

УДК 579.22

Л. Ю. Нестерова^a, А. Г. Ткаченко^{a,b}, О. Н. Писцова^b

^a Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

^b Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВОМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ (+)-EROGORGIANE

Исследованы антибактериальная активность и возможные механизмы действия химически синтезированного соединения (+)-erogorgiane, аналога природного антибиотика, выделенного из морских кораллов *Pseudopterogorgia elisabethae*. Показано, что оно обладает бактерицидной активностью по отношению к *Mycobacterium smegmatis* как в логарифмической фазе роста культуры, так и в стационарной. С увеличением времени воздействия снижается концентрация, вызывающая полную гибель клеток в культуре. Эффект (+)-erogorgiane проявляется также по отношению к нерастущим клеткам *M. smegmatis*, которые являются более устойчивыми к действию антибиотиков рифампицина, изониазида и левофлоксацина, традиционно используемых для лечения туберкулеза. В то же время грамотрицательный микроорганизм *Escherichia coli* показал высокую устойчивость к данному препарату. Обнаружено концентрационно-зависимое подавление биоценообразования *M. smegmatis* в присутствии (+)-erogorgiane. Ингибирующее действие оказывали как сублетальные, так и субингибиторные концентрации препарата, которые не оказывали влияние на рост культуры и не вызывали гибели клеток. С помощью атомно-силовой микроскопии установлено влияние (+)-erogorgiane на поверхностные структуры клетки: под действием сублетальных концентраций антибиотика увеличивается шероховатость клеточной поверхности. Получить мутантов, устойчивых к действию антибиотика высевом на твердую среду, содержащую препарат в высокой концентрации, не удалось.

Ключевые слова: erogorgiane; антибиотик; *Mycobacterium smegmatis*; биоценозы.

L. Yu. Nesterova^a, A. G. Tkachenko^{a,b}, O. N. Pistsova^b

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

STUDY OF THE (+)-EROGORGIANE ANTIMICROBIAL ACTION MECHANISMS

The antibacterial activity of a chemically synthesized counterpart of natural antibiotic (+) - erogorgiane extracted from marine coral *Pseudopterogorgia elisabethae* was studied. This substance has been shown to have bactericidal effect against *Mycobacterium smegmatis* culture in both logarithmic and stationary growth phases. At the same time, gram negative *Escherichia coli* is resistant to this compound. The concentration-dependent inhibition of *M. smegmatis* biofilm formation under sublethal antibiotic action has been observed. The effect of the test compound on the cell surface structure was detected with atomic force microscopy. The attempts to obtain antibiotic resistant mutants on agar media with high antibiotic concentrations failed.

Key words: erogorgiane; antibiotic; *Mycobacterium smegmatis*; biofilms.

Туберкулез, вызываемый *Mycobacterium tuberculosis*, уже в течение многих десятилетий остается одной из главных проблем здравоохранения, являясь причиной более чем миллиона смертей ежегодно [WHO Global Tuberculosis Report, 2015]. Наиболее существенной проблемой, препятствующей эффективному лечению туберкулеза, является быстрое появление антибиотикорезистентных форм возбудителя.

Особую тревогу вызывает распространение штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, которое делает существующие методы лечения

неэффективными [Migliori, Sotgiu, Gandhi et al, 2013]. Лечение лекарственно устойчивых форм туберкулеза, как правило, является дорогостоящим и предусматривает использование высокотоксичных препаратов с многочисленными побочными эффектами. В связи с этим актуальным является поиск новых эффективных противотуберкулезных средств.

В последние годы внимание исследователей привлекли морские кораллы *Pseudopterogorgia elisabethae*, обитающие в Карибском море и продуцирующие необычные соединения, обладающие

фармакологической активностью. Ранее было обнаружено, что соединение дитерпеновой природы (+)-erogorgiane, выделенное из этих организмов, обладает противотуберкулезной активностью [De Souza, 2006], однако, изучение его биологических свойств не проводилось в связи с трудностями его выделения из морских кораллов. Следует отметить, что данное соединение по своей структуре значительно отличается от используемых в клинической практике антибиотиков различных классов. Исходя из этого, можно предполагать, что (+)-erogorgiane имеет принципиально иной способ воздействия на бактерии.

Поскольку для оценки возможности дальнейшего использования данного вещества в качестве лекарственного средства необходимо понимание механизмов действия антибиотика, целью данной работы является изучение антибактериальной активности и возможных механизмов противомикробного действия искусственно синтезированного соединения (+)-erogorgiane, которое является аналогом природного вещества, выделенного из морских кораллов.

Для изучения биологической активности и механизмов антибактериального действия (+)-erogorgiane в качестве объекта исследования выбран микроорганизм *Mycobacterium smegmatis*, близкий к *M. tuberculosis*, в то же время непатогенный и быстрорастущий и потому широко используемый в качестве модельного объекта при исследованиях физиологии возбудителя туберкулезной инфекции.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали штамм *Mycobacterium smegmatis* mc²155, который сохраняли на чашке Петри с LB агаром (Sigma), культивировали на среде Middlebrook 7H9 (Difco) с добавлением 0.005% Tween 80 при 37°C, 200 об/мин и штамм *Escherichia coli* GC 4468, который сохраняли на скошенном LB агаре и культивировали на глюкозо-минеральной среде M9 в термостатируемом шейкере GFL 1092 (Германия) 37°C, 100 об/мин.

Для определения антибиотикочувствительности полученный инокулят разводили свежей средой до оптической плотности (ОП) 0.1 ($\lambda=600\text{nm}$), доращивали в указанных условиях до нужной стадии роста и помещали 180 мкл культуры в лунки полистиролового 96-луночного планшета, куда добавляли 20 мкл раствора антибиотика нужной концентрации и тщательно перемешивали. Культивировали без перемешивания (время культивирования указано на графиках). По окончании культивирования количество живых клеток определяли с помощью подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) после высева проб на чашки Петри с LB агаром.

Для определения влияния антибиотика на био-

пленкообразование *M. smegmatis* выращенную в течение 24 ч. культуру откручивали на центрифуге, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали в свежей среде Middlebrook 7H9 (Difco) без добавления Tween 80, доводя до ОП 0.1, затем разводили ещё в 10 раз и помещали в лунки планшета. Культивировали в термостате при 37°C без встряхивания. Через 48 ч. из лунок осторожно удаляли планктонную культуру, поверхностную пленку высушивали и фотографировали. Для определения количества КОЕ в соответствующих пробах производили аналогичный посев на среду, содержащую 0.005% Tween 80, затем готовили десятикратные разведения и делали высевы на LB агар.

Профили поверхности клеток изучали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) с использованием совмещенной системы сканирования, состоящей из атомно-силового микроскопа Asylum MFP-3D-BIO (Asylum Research, США) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FV1000, (Olympus Corporation, Япония). Сканирование осуществляли в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50–90 кГц и константой жесткости 0.5–4.4 Н/м. Для характеристики структуры поверхности клеток (шероховатость Sq, индекс I) получали двух- и трехмерные топографические изображения бактерий. Обработку микрофотографий проводили с помощью программы Igor Pro 6.22A (WaveMetrics, США).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакета стандартных программ Statistica 6.0 ("StatSoft Inc.", 2001). Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования была проведена оценка характера и интенсивности антибактериального действия исследуемого вещества. Показано, что (+)-erogorgiane обладает бактерицидным действием по отношению к *M. smegmatis*. При этом с увеличением времени воздействия снижается концентрация, которая вызывает полную гибель клеток в культуре (рис. 1А). При более подробной раститровке исследуемого препарата удалось установить концентрации, которые оказывают сублетальное действие, т.е. снижают количество клеток, не вызывая полной гибели культуры (рис. 1В). Однако разница между суббактериостатическими концентрациями, которые не оказывают влияния на количество клеток, и бактерицидными концентрациями была невелика. Данные концентрации отличались менее чем в 2 раза (рис. 1В). Следует отметить, что бактерицидный эффект исследуемого препарата проявлялся как по отношению к культуре, находящейся в логарифмической фазе роста, так в стационарной (рис. 1С), которая в большинстве случаев является более резистентной

к действию различных неблагоприятных факторов, в том числе антибактериальных препаратов [Leisner, Jorgensen, Middelboe, 2016].

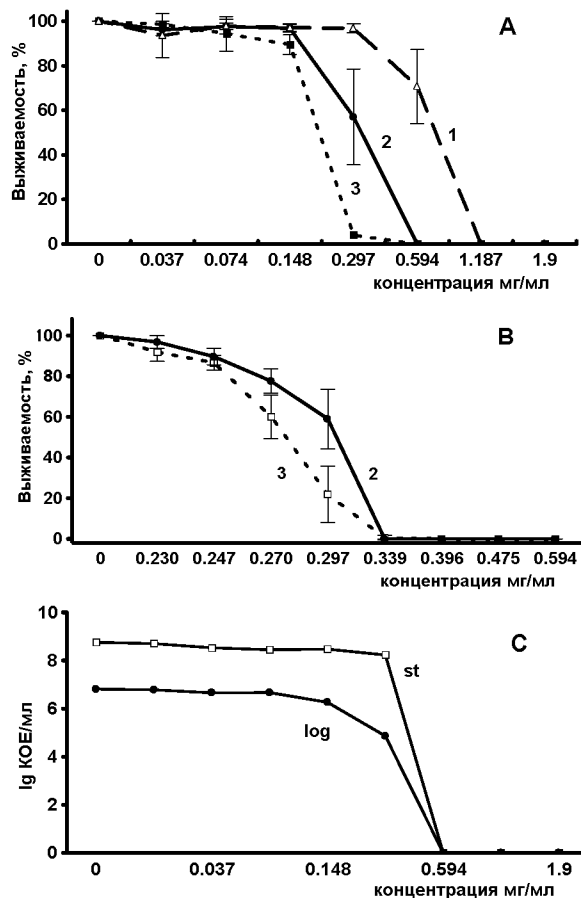


Рис. 1. Бактерицидное действие антибиотика на культуру *Mycobacterium smegmatis*.

Антибиотик добавляли в культуру в логарифмической (А, В, С) и стационарной (С) фазе роста. Экспозиция с антибиотиком 1 – 5 ч.; 2, С – 24 ч.; 3 – 48 ч.

Эффект антибиотика проявлялся также по отношению к нерастущим клеткам, которые были помещены в буфер и после этого подвергнуты действию антибиотика. Такие клетки являются более устойчивыми к действию антибиотиков. Традиционные антибиотики, применяемые для лечения туберкулеза, такие как изониазид, рифампицин и левофлоксацин, в аналогичных условиях не приводили к полной гибели культуры. Более того, в культуре, взятой в стационарной фазе роста, изониазид практически не имел эффекта на количество клеток, а рифампицин снижал число клеток на 2 порядка (рис. 2). В этом эксперименте мы использовали концентрации антибиотиков, которые намного превышают терапевтические и в 100 раз превышают концентрации, которые препятствуют росту культуры (МПК). Таким образом, (+)-erogorgiane, в отличие от традиционных антибиотиков, способен не только препятствовать размножению микобактерий, но и полностью убивать клетки вне зависимости от стадии роста культуры,

препятствуя образованию персистерных форм микобактерий.

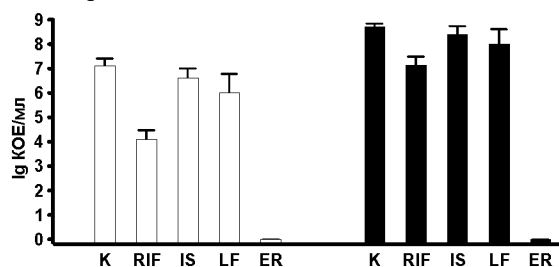


Рис. 2. Действие антибиотиков на нерастущую культуру *M. smegmatis*.

Антибиотики добавляли в культуру *M. smegmatis*, взятую из логарифмической (светлые столбцы) и стационарной (черные столбцы) фазы роста, отмытую от питательной среды и ресуспендированную в PBS, буфере. Экспозиция 24 ч.

К – контроль без добавки антибиотика; RIF – рифампицин (488 мкг/мл); IS – изониазид (488 мкг/мл); LF – левофлоксацин (63 мкг/мл); ER – (+)-erogorgiane (399 мкг/мл)

Грамотрицательный микроорганизм *Escherichia coli*, в свою очередь, оказался совершенно нечувствительным к исследуемому антибиотику. Нам не удалось обнаружить не только бактерицидного, но также и бактериостатического эффекта ни в одной из исследованных концентраций препарата. Исходя из этого, можно предположить, что мишень для действия (+)-erogorgiane специфична для грамположительных микроорганизмов, а возможно, для микобактерий. Несмотря на то, что действие исследуемого соединения на культуру *E. coli* не сопровождается гибелью клеток, нами был обнаружен отклик некоторых генов, ответственных за адаптацию этого микроорганизма к стрессовым условиям на его действие (данные не показаны). Данный подход будет использован для дальнейшей работы по расшифровке механизма действия антибиотика.

Следующий этап исследований был посвящен оценке влияния (+)-erogorgiane на способность *M. smegmatis* к биопленкообразованию. Известно, что микроорганизмы в составе биопленок значительно более устойчивы к действию антибиотиков и иммунной системы хозяина [Syal, Maiti, Naresh et al., 2016]. Хотя роль биопленкообразования в патогенезе микобактерий остается неясной, многие их виды способны формировать биопленки [Arai, Niikawa, Kobayashi, 2013].

Установлено, что присутствие (+)-erogorgiane подавляет биопленкообразование *M. smegmatis* (рис. 3). Ингибирующее действие оказывали как сублетальные, так и субингибиторные концентрации препарата, которые не имели эффекта на рост культуры и не вызывали гибели клеток (рис. 3). Влияние исследуемого препарата на биопленкообразование может осуществляться посредством различных механизмов, поскольку процесс формиро-

вания биопленок у микобактерий регулируется множеством факторов [Sharma, Petchiappan, Chatterji, 2014]. Одним из возможных механизмов является изменение поверхностных структур клетки, которое, в свою очередь, влияет на способность бактерий формировать биопленки [Aguayo, Bozec, 2016].

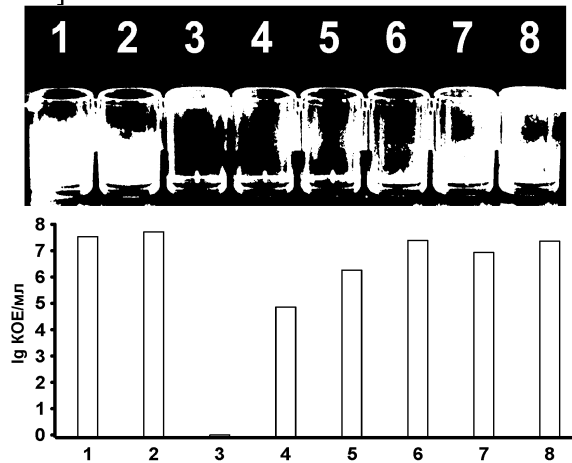


Рис. 3. Влияние (+)-erogorgiane на биопленкообразование *M. smegmatis*.

На фото поверхностная биопленка после высушивания. Столбики диаграммы отображают количество КОЕ в лунках, соответствующих лункам на фото, с добавлением Tween 80.

Концентрация антибиотика: 1; 2 – контроль без антибиотика, 3 – 0,594 мг/мл; 4 – 0,297; 5 – 0,148 мг/мл; 6 – 0,074 мг/мл; 7 – 0,037 мг/мл; 8 – 0,019 мг/мл

Отсутствие действия препарата на клетки грамотрицательных *E. coli* свидетельствует о том, что возможной мишенью для действия антибиотика является клеточная стенка грамположительных бактерий. В пользу этого предположения также свидетельствуют и данные, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии. Установлено, что под действием сублетальных концентраций (+)-erogorgiane происходит статистически достоверное возрастание шероховатости поверхности клеток *M. smegmatis* по отношению к контролю (таблица).

Изменение шероховатости клеточной поверхности под действием антибиотика

Вариант опыта	Шероховатость Sq, нм
Контроль	153.8 (± 7.5)
Сублетальная концентрация (+)-erogorgiane (0,297 мг/мл)	217.0 (± 21.6) *

Приведены средние значения шероховатости $\pm \sigma$.

*- статистически значимое отличие от контроля без добавки антибиотика. Достоверность различий определяли с помощью критерия Ньюмена-Кейлса.

Предполагалось, что следующим этапом работы должен стать анализ мутантов, устойчивых к действию (+)-erogorgiane. Однако наши попытки получить устойчивые клоны высевам большого

количества клеток на твердую среду, содержащую высокие концентрации препарата [Kern, Oethinger, Jellen-Ritter, et al. 2000], не дали результатов. Возможно, это связано с особенностями действия данного антибиотика. Можно предположить, что мутаций в одном или двух генах недостаточно, чтобы микроорганизм стал нечувствителен к данному соединению, как это имеет место в отношении других антибиотиков [McMurry, McDermott, Levy, 1999; Telenti, Honore, Bernasconi et al., 1997].

Заключение

Таким образом, искусственно синтезированный аналог природного антибиотика (+)-erogorgiane оказывает бактерицидное действие на клетки *M. smegmatis* независимо от стадии роста культуры, а также на нерастущие клетки. Данное вещество в сублетальных концентрациях препятствует образованию биопленок микобактериями.

Несмотря на то, что на данном этапе исследований нельзя точно указать конкретный механизм действия (+)-erogorgiane на клетки микобактерий, нами установлено, что его действие приводит к изменению поверхностных структур клеток.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 15-13-00092).

Библиографический список

- Aguayo S., Bozec L. Mechanics of bacterial bells and initial surface colonisation // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016. Vol. 915. P. 245–260.
- Arai M., Niikawa H., Kobayashi M. Marine-derived fungal sesterterpenes, ophiobolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species // *Journal of Natural Medicines*. 2013. Vol. 67, № 2. P. 271–275.
- De Souza M.V.N. Marine natural products against tuberculosis // *The Scientific World Journal*. 2006. Vol. 21, № 6. P. 847–861.
- Kern W.V., Oethinger M., Jellen-Ritter A.S., Levy S.B. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000. Vol. 44, № 4. P. 814–820.
- Leisner J.J., Jorgensen N.O., Middelboe M. Predation and selection for antibiotic resistance in natural environments // *Evolutionary Applications Journal*. 2016. Vol. 9, № 3. P. 427–434.
- McMurry L.M., McDermott P.F., Levy S.B. Genetic evidence that *InhA* of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999. Vol. 43, № 3. P. 711–713.
- Migliori G.B., Sotgiu G., Gandhi N.R. et al. Drug resistance beyond extensively drug-resistant tuberculosis: individual patient data meta-analysis // *European Respiratory Journal*. 2013. Vol. 42, № 1. P. 169–179.
- Sharma I.M., Petchiappan A., Chatterji D. Quorum sensing and biofilm formation in mycobacteria: role

of c-di-GMP and methods to study this second messenger // *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 2014. Vol. 66, № 12. P. 823–834.

Syal K., Maiti K., Naresh K. et al. Synthetic arabinomannan glycolipids impede mycobacterial growth, sliding motility and biofilm structure // *Glycoconjugate Journal*. 2016. № 4.

Telenti A., Honoré N., Bernasconi C. et al. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level // *Journal of Clinical Microbiology*. 1997. Vol. 35, № 3. P. 719–723.

World Health Organisation. Global Tuberculosis report 2015. France, 2015. 192 p.

References

Aguayo S., Bozec L. Mechanics of bacterial cells and initial surface colonization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. V. 915 (2016): pp. 245–260.

Arai M., Niikawa H., Kobayashi M. Marine-derived fungal sesterterpenes, ophiobolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species. *Journal of Natural Medicines*. V. 67 No. 2 (2013): pp. 271–275.

De Souza M.V.N. Marine natural products against tuberculosis. *The Scientific World Journal*. V. 21 No. 6 (2006): pp. 847–861.

Kern W.V., Oethinger M., Jellen-Ritter A., Levy S.V. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V. 44 No. 4 (2000): pp. 814–820.

Leisner J.J., Jorgensen N.O., Middelboe M. Predation

and selection for antibiotic resistance in natural environments. *Evolutionary Applications Journal*. V. 9 No. 3 (2016): pp. 427–434.

McMurry L.M., McDermott P.F., Levy S.B. Genetic evidence that InhA of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V. 43 No. 3 (1999): pp. 711–713.

Migliori G.B., Sotgiu G., Gandhi N.R., Falzon D., DeRiemer K. Drug resistance beyond extensively drug-resistant tuberculosis: individual patient data meta-analysis. *European Respiratory Journal*. V. 42 No. 1 (2013): pp. 169–179.

Sharma I.M., Petchiappan A., Chatterji D. Quorum sensing and biofilm formation in mycobacteria: role of c-di-GMP and methods to study this second messenger. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. V. 66 No. 12 (2014): pp. 823–834.

Syal K., Maiti K., Naresh K., Avaji P.G., Chatterji D., Jayaraman N. Synthetic arabinomannan glycolipids impede mycobacterial growth, sliding motility and biofilm structure. *Glycoconjugate Journal*. No. 4 (2016).

Telenti A., Honoré N., Bernasconi C., March J., Ortega A., Heym B., Takiff H.E., Cole S.T. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 35 No. 3 (1997): pp. 719–723.

World Health Organisation. Global Tuberculosis report 2015. France, 2015. 192 p.

Поступила в редакцию 30.08.2016

Об авторах

Нестерова Лариса Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН 614081, Пермь, ул. Голева, 13; larisa.nesterova@bk.ru; (342)2122159

Ткаченко Александр Георгиевич, доктор медицинских наук, зав. лабораторией адаптации микроорганизмов ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН 614081, Пермь, ул. Голева, 13; agtkachenko@iegm.ru профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Писцова Ольга Николаевна, инженер кабинета микроскопии Rhodococcus-центр ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614990, Пермь, ул. Букирева, 15; pistsova@gmail.com

About the authors

Nesterova Larisa Yurievna, candidate of biology, senior scientist of the laboratory of microorganisms adaptation Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; larisa.nesterova@bk.ru; (342)2122159

Tkachenko Alexander Georgievich, head of the laboratory of microorganisms adaptation Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; agtkachenko@iegm.ru; (342)2122159 professor, Department of Microbiology and immunology Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

Pistsova Olga Nikolaevna, Engineer of microscopy's office Rhodococcus-centre Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990 pistsova@gmail.com