982; 22: 5: 743–752.
 19. Williamson E.M. Synergy and other interactions in phytomedicines. Phytomedicine 2001; 8: 5: 401–409.
 20. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Defin. Doc. E.Def 1.2, 6: 503–508; 2000.
 21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. M26-A, 19: 18; 1999.
 22. Peterson L.R., Shanholtzer C.J. Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. Clin Microbiol Rev 1992; 5: 4: 420–432.
 23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. M100-S24, 34: 1; 2014.
 24. Singh N., Mishra N. Synergistic and antagonistic action of antibiotics against biofilm forming *Staphylococcus aureus*. Asian J Plant Sci 2012; 2: 3: 350–354.
 25. Zhao L., Au J.L.-S., Wientjes M.G. Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. Front Biosci (Elite Ed) 2010; 2: 241–249.
 26. Дембицкий В.М., Толстиков Г.А. Природные хлорсодержащие алкалоиды. Химия в интересах устойчивого развития. — 2001. — № 9. — С. 169–181. / Dembitskij V.M., Tolstikov G.A. Prirodnye khlor-soderzhashchie alkaloidy. Khimiya v interesakh ustojchivogo razvitiya 2001; 9: 169–181. [in Russian]
 27. Уткина Н.К. Морские Алкалоиды. Вестник ДВО РАН. — 2004. — № 3. — С. 66–75. / Utkina N.K. Morskie Alkaloidy. Vestnik DVO RAN 2004; 3: 66–75. [in Russian]
 28. Рогоза Л.Н., Салахутдинов Н.Ф., Толстиков Г.А. Растительные алкалоиды — производные полиметиленаминов. Усп Хим. — 2005. — Т. 74. — № 4. — С. 411–427. / Rogoz L.N., Salakhutdinov N.F., Tolstikov G.A. Rastitel'nye alkaloidy — proizvodnye polimetilennaminov. Usp Khim 2005; 74: 4: 411–427. [in Russian]
 29. Wojtyczka R.D., Dziedzic A., Kepa M., Kubina R., Kabala-Dzik A., Mularz T. et al. Berberine enhances the antibacterial activity of selected antibiotics against coagulase-negative staphylococcus strains *in vitro*. Molecules 2014; 19: 5: 6583–6596.
 30. Бакирова Р.Е., Фазылов С.Д., Нуркенов О.А., Муравлева Л.Е., Кулаков И.В., Ахметова С.Б. Новые гетероциклические производные алкалоида анабазина и их антимикробные свойства. Успехи современного естествознания. — 2014. — № 5. — С. 20–24. / Bakirova R.E., Fazyllov S.D., Nurkenov O.A., Muravleva L.E., Kulakov I.V., Akhmetova S.B. Novye geterotsiklicheskie proizvodnye alkaloida anabazina i ikh antimikrobnnye svoystva. Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya 2014; 5: 20–24. [in Russian]
 31. Khan A.Y., Kumar G.S. Natural isoquinoline alkaloids: binding aspects to functional proteins, serum albumins, hemoglobin, and lysozyme. Biophys Rev 2015; 7: 4: 407–420.
 32. Basu A., Kumar G.S. Nucleic acids binding strategies of small molecules: lessons from alkaloids. Biochim Biophys Acta — Gen. Subj 2018; 1862: 9: 1995–2016.
 33. Eroshenko D.V., Korobov V.P. New AMPs from *Staphylococcus* spp., warnerin and hominin, reduce *Staphylococcus epidermidis* adhesion and biofilm formation. In: A. Mendez-Vilas; editor. Multidisciplinary approach for studying and combating microbial pathogens. Brown Walker Press; 2015. p. 98–101.
 34. Sieradzki K., Tomasz A. Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1997; 179: 8: 2557–2566.
 35. Nishi H., Komatsuzawa H., Fujiwara T., McCallum N., Sugai M. Reduced content of lysyl-phosphatidylglycerol in the cytoplasmic membrane affects susceptibility to moenomycin, as well as vancomycin, gentamicin, and antimicrobial peptides, in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 12: 4800–4807.
 36. Pfeltz R.F., Singh V.K., Schmidt J.L., Batten M.A., Baranyk C.S., Nadakavukaren M.J. et al. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2: 294–303.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кононова Людмила Ивановна — ведущий инженер лаборатории биохимии развития 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»), Пермь

Пьянков Иван Алексеевич — студент, кафедра химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета, Пермь

Смоляк Андрей Алексеевич — к. х. н., «Института технической химии Уральского отделения Российской академии наук» — филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИТХ УрО РАН»), Пермь

Шкляев Юрий Владимирович — д. х. н., профессор, зав. лабораторией синтеза активных реагентов «Института технической химии Уральского отделения Российской академии наук» — филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИТХ УрО РАН»), Пермь

Коробов Владимир Павлович — к. м. н., доцент кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета, зав. лабораторией биохимии развития 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»), Пермь