

УДК 577.15; 615.281.9

## ВОЗМОЖНОСТИ СНИЖЕНИЯ МИНИМАЛЬНЫХ ИНГИБИРУЮЩИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПУРОМИЦИНА И ЦЕФТИОФУРА ПРИ ИХ СОЧЕТАНИИ С БИОПРЕПАРАТАМИ НА ОСНОВЕ His<sub>6</sub>-ОРН

О.В. Маслова\*, А.Г. Асланлы, О.В. Сенько, Е.Н. Ефременко

(Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; \*e-mail: olga.maslova.rabota@gmail.com)

Ферменты, гидролизующие сигнальные молекулы кворумного ответа бактерий-патогенов, позволяют влиять на численность и устойчивость их популяций. Сочетание таких ферментов с антибиотиками может рассматриваться как один из путей решения проблемы регулирования развития антибиотикорезистентности. В температурном диапазоне 25–41 °С в присутствии пурамицина и цефтиофура (0,2 г/л) отмечалась стабилизация лактоназной активности His<sub>6</sub>-ОРН. На моделях, полученных в результате проведения молекулярного докинга антибиотиков к поверхности димера His<sub>6</sub>-ОРН, наблюдалось связывание антибиотиков, как с активным центром фермента, так и с областью соединения двух моносубъединиц в димере, что, возможно, и приводит к стабилизации фермента. Присутствие ферментных препаратов способствовало снижению величин минимальной ингибирующей концентрации пурамицина и цефтиофура, оказывающей влияние на рост высококонцентрированных (10<sup>6</sup> клеток/мл) клеточных популяций *Pseudomonas aeruginosa* В-6643 и *Escherichia coli* В-6645.

**Ключевые слова:** гексагистидинсодержащая органофосфатгидролаза, антибиотик, пурамицин, цефтиофур, минимальная ингибирующая концентрация.

Распространение патогенных грамотрицательных микроорганизмов, проявляющих резистентность к действию широкого спектра антимикробных препаратов, представляет собой серьезную проблему. Повышенную устойчивость к воздействию различных факторов (температуры, рН, концентрации антимикробных агентов, ферментов, токсинов и пр.) проявляют бактерии, находящиеся в состоянии высококонцентрированных клеточных популяций, формирование которых предопределяется наличием у бактерий механизма «кворумного ответа» (Quorum Sensing). Поиск решений, позволяющих эффективно контролировать формирование бактериальных популяций, устойчивых к воздействию антибиотиков, представляет собой актуальную задачу [1].

У большинства видов грамотрицательных бактерий (распространенных возбудителей болезней животных и растений) обнаружены кворум-зависимые системы, в которых сигнальными молекулами формирования кворумного ответа служат различные N-ацилгомосеринлактоны [2].

Известно, что некоторые ферменты, относящиеся к классу АГЛ-лактоназ, способны разрушать АГЛ путем раскрытия лактонного кольца [3]. Такой фермент, как гексагистидинсодержащая орга-

нофосфатгидролаза (His<sub>6</sub>-ОРН) проявляет лактоназную активность по отношению к ряду АГЛ [4]. При этом у His<sub>6</sub>-ОРН по сравнению с природными лактоназами не только выше лактоназная активность по отдельным субстратам, но и существенно шире спектр субстратного действия. Фермент одинаково эффективно катализировал гидролиз различных по строению N-ацилгомосеринлактонов, содержащих и не содержащих 3-оксо-группу в ацильном радикале [5].

Известна возможность стабилизации активности His<sub>6</sub>-ОРН в составе ферментных препаратов за счет формирования ферментных полиэлектролитных комплексов (ФПК). При этом установлено, что для сохранения высокой каталитической активности наиболее удачными «партнерами» рекомбинантного фермента His<sub>6</sub>-ОРН в составе ФПК являются полианины [6].

Установлено, что в присутствии ферментных препаратов His<sub>6</sub>-ОРН у ряда антибиотиков (ампициллин, гентамицин, канамицин, рифампицин) снижается минимальная ингибирующая концентрация (МИК) для высококонцентрированных (10<sup>6</sup> кл./мл) клеточных популяций *Pseudomonas aeruginosa* В-6643 и *Escherichia coli* В-6645 [5]. Кроме того, в некоторых случаях наличие анти-

биотиков в среде с ферментным препаратом на основе His<sub>6</sub>-ОРН может способствовать стабилизации активности самого фермента [7].

В данной работе исследованы возможности сочетания используемых в ветеринарии антибиотиков пуринового ряда (пуромидин) и цефалоспоринового ряда (цефтиофур) с биопрепаратами на основе фермента His<sub>6</sub>-ОРН для снижения эффективных доз антимикробных агентов. Проведен молекулярный докинг и выполнены практические исследования с участием высококонцентрированных (10<sup>6</sup> кл./мл) клеточных популяций *Pseudomonas aeruginosa* В-6643 and *Escherichia coli* В-6645.

### Экспериментальная часть

Для получения фермента His<sub>6</sub>-ОРН использовали рекомбинантные клетки *Escherichia coli* SG13009[pREP4] («Qiagen», «Hilden», Германия) с плазмидой, кодирующей этот фермент [8]. Для культивирования клеток, выделения и очистки фермента использовали известные методы [9, 10]. Определение концентрации белка проводили методом Бредфорд. Степень чистоты фермента, составляющая 98%, контролировалась электрофоретическим методом, как описано ранее [11]. Определение активности проводили согласно известным методам [7].

Для получения полиэлектролитных комплексов фермента His<sub>6</sub>-ОРН использовали поли-L-глутаминовую кислоту натриевая соль (ПГК<sub>50</sub>, MW = 7,500 Да) и поли-L-аспарагиновую кислоту натриевая соль (ПАК<sub>50</sub>, MW = 6,800 Да) производства «Alamanda Polymers» («Huntsville», США). В работе также применяли антибиотики и другие реактивы производства «Sigma» (США).

Для получения ФПК к раствору высокоочищенного фермента His<sub>6</sub>-ОРН в 0,1 М карбонатном буфере (рН 10,5) (концентрация белка 0,16±0,01 мг/мл, активность 695±15 Ед/мл) добавляли аликвоту раствора ПАК<sub>50</sub> или ПГК<sub>50</sub>, приготовленную в дистиллированной воде в концентрации 20 мг/мл. Объем аликвоты рассчитывали так, чтобы мольное соотношение фермента и полимера составляло 1:5. После этого смесь выдерживали в течение 30 мин при +8 °С.

Клетки *Pseudomonas aeruginosa* В-6643 и *Escherichia coli* В-6645 получены из ВКПМ. Культивирование клеток при рН 7,0 проводили на шейкере «IRC-1-U» («Adolf Kühner AG», Швейцария) при 28 °С и 180 об/мин в колбах Эйрленмейера (750 мл) с 200 мл LB-среды. Концентрацию клеток контролировали при 540 нм, используя Agilent 8453 UV-visible («Agilent Technology», Германия) и калибровочные графики.

Эффективность действия антибиотиков на высококонцентрированные популяции грамотрицательных клеток оценивали по величине МИК антимикробных веществ в отсутствие и присутствии ФПК (12,5 мкг/мл). Определение МИК антибиотиков проводили при экспонировании суспензии клеток бактерий в физиологическом растворе (10<sup>6</sup> кл./мл) с добавками антибиотиков в диапазоне концентраций от 0 до 500 мг/л при 37 °С в течение 16 ч. Для оценки остаточной концентрации живых клеток в исследуемых образцах после экспонирования их в присутствии антимикробного агента определяли концентрацию внутриклеточного АТФ известным люциферин-люциферазным методом [12, 13] с использованием стандартного АТФ-реагента (ООО «Люмтек», Россия). Интенсивность биолюминисценции регистрировали с помощью люцинометра «MicroLuminometr 3560» («New horizons diagnostics Co, MD», США). Для определения МИК проводили линеаризацию полученных данных, как описано ранее, с расчетом достоверности аппроксимации [14].

Молекулярный докинг антибиотиков и обработку результатов проводили согласно известной методике [7]. Бесплатная программа для докинга AutoDock Vina (ver. 1.1.2) [15] применялась с привлечением Intel MPI Library (ver. 5.0.1). При обработке всех экспериментальных данных, полученных как минимум в трех повторностях, рассчитывали средние значения величин и значения стандартного отклонения (±SD). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SigmaPlot (ver. 12.5, «Systat Software Inc.», США).

### Результаты и обсуждения

**Молекулярный докинг антибиотиков к поверхности His<sub>6</sub>-ОРН и исследование термостабильности фермента в растворе с антибиотиками.** Для исследования возможностей сочетания с ферментом His<sub>6</sub>-ОРН были отобраны два антибиотика (пуромидин – антибиотик пуринового ряда и цефтиофур – антибиотик цефалоспоринового ряда), используемые в ветеринарии и относящиеся к разным классам (рис. 1).

Наибольший научный и практический интерес представляет исследование активности фермента, проявляемой при его экспонировании в среде с несколько более низким (7,5) по сравнению с оптимальным (10,5) значением рН среды, но при этом наиболее приближенном к рН физиологических сред живых организмов.

С использованием метода молекулярного докинга антибиотиков к поверхности димера

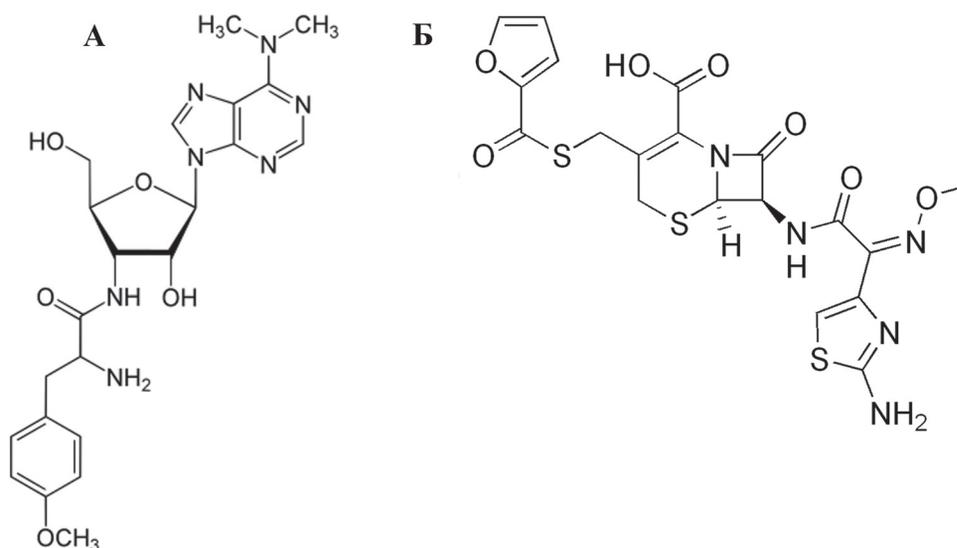


Рис. 1. Структурные химические формулы пуромицина (А) и цефтиофура (Б)

His<sub>6</sub>-ОРН при рН 7,5 и 10,5 получены модели наиболее вероятных вариантов их взаимодействия с ферментом (рис. 2, 3). На моделях видно, что антибиотики связываются с белком непосредственно в области активного центра, а также на других участках поверхности димера, в частности, в местах связывания мономерных субъединиц. Наблюдаемые явления могут свидетельствовать о стабилизации активности фермента в присутствии антибиотиков в реальных средах [7].

Связывание антибиотиков в области соединения двух мономеров димерной молекулы белка может приводить к конформационным изменениям в молекуле фермента, переориентации и/или смещению доступа молекул к активному центру и, как следствие, к стабилизации его активности. При этом для пуромицина по сравнению с цефтиофуром (рис. 2, 3) отмечается большая площадь поверхности связывания в районе соединения субъединиц, что может быть причиной более явного проявления повышения стабильности His<sub>6</sub>-ОРН в присутствии данного антибиотика.

В растворе, содержащем антибиотик и фермент, изучено влияние температуры на каталитические характеристики His<sub>6</sub>-ОРН (рис. 4). Установлено, что при рН 7,5 в температурном диапазоне 25–41 °С через 15 мин экспонирования фермента в присутствии антибиотика (0,2 г/л) сохраняется до 90% (от исходного уровня) лактозной активности.

В присутствии пуромицина или цефтиофура в концентрации 0,2 г/л ингибирующего воздействия данных соединений на фермент отмечено не было.

Более того, в присутствии исследуемых антибиотиков отмечался некоторый стабилизирующий эффект на проявляемую ферментом His<sub>6</sub>-ОРН лактозную активность. Так, при температуре 37 °С остаточная активность His<sub>6</sub>-ОРН в присутствии пуромицина и цефтиофура была соответственно на 3,9±0,05 и 8±0,05% выше по сравнению с ферментом, находящимся в аналогичной среде, но без антибиотиков.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что при использовании пуромицина и цефтиофура совместно с препаратами на основе His<sub>6</sub>-ОРН происходит снижение МИК этих антибиотиков на рост грамотрицательных микроорганизмов.

**Влияние комбинирования различных антибиотиков с ферментом His<sub>6</sub>-ОРН или его ФПК на показатель МИК антибиотиков в отношении клеток разных грамотрицательных бактерий.** Исследовано влияние введения в среду с высококонцентрированными суспензиями грамотрицательных клеток бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa* комбинации фермента His<sub>6</sub>-ОРН или его ФПК с разными антибиотиками на эффективность действия последних. В качестве полианионов для формирования ФПК выбраны полиаспарагиновая и полиглутаминовая кислоты, стабилизирующее воздействие которых на активность фермента His<sub>6</sub>-ОРН было показано ранее [16–19]. При этом определялись величины МИК в отсутствие и в присутствии ферментных препаратов. Для исследуемых антибиотиков и двух использованных в работе бактериальных культур

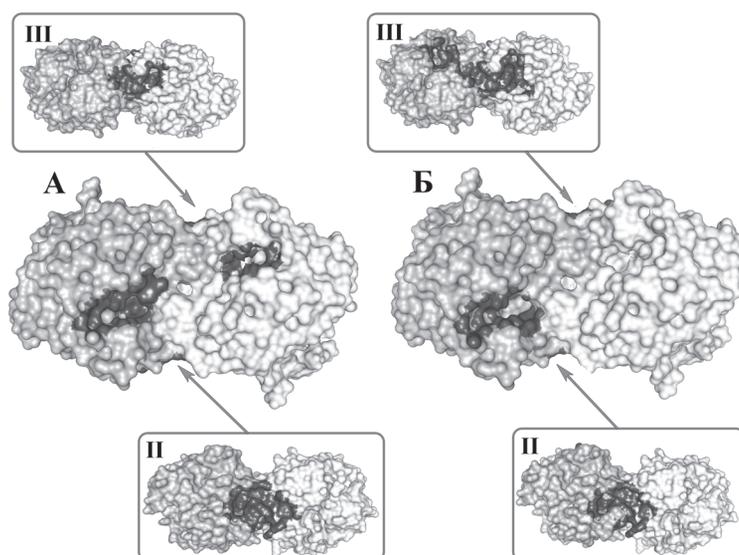


Рис. 2. Предполагаемое расположение доменов для связывания пурамицина при рН 7,5 (А) и 10,5 (Б). Две субъединицы гомодимера His<sub>6</sub>-ОРН окрашены серым и белым цветом. Атомы на поверхности His<sub>6</sub>-ОРН расположены в пределах 4 Å от любого атома пурамицина (соответствующая молекулярная поверхность окрашена темно-серым цветом). Серые квадраты показывают димерную молекулу His<sub>6</sub>-ОРН при взгляде снизу (II) и сверху (III) (относительно области расположения активных центров)

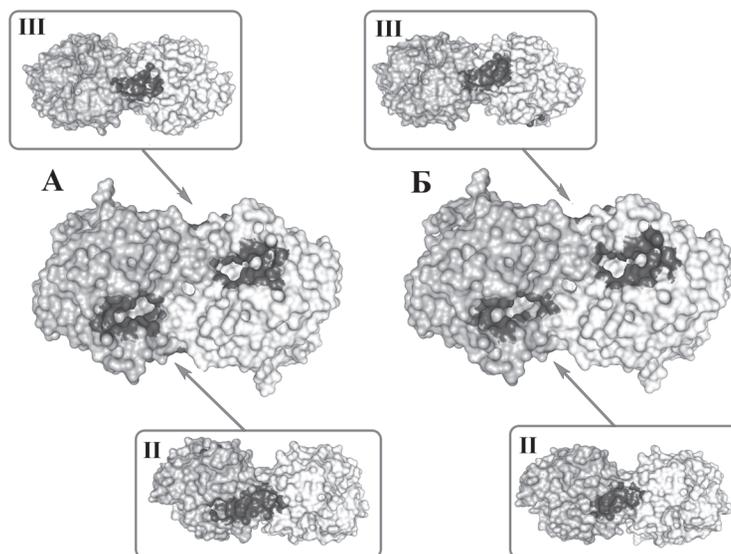


Рис. 3. Предполагаемое расположение доменов для связывания цефтриафура при рН 7,5 (А) и 10,5 (Б). Две субъединицы гомодимера His<sub>6</sub>-ОРН окрашены серым и белым цветом. Атомы на поверхности His<sub>6</sub>-ОРН расположены в пределах 4 Å от любого атома цефтриафура, соответствующая молекулярная поверхность окрашена темно-серым. Серые квадраты показывают димерную молекулу His<sub>6</sub>-ОРН при взгляде снизу (II) и сверху (III) (относительно области расположения активных центров)

установлено, что присутствие ферментных препаратов способствует снижению значений МИК (таблица). Наблюдаемые различия в значениях минимальных ингибирующих концентраций ан-

тибиотиков в присутствии ферментных препаратов на основе His<sub>6</sub>-ОРН обусловлены, вероятно, влиянием антибиотиков на активность фермента. Тенденции в снижении МИК антибиотиков при

**Минимальные ингибирующие концентрации антибиотиков для грамотрицательных бактерий в присутствии ферментных препаратов на основе His<sub>6</sub>-ОРН (12,5 мкг/мл) и без них при pH среды 7,5**

Антибиотик	МИК, мкг/мл			
	добавка			
	нет	His <sub>6</sub> -ОРН	His <sub>6</sub> -ОРН/ПГК <sub>50</sub>	His <sub>6</sub> -ОРН/ПАК <sub>50</sub>
	<i>E. coli</i>			
Пуромицин	25±0,5	23±0,5	21±0,5	22±0,5
Цефтриофур	1000±17	900±12	870±14	850±15
	<i>P. aeruginosa</i>			
Пуромицин	31±0,5	28±0,05	25±0,05	26±0,05
Цефтриофур	4000±33	2730±20	2200±25	2170±17

их комбинировании с ферментными препаратами на основе His<sub>6</sub>-ОРН обусловлены, вероятно, разрушением молекул АГЛ, индуцирующих формирование кворумного ответа у грамотрицательных клеток бактерий, и повышением эффективности действия антибиотиков. Таким образом, введение биопрепаратов на основе His<sub>6</sub>-ОРН обеспечива-

ет направленное лишение бактериальных клеток возможности перехода в устойчивое состояние, а следовательно, и более эффективное воздействие антимикробных агентов на клетки, находящиеся в составе высококонцентрированных популяций. Полученный результат можно считать значимым, так как он демонстрирует возможность снижения величины разовых эффективных доз применяемых антибиотиков, а также уровня формирования резистентности клеток бактерий к антибиотикам на основе механизмов «кворумного ответа», согласуясь с ранее полученными результатами [5, 7].

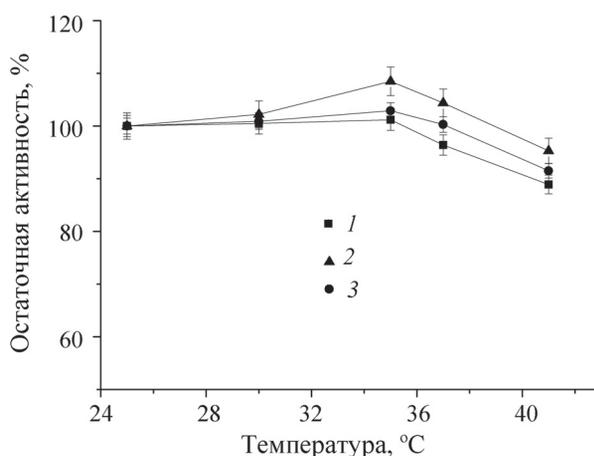


Рис. 4. Изменение лактоназной активности His<sub>6</sub>-ОРН, наблюдаемое при pH 7,5 через 15 мин при варьировании температуры среды экспонирования в присутствии антибиотиков или без них (1 – без антибиотика, 2 – с пуромицином, 3 – с цефтриофуrom). Концентрация антибиотиков 0,2 г/л, концентрация His<sub>6</sub>-ОРН 0,1 г/л (1,4×10<sup>-6</sup> М)

**Заключение**

Применение обсуждаемых подходов к использованию оригинальных биопрепаратов на основе фермента His<sub>6</sub>-ОРН открывает пути к созданию новых способов эффективной борьбы с бактериальными заболеваниями животных. Биопрепараты, обеспечивающие гидролиз лактоносодержащих индукторов формирования устойчивых популяций грамотрицательных бактериальных клеток (*Echerichia* sp., *Pseudomonas* sp., и др.), провоцирующих развитие различных заболеваний, представляют собой конкурентную альтернативу дорогостоящим коммерческим лактонам, выделяемым из грамположительных клеток рода *Bacillus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00061).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Worthington R. J., Melander C. // Trends in biotechnology. 2013. Vol. 31. N 3. P. 177.
2. Dickschat J. S. // Natural product reports. 2010. Vol. 27. N 3. P. 343.
3. Dong Y. H., Zhang L. H. // J. Microbiol. 2005. Vol. 43. N 1. P. 101.
4. Sirotkina M., Efremenko E. N. // Appl. Microbial. Biotechnol. 2014. Vol. 98. N 6. P. 2647.

5. Maslova O.V., Senko O.V., Stepanov N.A. et al. // Jundishapur journal of natural pharmaceutical. 2017. Vol. 12. N 3. P. e63649.
6. Lyagin I.V., Efremenko E. N. // Biochimie. 2018. Vol. 144. P. 115.
7. Maslova O., Aslanli A., Stepanov N., Lyagin I., Efremenko E. // Catalysts. 2017. Vol. 7. N 9. P. 271.
8. Efremenko E. N., Votchitseva J. A., Aliev T. K. et al. Recombinant plasmid DNA pTES-His-OPH and producer of oligohistidine containing organophosphate hydrolase. Ru Patent, 2,255,975. 2005.
9. Efremenko E., Votchitseva, Y., Plieva F. et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. Vol. 70. P. 558.
10. Votchitseva Y.A., Efremenko E.N., Aliev T.K. et al. // Biochem. 2006. Vol. 71. P. 167.
11. Lyagin I. V., Andrianova M. S., Efremenko E. N. // Appl Microbiol Biot. 2016. Vol. 100. N 136. P. 5829.
12. Ismayilov I. T., Stepanov N. A., Efremenko E. N. et al. // Moscow University Chemistry Bulletin. 2015. Vol. 70. N 4. P. 197.
13. Efremenko E. N., Tatarinova N. Y. // Microbiology. 2007. Vol. 76. N 3. P. 336.
14. Efremenko E. N., Azizov R. E., Makhlis T. A. et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2005. Vol. 41. N 4. P. 377.
15. Trott O., Olson A.J. // J. Comput. Chem. 2010. Vol. 31. N 2. P. 455.
16. Маслова О. В., Сенько О. В., Ефременко Е. Н. // Изв. АН. Сер. химическая. 2018. № 4. С. 614.
17. Senko O., Maslova O., Efremenko E. // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2017. T. 14. N 12. C. 1438.
18. Асланлы А. Г., Маслова О. В., Сенько О. В., Ефременко Е. Н. // Вестник Института биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13. № 4. С. 13.
19. Maslova O. V., Senko O. V., Efremenko E. N. // Biochemistry. Supplemental Series B. 2018. T. 12. N 2. C. 181.

Поступила в редакцию 01.03.18

## THE POSSIBILITIES OF REDUCING THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION OF PUROMYCIN AND CEFTIOFUR WITH THEIR COMBINATION WITH HIS<sub>6</sub>-OPH-BASED BIOLOGICS

O.V. Maslova\*, A.G. Aslanli, O.V. Senko, E.N. Efremenko

(Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry; e-mail: olga.maslova.rabota@gmail.com)

Enzymes that hydrolyze quorum sensing signal molecules of pathogenic bacteria allow to influence the number and stability of their populations. The combination of such enzymes with antibiotics can be considered as one of the ways to solve the problem of regulating the development of antibiotic resistance. In the presence of puromycin and ceftiofur (0.2 g/L) during exposure at 25–41 °C stabilization of His<sub>6</sub>-OPH lactonase activity was observed. Molecular docking of antibiotics to the surface of His<sub>6</sub>-OPH dimer revealed the antibiotics binding both to the area near active centers of the enzyme subunits and to the region of contact between subunits of the dimer, which possibly led to the stabilization of the enzyme. The presence of enzyme preparations facilitates the reduction on 36–48% of MIC of puromycin and ceftiofur on the growth of highly concentrated (10<sup>6</sup> cells/mL) cell populations of *Pseudomonas aeruginosa* B-6643 and *Escherichia coli* B-6645.

**Key words:** hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase, antibiotic, puromycin, ceftiofur, minimal inhibitory concentrations.

**Сведения об авторах:** Маслова Ольга Васильевна – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, канд. хим. наук, (olga.maslova.rabota@gmail.com); Асланлы Айсель Гюлхан гызы – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (ayselaslanli@mail.ru); Сенько Ольга Витальевна – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, канд. хим. наук (senkoov@gmail.com); Ефременко Елена Николаевна – зав. лаб. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, докт. биол. наук, профессор (elena\_efremenko@list.ru).