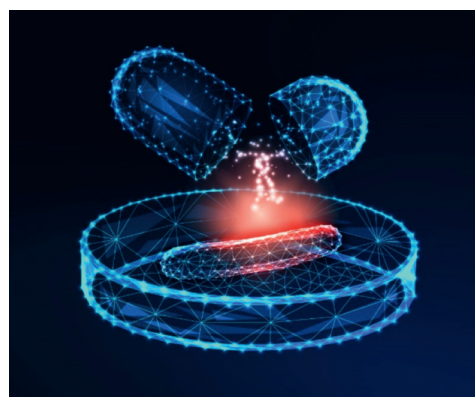


О механизме защиты бактериальной клетки, который может быть использован для борьбы с антибиотикорезистентностью

Поиск мишеней в бактериальной клетке, воздействие на которые может приводить к повышению эффективности бактерицидного действия существующих антибиотиков, остается одной из главных научных задач в борьбе с лекарственной устойчивостью. В колонке главного редактора журнала (2018 г., Том 3, №2) был опубликован материал «О новых подходах к изучению антибиотикорезистентности и персистенции бактерий как основы для разработки эффективных средств лечения инфекций», в котором излагались основные направления исследований механизмов, обеспечивающих адаптацию клеток к присутствию антибиотиков и противодействие другим стрессорным факторам, а также позволяющих сохраняться всей или части популяции в таких условиях.



В последние несколько лет появились новые направления исследований в этой области. В частности, был разработан подход, который делает бактерии более восприимчивыми к антибиотикам, основанный на нарушении универсального защитного механизма бактерий, с помощью которого сероводород (H_2S) защищает их от токсического воздействия реактивных форм кислорода. Соответственно, при повреждении или отключении этого механизма бактерии становятся более восприимчивыми к антибиотикам. Кроме того, выработка бактериями летальных реактивных форм кислорода посредством реакции Фентона (реакция пероксида водорода с ионами железа, разрушающая многие органические вещества) является основным механизмом гибели клеток при воздействии бактерицидных антибиотиков. На основе этого было высказано предположение, что нарушение бактериальной антиоксидантной защиты при нейтрализации реактивных форм кислорода повышает восприимчивость бактерий к антибиотикам. Так, было выяснено, что бактериальная супероксиддисмутаза, расщепляющая реактивные формы кислорода, является основным фактором, обеспечивающим устойчивость к антибиотикам бактерий *Pseudomonas aeruginosa*.

Представляет значительный интерес защитный механизм против окислительного стресса, связанный с выработкой H_2S . Эндогенный H_2S защищает бактериальные клетки от окислительного стресса, вызванного воздействием бактерицидных антибиотиков. Нарушение выработки H_2S и, следовательно, последующей реакции на окислительный стресс приводит к повышению восприимчивости к антибиотикам. Предполагаемый механизм такой защиты заключается в секвестрации железа и последующем предотвращении в реакции Фентона.

С использованием мутантов *Staphylococcus aureus* и *P. aeruginosa* было выяснено, что цистатионин- γ -лиаза (CSE) является основным источником H_2S . Используя рентгеновские кристаллографические структуры CSE человека, CSE-подобных ферментов и структуру CSE *S. aureus*, был определен возможный сайт для связывания аллостерических ингибиторов, которые имеют гораздо меньшее сродство к CSE человека. С использованием метода виртуального скрининга на основе структуры для анализа ~3,2 млн коммерчески доступных малых молекул были выявлены три соединения с выраженным ингибирующим действием на продукцию H_2S в *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

Все эти три соединения повышали чувствительность различных штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa* к бактерицидным, но не бактериостатическим антибиотикам из нескольких различных классов. Этого не происходило, когда в анализ включался хелатор железа, что подтверждает модель, согласно которой гибель клеток происходит в результате реакции Фентона. Одно из соединений улучшало выживаемость мышей, инфицированных *S. aureus* или *P. aeruginosa*, в сочетании с аминогликозидным антибиотиком гентамицином.

Более детально анализируя современные исследования в данной области, можно выделить несколько основных достижений.

1. CSE является основным источником H_2S у *S. aureus* и *P. aeruginosa*. В опытах гены были инактивированы с помощью транспозонных вставок, транспозонных замен или делеций. Отсутствие bCSE (бактериальная цистатионин- γ -лиаза) приводило к серьезному дефициту продукции H_2S у штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa* клинического происхождения, тогда как вклад бактериальной CBS (цистатионин- β -синтаза) при тех же условиях был незначительным. Рост мутантных штаммов на средах без антибиотиков не изменялся, а ингибирование одной только CSE было достаточным для существенного повышения чувствительности *S. aureus* и *P. aeruginosa* к низким дозам бактерицидных антибиотиков разных классов, включая гентамицин, норфлоксацин и ампициллин.

2. Применение современного виртуального скрининга на основе структуры аллостерических ингибиторов bCSE предполагает определение потенциальных сайтов связывания лекарств посредством изучения конформации CSE и родственных ферментов, определение рентгеновских кристаллографических структур SaCSE в различных состояниях. В результате исследования выявили две потенциальные области связывания в ферменте SaCSE, на основе чего были выбраны вещества, связывающие SaCSE, имеющие химические и конформационные различия: NL1, NL2 и NL3.

3. Ингибиторы bCSE потенцируют действие различных типов бактерицидных антибиотиков, что было показано на метициллин-чувствительных и метициллин-резистентных *S. aureus*, а также на *P. aeruginosa*. Была проведена оценка усиления влияния ингибиторов NL1, NL2 и NL3 фермента bCSE на представителей различных классов бактерицидных и бактериостатических антибиотиков. Все три выбранных ингибитора CSE потенцировали действие основных бактерицидных классов антибиотиков, включая фторхинолоны (ципрофлоксацин и норфлоксацин), β -лактамы (ампициллин) и аминогликозиды (гентамицин и канамицин). Потенцирование ингибиторами bCSE не наблюдалось в отношении бактериостатических антибиотиков тетрациклина и хлорамфеникола.

4. Ингибиторы bCSE были способны повышать терапевтическую эффективность антибиотиков на мышиных моделях инфекции, причем выявлен синергизм между NL1, NL2 и NL3 и антибиотиками, наблюдаемый при септическом развитии инфекции *S. aureus* и инфицировании легких *P. aeruginosa*. При септической модели наблюдалось выживание 50% животных при лечении NL1 и гентамицином, когда отдельно лечение этими препаратами эффекта не оказывало. Это же наблюдалось и на легочной модели.

5. Инактивация bCSE уменьшает количество персистеров и нарушает формирование биопленок. В экспериментах было выяснено, что популяция персистеров в культурах *S. aureus* и *P. aeruginosa* была примерно на два порядка меньше у мутантов, лишенных bCSE, что говорит о том, что эндогенная продукция H_2S является критической для формирования популяции персистеров. Обработка клеток NL1 устраняла примерно такое же количество персистеров, как и генетическая инактивация оперона cse. Было высказано предположение, что клетки персистеров могут иметь более высокие уровни H_2S , чем остальная популяция, что приводит к «самоотравлению» и, следовательно, медленному метаболизму и высокой толерантности. Это подтверждено тем, что персистеры (клетки, выжившие после воздействия цiproфлоксацина в течение 3 часов) вырабатывали значительно больше H_2S , чем персистеры.

P. aeruginosa, растущие в стационарной фазе роста синтезируют и выделяют вторичный метаболит пиоцианин, который функционирует как сигнальная молекула и фактор вирулентности. Пиоцианин также связан с образованием биопленок *P. aeruginosa*. Было установлено, что генетическая и химическая инактивация bCSE приводит к одинаково выраженному изменению морфологии колоний на агаре и значительному снижению образования биопленки. Генетическая или химическая инактивация bCSE также подавляла формирование биопленки у штаммов *S. aureus*.

Исследователи, работающие в данном направлении поиска путей преодоления антибиотикорезистентности клинических штаммов возбудителей инфекции, указывают на несколько

направлений изучения комбинаций ингибиторов bCSE с антибиотиками. Такие комбинации могут оказаться полезными против штаммов с промежуточным уровнем резистентности, или доза антибиотика может быть снижена при сохранении той же эффективности с меньшей токсичностью. Используя способность ингибиторов bCSE нарушать толерантность бактерий, можно применять комбинации антибиотиков и ингибиторов bCSE для уменьшения количества неудачных результатов лечения острых инфекционных заболеваний, уменьшения колонизации, перехода в хроническую форму и рецидивов, а также сокращения курса лечения. Ингибиторы bCSE также могут сыграть свою роль в лечении хронических заболеваний, включая те, которые связаны с биопленками. Кроме того, антибиотики, используемые в сочетании с ингибиторами bCSE, могут снизить вероятность появления или распространения устойчивости к антибиотикам.

Таким образом, это новое направление, связанное с ингибированием образования в бактериальных клетках патогенов H_2S , несущего защитные функции, является одним из наиболее перспективных и имеющих выраженное прикладное значение. Хотелось бы отметить, что одним из основных разработчиков описанного направления является бывший сотрудник ГНЦ ПМБ (ранее ВНИИ ПМ) Константин Шаталин, работающий ныне за рубежом и опубликовавший недавно обобщающую рейтинговую статью по данной проблеме (Inhibitors of bacterial H_2S biogenesis targeting antibiotic resistance and tolerance. Science. 2021 Jun 11;372(6547):1169-1175. DOI: 10.1126/science.abd8377), материалы которой были использованы при написании данного сообщения.

*Директор ФБУН «Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
Роспотребнадзора, академик РАН
И.А.Дятлов*