

# Сравнительная оценка антибактериальной эффективности рифабутина и комбинации рифабутина с 4-гексилрезорцином в отношении антибиотикорезистентных *Mycobacterium tuberculosis in vitro*

О.Ю.Манзенюк<sup>1</sup>, Ю.А.Николаев<sup>1,2</sup>, Т.Н.Мухина<sup>1</sup>, В.В.Фирстова<sup>1</sup>, Э.И.Кязимов<sup>3</sup>, И.Г.Шемякин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>ООО «Супербаг солишенс», Москва, Российская Федерация

Антимикробная добавка 4-гексилрезорцин (ГР) использовалась ранее для усиления действия антибиотиков в отношении нетуберкулезных лабораторных штаммов. Для повышения эффективности противотуберкулезных препаратов ГР применяется впервые.

Было показано снижение в 2 раза минимальной ингибирующей концентрации (МИК) антибиотика рифабутин в присутствии ½ МИК ГР. МИК рифабутина снизилась с 0,06 до 0,03 мкг/мл на фоне ½ МИК ГР (25 мкг/мл) только для штамма *Mycobacterium tuberculosis* 5360/42 (мутации в гене *katG*: 315 ACC).

Таким образом, хотя ГР нельзя отнести к универсальным адьювантам противотуберкулезных препаратов, однако его комбинацию с рифабутином следует рассматривать как перспективный вариант поиска относительно дешевых схем лечения туберкулезной инфекции в случае, когда препараты первого ряда не эффективны.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, 4-гексилрезорцин, туберкулез, антибиотикорезистентность, рифабутин

**Для цитирования:** Манзенюк О.Ю., Николаев Ю.А., Мухина Т.Н., Фирстова В.В., Кязимов Э.И., Шемякин И.Г. Сравнительная оценка антибактериальной эффективности рифабутина и комбинации рифабутина с 4-гексилрезорцином в отношении антибиотикорезистентных *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. Бактериология. 2022; 7(4): 66–68. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-66-68

## Comparative evaluation of the antibacterial effectiveness of rifabutin and a combination of rifabutin with 4-hexylresorcinol against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis in vitro*

O.Yu.Manzenyuk<sup>1</sup>, Yu.A.Nikolaev<sup>1,2</sup>, T.N.Mukhina<sup>1</sup>, V.V.Firstova<sup>1</sup>, E.I.Kazimov<sup>3</sup>, I.G.Shemiyakin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

<sup>2</sup>Fundamental Foundations of Biotechnology RAS, Moscow, Russian Federation;

<sup>3</sup>LLC «Superbug Solutions», Moscow, Russian Federation

The antimicrobial adjuvant 4-hexylresorcinol (HR) has previously been used to enhance the antibiotics effect against non-tuberculosis laboratory strains. Here HR was applied for the first time in order to increase the effectiveness of anti-tuberculosis medicines.

A 2-fold decrease in the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotic rifabutin was shown in the presence of ½ MIC of GR. MIC of rifabutin decreased from 0.06 to 0.03 µg/ml in the presence of ½ MIC GR (25 µg/ml) for *Mycobacterium tuberculosis* strain 5360/42 only (mutations in the *katG* gene: 315 ACC).

Thus, it is important to mention that HR is not universal adjuvant of anti-TB preparations, however, in combination with rifabutin, it may be a promising option for relatively cheap treatment regimens for tuberculosis infection when 1st-line drugs are not effective.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, 4-hexylresorcinol, tuberculosis, antibiotic resistance, rifabutin

### Для корреспонденции:

Манзенюк Оксана Юрьевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
E-mail: manzenyuk@obolensk.org

Статья поступила 26.10.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

### For correspondence:

Oksana Yu. Manzenyuk, MD, PhD, Senior Researcher of Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation  
E-mail: manzenyuk@obolensk.org

The article was received 26.10.2022, accepted for publication 28.12.2022

**For citation:** Manzenyuk O.Yu., Nikolaev Yu.A., Mukhina T.N., Firstova V.V., Kazimov E.I., Shemyakin I.G. Comparative evaluation of the antibacterial effectiveness of rifabutin and a combination of rifabutin with 4-hexylresorcin against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. Bacteriology. 2022; 7(4): 66–68. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-66-68

Согласно Докладу Всемирной организации здравоохранения о глобальной борьбе с туберкулезом 2021 г., из-за пандемии COVID-19 впервые за десять лет показатели смертности от туберкулеза возросли [2]. Заболеваемость туберкулезом в России составила 41,2 на 100 тыс. населения, смертность – 30% [3].

Для предотвращения подъема заболеваемости туберкулезной инфекцией особую актуальность приобретает задача создания комбинаций препаратов из уже известных соединений, обладающих синергическим действием и преодолевающих порог устойчивости к монопрепаратам [4]. Необходимым параметром отбора таких комбинаций является снижение действующих доз антибиотиков и статистически достоверное уменьшение численности бактерий.

**Целью исследования** является изучение антибактериальной эффективности антибиотика рифабутин в комбинации с гексилрезорцином (ГР) в отношении антибиотикорезистентных микобактерий *Mycobacterium tuberculosis in vitro*.

## Материалы и методы

Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) использовали экспресс-метод с функциональным красителем Alamar Blue [5], а также традиционный метод – по наличию или отсутствию роста микобактерий на питательных средах.

**Метод 1.** К раститрованным в планшетах противотуберкулезным препаратам добавляли ГР в концентрациях, равных ½ МИК. Далее в лунки планшетов вносили микобактериальную культуру (по 100 мкл в концентрации 10<sup>6</sup> кл./мл.), инкубировали в течение 2 суток при 37°C и затем добавляли краситель Alamar Blue (Sigma) до концентрации 50 мкМ. В присутствии живых клеток происходило восстановление красителя и развитие розовой окраски, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству активных клеток. Через 24 ч результаты учитывали с помощью микропланшетного флуориметра (Микропланшетный фотометр-флуориметр «ФФМ-01», Россия).

Величину антибактериальной активности (АА, снижение роста от контроля в процентах) препарата вычисляли согласно формуле:

$$AA = (1 - (FI_{(препарат)}/FI_{(контроль\ культуры)}) \times 100,$$

где FI – интенсивность флуоресценции.

За пороговый уровень принята величина 20%.

**Метод 2.** Для определения МИК противотуберкулезных препаратов и ГР из лунок планшетов, содержащих микобактерии с препаратами в различных концентрациях, инкубированных в течение 28 суток, делали высевы на плотную питательную среду Middlebrook 7H10 (HiMedia) с добавлением 10% ростовой добавки OADS (HiMedia). Посевы инкубировали в термостате при 37°C в течение 21–28 дней. За МИК принимали наименьшую концентрацию препарата, при которой отсутствовал рост в лунках планшета.

## Результаты и обсуждение

Вначале была исследована противотуберкулезная активность 6 антимикробных препаратов. МИК шести противотуберкулезных препаратов (рифабутин, офлоксацин, амикацин, капреомицин, стрептомицин, кларитромицин) варьировали для антибиотикоустойчивых штаммов *M. tuberculosis* от 0,06 (рифабутин) до 128 мкг/мл (стрептомицин). Для ГР МИК составил 50 мкг/мл. На фоне ½ МИК ГР (25 мкг/мл) для резистентного штамма *M. tuberculosis* 5360/42 концентрация рифабутин снизилась с 0,06 до 0,03 мкг/мл.

Для оценки антимикробной активности по уровню флуоресценции функционального красителя Alamar Blue вначале был определен пороговый (фоновый) уровень флуоресценции, который по нашим расчетам не превышал 20%. Для рифабутин величина АА равнялась 32,55%, для комбинации рифабутин + ГР – 31,62%.

Таким образом, стало очевидным, что комбинация рифабутин + гексилрезорцин может быть отобрана для дальнейших исследований *in vivo* на модели туберкулеза мышей.

Впоследствии данные результаты могут послужить основой для поиска новых схем лечения туберкулеза в тех случаях, когда противотуберкулезные препараты первого ряда не эффективны,

## Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора, а также при финансовой поддержке Фонда «ИЦ Сколково» (микрогрант №40113/07003/0415-2018).

## Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of Rosпотребнадзор, as well as with financial support Foundation "IC Skolkovo" (micro-grant No. 40113/07003/0415-2018).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Литература

- Shemyakin IG, Manzenyuk OY, El'-Registan GI, Firstova VV, Kombarova TI, Gneusheva TY, Kyazimov EI, Nikolaev YA. Effect of 4-Hexylresorcinol on the Efficiency of Antibiotic Treatment of Experimental Sepsis Caused by Antibiotic-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain in Mice. Bull Exp Biol Med. 2021 Aug;171(4):458-460. DOI: 10.1007/s10517-021-05249-6
- Пресс-релиз ВОЗ по туберкулезу. Доступно по: <https://www.who.int/ru/news/item/14-10-2021-tuberculosis-deaths-rise-for-the-first-time-in-more-than-a-decade-due-to-the-covid-19-pandemic>

3. Нечаева ОБ. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России. Туберкулез и болезни легких. 2018;8(96):15-24.
4. Gill EE, Franco OL, Hancock RE. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem Biol Drug Des.* 2015 Jan;85(1):56-78. DOI: 10.1111/cbdd.12478
5. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol.* 1998 Feb;36(2):362-6. DOI: 10.1128/JCM.36.2.362-366.1998

## References

1. Shemyakin IG, Manzenyuk OY, El'-Registan GI, Firstova VV, Kombarova TI, Gneusheva TY, Kyazimov EI, Nikolaev YA. Effect of 4-Hexylresorcinol on the Efficiency of Antibiotic Treatment of Experimental Sepsis Caused by Antibiotic-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain in Mice. *Bull Exp Biol Med.* 2021 Aug;171(4):458-460. DOI: 10.1007/s10517-021-05249-6
2. Press Release WHO. Tuberculosis. Available at: <https://www.who.int/ru/news/item/14-10-2021-tuberculosis-deaths-rise-for-the-first-time-in-more-than-a-decade-due-to-the-covid-19-pandemic> (In Russian).
3. Nechaeva OB. TB situation in Russia. *Tuberculosis and Lung Diseases.* 2018;8(96):15-24
4. Gill EE, Franco OL, Hancock RE. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem Biol Drug Des.* 2015 Jan;85(1):56-78. DOI: 10.1111/cbdd.12478
5. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol.* 1998 Feb;36(2):362-6. DOI: 10.1128/JCM.36.2.362-366.1998

## Информация о соавторах:

Николаев Юрий Александрович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; руководитель лаборатории ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Мухина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; профессор факультета биологической безопасности ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»

Кязимов Эльман Имранович, руководитель ООО «Супербаг солюшенс»,

Шемякин Игорь Георгиевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

## Information about co-authors:

Yury A. Nikolaev, PhD, DSc (Biological Sciences), Leading Researcher of Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор; Head of Laboratory, Federal State Institution FRC Fundamental Foundations of Biotechnology RAS

Tatiana N. Mukhina, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of Microbial Collection Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Victoria V. Firstova, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор; Professor of the Faculty of Biological Safety, Pushchino State Institute of Natural Science

Elman I. Kyazimov, Head of Superbug Solutions LLC

Igor G. Shemyakin, PhD, DSc (Biological Sciences), Deputy Director of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

## НОВОСТИ НАУКИ

### Новое семейство морских бактерий с большим потенциалом для синтеза новых натуральных продуктов

Природные микробные сообщества филогенетически и метаболически разнообразны. В дополнение к малоизученным группам организмов это разнообразие включает в себя богатый потенциал открытия экологически и биотехнологически важных ферментов и биохимических соединений. Биосинтетический потенциал микроорганизмов в открытом океане остается в значительной степени неизведанным из-за ограничений в анализе данных с разрешением генома в глобальном масштабе. Исследовано разнообразие и новизна кластеров биосинтетических генов в океане, интегрировав около 10 000 микробных геномов из культивируемых и одиночных клеток с более чем 25 000 недавно реконструированных черновых геномов из более чем 1000 образцов морской воды. Выявили около 40 000 предполагаемых в основном новых кластеров биосинтетических генов, некоторые из которых были обнаружены в ранее не подозревавшихся филогенетических группах. Среди этих групп идентифицировали линию, богатую кластерами биосинтетических генов (*Candidatus Eudoremicrobiaceae*), которая принадлежит к некультивируемому бактериальному типу и включает некоторые из наиболее биосинтетически разнообразных микроорганизмов в этой среде. Из них охарактеризовали пути фосфептина и питонамида, выявив случаи необычной структуры биоактивных соединений и энзимологии соответственно. Это исследование демонстрирует, как стратегии, основанные на микробиомике, могут позволить исследовать ранее неописанные ферменты и натуральные продукты в малоизученных микробных группах и средах.



Paoli L, Ruscheweyh HJ, Forneris CC, et al.

Biosynthetic potential of the global ocean microbiome. *Nature.* 2022 Jun 22. DOI: 10.1038/s41586-022-04862-3