

Проантоцианидин влияет на внутренние механизмы антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий

Vimal B. Maisuria, Mira Okshevsky, Eric Deziel, Nathalie Tufenkji*

Как в медицине, так и в сельском хозяйстве, с угрожающей скоростью увеличивается резистентность к антибиотикам патогенных бактерий. Вмешательство во внутренние механизмы резистентности патогенных бактерий может привести к увеличению эффективности антибиотиков и уменьшению распространения приобретенной устойчивости к антибиотикам. В настоящей статье показано, что проантоцианидины клюквы (сРАС) предотвращают развитие устойчивости к тетрациклину у *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, восстанавливают эффективность антибиотиков против микроорганизмов, на которых направлено их действие, и предотвращают образование биопленки. Кроме того, показано, что сРАС как *in vitro*, так и *in vivo*, потенцируют активность широкого спектра классов антибиотиков против патогенных *E. coli*, *Proteus mirabilis* и *P. aeruginosa*. Представлены доказательства того, что сРАС действуют путем подавления двух механизмов устойчивости к антибиотикам: селективной проницаемости мембран и полилекарственных эффлюксных насосов. Неспособность сРАС потенцировать активность антибиотиков против мутантов с дефектными эффлюксными насосами свидетельствуют о том, что подавление эффлюкса имеет большое значение для потенцирования активности антибиотиков. Использование сРАС для потенцирования активности антибиотиков и уменьшения развития резистентности может привести к улучшению результатов лечения и способствовать предотвращению растущей угрозы резистентности к антибиотикам.

1. Введение

Распространение устойчивости к антибиотикам во всем мире препятствует прогрессу в борьбе с бактериальными инфекциями. По причине чрезмерного использования антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве мы находимся на пороге возвращения к эпохе, предшествующей антибиотикам, когда несерьезные инфекции снова могут представлять смертельную опасность. В связи с этим является важной целью борьба с уменьшением эффективности антибиотиков за счет повышения эффективности доступных в настоящее время противомикробных средств. Эффективность антибиотиков ограничена экспрессией внутренних механизмов резистентности, таких как продуцирование антибиотикоустойчивых и/или персистирующих клеток или образование биопленки и появление устойчивых к антибиотикам возбудителей, не поддающихся лечению по причине приобретенной резистентности. В настоящей статье мы сообщаем, что

Доктор V. B. Maisuria, доктор M. Okshevsky, профессор N. Tufenkji

Кафедра химической инженерии

Университет Макгилла

3610, Университи Стрит, Монреаль, Квебек, H3A0C5, Канада

Адрес электронной почты: nathalie.tufenkji@mcgill.ca

Профессор E. Deziel

Национальный научно-исследовательский институт Арман-Фраппе

531 бульвар де Прери, Лаваль, Квебек, H7V 1B7, Канада

<Логотип: ИН> Открытые идентификационные номера авторов данной статьи (ORCID) указаны на странице <https://doi.org/10.1002/adv.201802333>.

© 2019 год, Группа авторов. Опубликовано компанией «ВАЙЛЕЙ-Фау-Це-Ха Ферлаг ГмбХ унд Ко.», Вайнхайм. Настоящая статья предназначена для открытого доступа в соответствии с условиями лицензии Creative Commons Attribution которая разрешает использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии правильного цитирования оригинальной работы.

Цифровой идентификатор объекта (DOI): 10.1002/adv.201802333

очищенная фракция проантоцианидинов клюквы (сРАС) потенцирует активность широкого спектра классов антибиотиков против условно-патогенных бактерий *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* и *Pseudomonas aeruginosa*. сРАС эффективно потенцировал активность, направленную против разнообразных форм существования бактерий, обычно резистентных к антибиотикам, таким как биопленки и спящие клетки, а также в экспериментальных моделях хронических инфекций. Примечательно то, что в сочетании с тетрациклином сРАС полностью предотвращал развитие резистентности у *E. coli* и *P. aeruginosa*. Данные результаты позволяют предположить, что в сочетании с антибиотиками сРАС обладает потенциалом уменьшения распространения устойчивости к противомикробным средствам и продления эффективности доступных в настоящее время антибактериальных препаратов. Условно-патогенные микроорганизмы колонизируют поверхности в медицинских учреждениях, на стационарных медицинских устройствах и на живых тканях, что приводит к развитию инфекций, которые необходимо лечить антибиотиками. Эффективность лечения антибиотиками ухудшают два основных фактора: i) бактерии, устойчивые к антибиотикам, и ii) образование антибиотикоустойчивых биопленок.⁽¹⁾ В последнем случае фиксированные бактерии могут выдерживать дозы антибиотиков в тысячи раз большие, чем их планктонные аналоги,⁽²⁻⁴⁾ во многом благодаря резистентным или персистирующим клеткам, которые остаются в состоянии покоя в биопленке и готовы возобновить размножение после уменьшения концентрации антибиотиков. Длительное лечение антибиотиками и высокие дозы антибиотиков по причине упорного течения такого рода инфекций, угрожают здоровью пациентов и создают сильное селекционное давление, приводящее к развитию устойчивости к антибиотикам.^(2, 3, 5) Разработка новых методов повышения эффективности доступных в настоящее время антибактериальных средств для уменьшения частоты развития антибиотикорезистентности и нежелательных побочных эффектов высоких доз антибиотиков является привлекательной альтернативой поиска новых антибиотиков. Одной из таких возможностей является использование природных молекул, потенцирующих действие антибиотиков.

Плоды американской клюквы (*Vaccinium macrocarpon L.*), а также извлеченные из них вещества, традиционно считаются естественным средством для лечения инфекций мочевыводящих путей.^(6, 7) сРАС предоставляет собой конденсированные танины, которые могут препятствовать прикреплению бактерий к клеточным или биологическим поверхностям,⁽⁸⁻¹¹⁾ ухудшают подвижность бактерий,⁽¹²⁻¹⁷⁾ индуцируют статус ограничения железа⁽¹⁸⁾ и нарушают кворумную сигнализацию.⁽¹⁹⁾ Проведенные исследования показывают, что потребление клюквы может способствовать предотвращению бактериальных инфекций,⁽²⁰⁻²⁵⁾ а также в отчете об одном из них сообщается о комбинированном действии смеси производных клюквы (без фракции проантоцианидинов) и β -лактамных антибиотиков против грамположительных бактерий.⁽²⁶⁾ Также предполагается, что сРАС может ингибировать образование биопленки и потенцировать активность гентамицина против *P. aeruginosa*.⁽¹⁷⁾ Тем не менее, способность сРАС вмешиваться в развитие устойчивости к антибиотикам или поддерживать эффективность антибиотиков никогда не исследовалась. Кроме того, ни в одном исследовании не оценивались спектр активности или молекулярный механизм действия определенных производных клюквы, таких как проантоцианидины, используемых для лечения бактериальных инфекций. В настоящей статье мы сообщаем о способности сРАС препятствовать развитию устойчивости *E. coli* и *P. aeruginosa* к тетрациклину и демонстрируем потенцирование сРАС активности широкого спектра антибиотиков против различных патогенных грамотрицательных бактерий как *in vitro*, так и *in vivo*. Мы также показываем, что сРАС способен подавлять два важных внутренних

механизма устойчивости к антибиотикам: селективную проницаемость мембран и активность полилекарственных эффлюксных насосов.

2. Результаты

2.1. cPAC потенцирует активность широкого спектра антибиотиков *in vitro*

Мы провели скрининговые анализы cPAC, комбинированного с несколькими классами антибиотиков, разрешенных для использования в клинической практике и входящих в список основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения.⁽²⁷⁾ Проводился анализ патогенных штаммов *E. coli*, *P. mirabilis* и *P. aeruginosa* методом микроразведений (шахматной доски). Мы определяли способность cPAC потенцировать эффективность антибиотиков, вычисляя индекс фракционной ингибирующей концентрации (FICI). На **Рисунке 1А-С** показаны положительные и/или отрицательные взаимодействия между cPAC и антибиотиками, приводящие к изменению активности против патогенных бактерий. Значения $FICI \leq 0,5$ (расположены в серой зоне) обозначают, что cPAC увеличивает эффективность ингибирования сульфаметоксазолом (SMX), нитрофурантоином (NIT), гентамицином (GEN), канамицином (KAN), тетрациклином (TET) и азитромицином (AZT) размножения *E. coli* CFT073, *P. mirabilis* HI4320 и *P. aeruginosa* PA14, для которого потребовалась до 98% меньшая концентрация антибиотика, чем без использования cPAC. cPAC также потенцировал активность ингибирования триметопримом (TMP) и фосфомицином (FOS) размножения *P. mirabilis* HI4320, для чего потребовалась на 81% и 98% меньшая концентрация антибиотика, соответственно, чем без использования cPAC. cPAC повышал эффективность антибиотиков SMX, FOS, NIT, GEN, KAN и AZT против штамма *P. aeruginosa* PA01 (Рисунок S1A, дополнительная информация). Тот факт, что cPAC потенцирует активность какого-либо антибиотика против одного, но не другого штамма (например, cPAC потенцировал активность FOS против *P. mirabilis* HI4320, но не против *P. aeruginosa* PA14 и *E. coli* CFT073), свидетельствует о том, что наблюдаемый эффект является специфическим и что cPAC не просто инактивирует антибиотик. Неудивительно, что значения FICI некоторых антибиотиков для двух штаммов *P. aeruginosa* являлись различными, так как соответственно различались $МИК_{антибиотик}$.⁽²⁸⁾

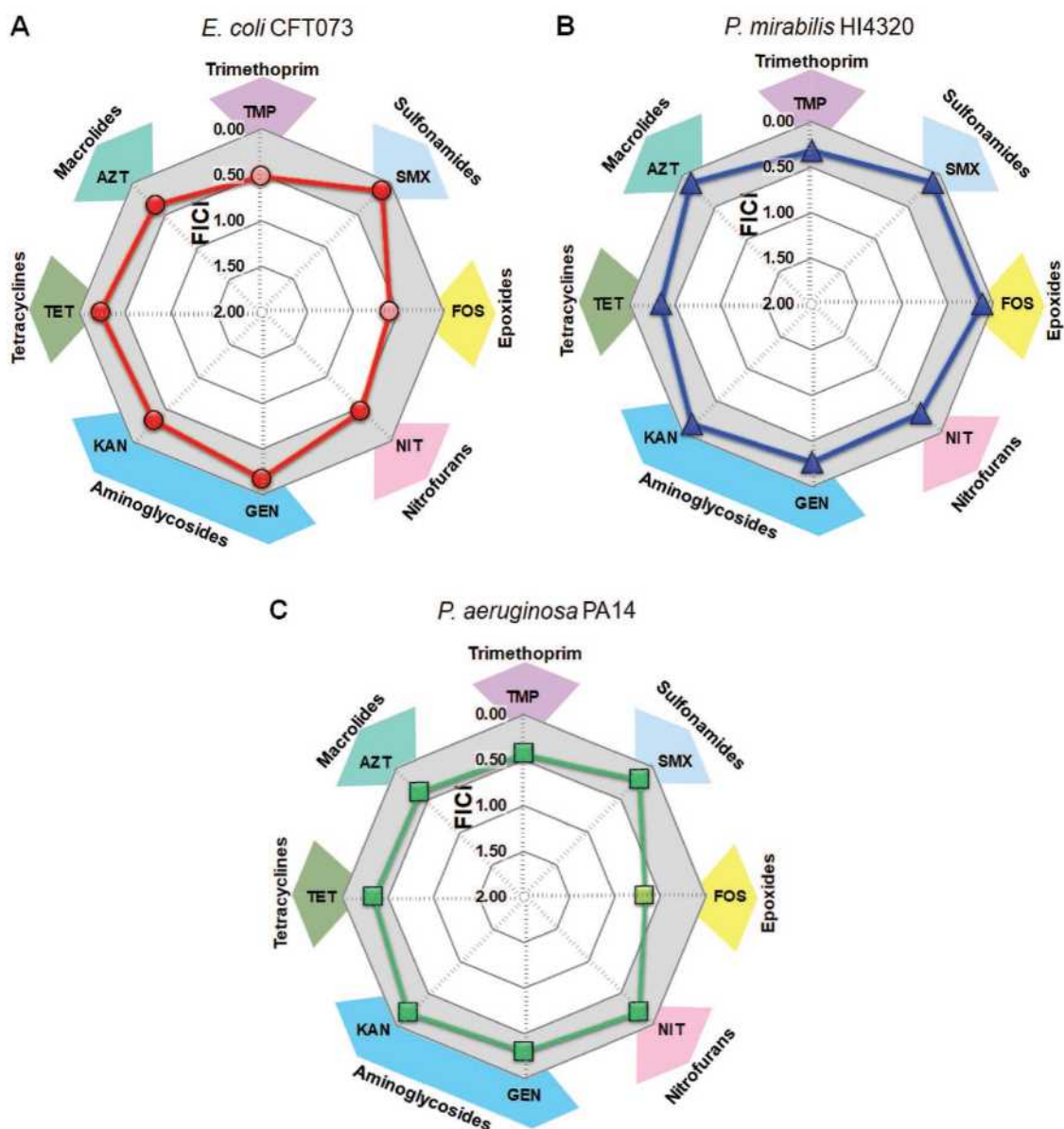
В концентрациях, необходимых для потенцирования эффективности антибиотиков, cPAC в отдельности заметно не ингибировал рост всех четырех патогенных штаммов (Рисунки S1B и S2A-C, дополнительная информация). Так как cPAC обладал способностью потенцировать активность по отдельности TMP или SMX, мы исследовали взаимодействие cPAC с котримоксазолом (комбинацией SMX и TMP, обычно используемой для лечения инфекций мочевыводящих путей и бактериальной дизентерии⁽²⁷⁾). cPAC увеличивал синергетическую эффективность котримоксазола против *P. mirabilis* HI4320, уменьшая МИК до 64 раз. После добавления cPAC МИК котримоксазола для *P. aeruginosa* PA14 уменьшилась в 32 раза, что указывает на значимо больший потенцирующий эффект, чем комбинации cPAC с TMP и SMX по отдельности (Рисунок S3, дополнительная информация). Тот факт, что cPAC потенцирует антибиотики, но не действует как антибиотик в отдельности, позволяет предположить, что лечение cPAC с малой долей вероятности может создавать селекционное давление, приводящее к развитию резистентности.

2.2. сРАС предотвращает реактивацию микроорганизмов, подвергнутых воздействию антибиотика

Чтобы исследовать ингибирующую активность сРАС против бактерий, подвергнутых воздействию антибиотиков, проводился модифицированный диско-диффузионный тест. На **Рисунке 2А** показано, что после обработки бактериостатическим антибиотиком тетрациклином (этап 1: размещение диска с ТЕТ) бактерии в зоне ингибирования роста смогли восстановиться после замены диска с ТЕТ на новый диск, пропитанный глюкозой (на этапе 2). Анализ реактивации бактерий, основанный на образовании колоний внутри типичной чистой зоны/зоны ингибирования, показывает, что степень «реактивации» клеток с образованием колоний, различается в зависимости от использования или не использования сРАС. Замена на диск, пропитанный только глюкозой (на этапе 2), способствовала усиленной реактивации клеток (то есть образованию бактериального газона в предшествующей зоне ингибирования), тогда как под диском, пропитанным смесью сРАС и глюкозы, полностью отсутствовала реактивации клеток, подвергшихся воздействию антибиотика. Рядом с диском, пропитанным только сРАС, не наблюдался рост колоний. Кроме того, размер чистой зоны диска, пропитанного только сРАС (на этапе 2), являлся примерно таким же, как и диска с ТЕТ (этап 1), а также диска с глюкозой + сРАС (этап 2). Так как сРАС в отдельности не ингибировал рост данного штамма или любых других оцененных штаммов (Рисунки S1B, C и S2A-F, дополнительная информация), вероятно, что чистые зоны вокруг дисков с только сРАС и дисков с глюкозой + сРАС являются результатом синергического взаимодействия сРАС с остатками ТЕТ, что согласуется с немного меньшим диаметром, так как на периферии дисков должна была являться меньшей концентрация сРАС и ТЕТ. Такие же эффекты наблюдались в опыте с оценкой воздействия миноцидина (MIN; Рисунок S4, дополнительная информация) на *E. coli* CFT073. Описанные результаты позволяют предположить, что сРАС может продлевать активность остаточной концентрации антибиотика против клеток, подвергшихся воздействию антибиотика, даже после отмены лечения.

2.3. сРАС препятствует развитию устойчивости к антибиотикам

Для выяснения роли сРАС в эффективном ингибировании реактивации клеток, подвергшихся воздействию антибиотика, мы оценили способность сРАС подавлять развитие резистентности *E. coli* CFT073 и *P. aeruginosa* PA14. Как показано на **Рисунке 2В, С**, последовательный пересев с обработкой только ТЕТ в течение 21 дня приводил к 128-кратному и 32-кратному увеличению МИК для *E. coli* CFT073 и *P. aeruginosa* PA14, соответственно, тогда как сРАС, добавленный к ТЕТ, предотвращал развитие резистентности обоих оцененных штаммов. сРАС в отдельности не стимулировал развитие резистентности ни одного из оцененных штаммов. Описанный результат показывает, что сРАС может подавлять развитие устойчивости бактерий к антибиотикам.



Надписи на рисунке:

Trimethoprim = триметоприм

Sulfonamides = сульфонамиды

Epoxides = эпоксины

Nitrofurans = нитрофураны

Aminoglycosides = аминогликозиды

Tetracyclines = тетрациклины

Macrolides = макролиды

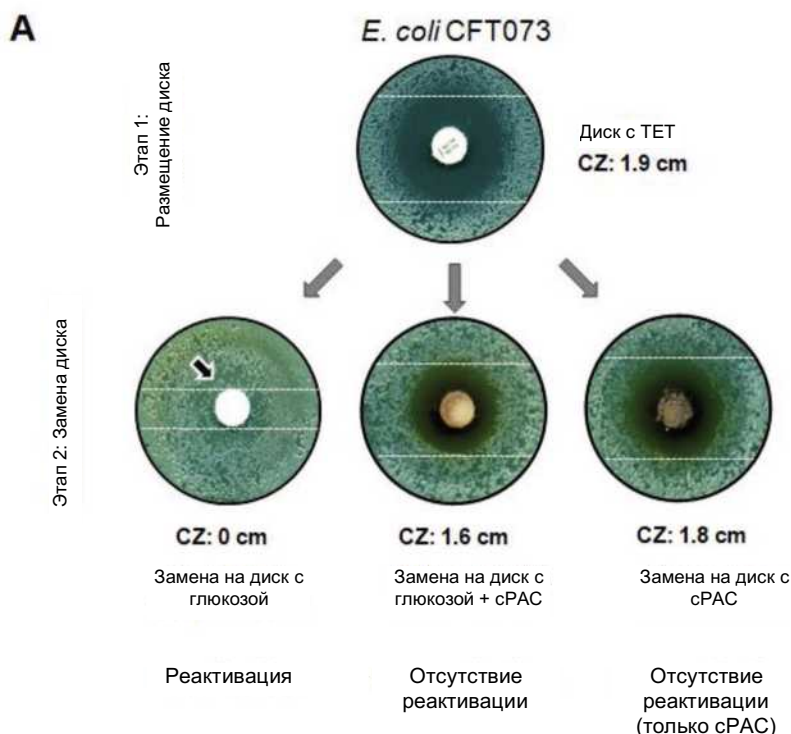
Рисунок 1. Потенцирующее взаимодействие cPAC с антибиотиком приводит к ингибированию размножения бактерий. В условиях *in vitro* определялась МИК каждого антибиотика, комбинированного с cPAC. Показаны индексы фракционной ингибирующей концентрации (FICI) каждой комбинации для А) *E. coli* CFT073, В) *P. mirabilis* HI4320 и С) *P. aeruginosa* PA14. FICI $\leq 0,5$ показаны как расположенные в серой зоне. TMP: триметоприм; SMX: сульфаметоксазол; FOS: фосфомицин; NIT: нитрофурантоин; GEN: гентамицин; KAN: канамицин; TET: тетрацилин; AZT: азитромицин.

2.4. cPAC потенцирует активность SMX *in vivo*

Наша следующая цель заключалась в оценке способности cPAC *in vivo* увеличивать активность антибиотиков против бактериальных инфекций. С этой целью мы использовали модель *Drosophila melanogaster*, инфицированную *P. aeruginosa* PA14,

которой по отдельности или в комбинации вводились сРАС или SMX. Медиана выживаемости насекомых после инфицирования составила 138 ч без лечения, но более 225 ч в группе лечения сРАС в комбинации с SMX (Рисунок 3А). Выживаемость мух из группы комбинированной терапии являлась значимо большей ($\chi^2 = 3,88$, $df = 1$, $P < 0,05$), чем выживаемость в группе лечения только SMX. Медиана продолжительности выживания инфицированных *D. melanogaster*, которые обрабатывались только сРАС или только SMX, составила 202 и 178 ч, соответственно (Рисунок 3А), и являлась не значимо ($P > 0,05$) большей, чем медиана выживания не лечившихся мух, инфицированных *P. aeruginosa* PA14. Выживаемость неинфицированных *D. melanogaster* являлась примерно такой же, как и насекомых, которые лечились только сРАС или SMX (Рисунок S5А, дополнительная информация), что указывает на безопасность по отдельности сРАС (концентрация 50 мкг/мл⁻¹) и SMX (концентрация 256 мкг/мл⁻¹) для данного биологического вида.

Для подтверждения способности сРАС потенцировать активность антибиотиков у более чем одного биологического вида, мы также использовали модель уничтожения личинок большей восковой моли (*Galleria mellonella*), в которой сРАС и SMX вводились отдельно или в комбинации личинкам, инфицированным летальной дозой *P. aeruginosa* PA14. Медиана выживаемости инфицированных личинок без лечения составила 21 час по сравнению с 47 ч у личинок, лечившихся комбинацией сРАС и SMX.



cm = см

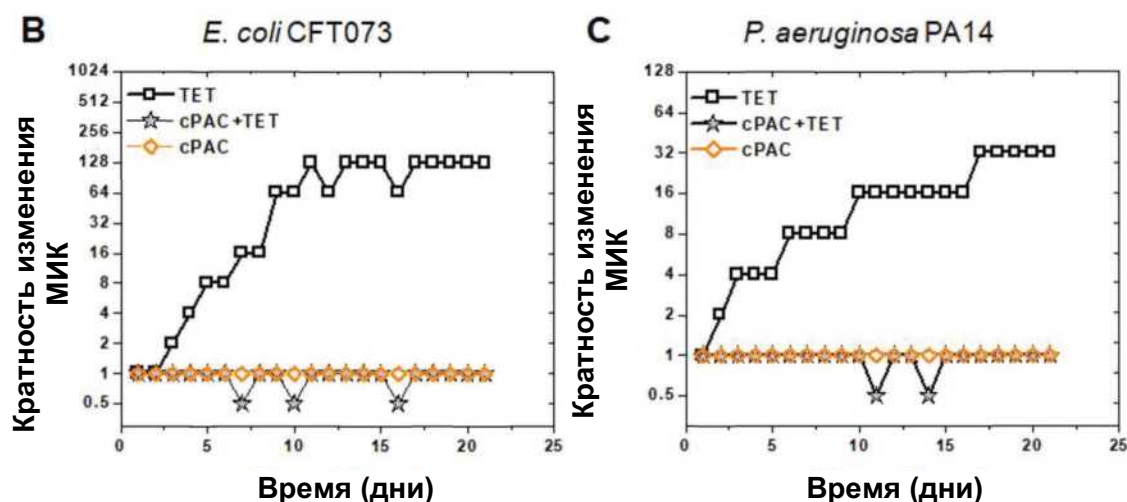
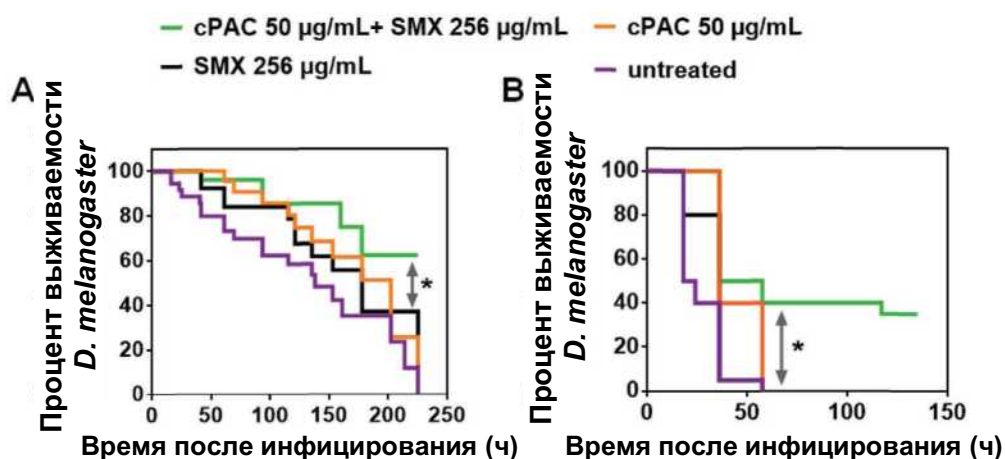


Рисунок 2. Синергичное ингибирование cPAC и TET реактивации клеток, подвергшихся воздействию антибиотика, и предотвращение развития резистентности. А) Обнаружение реактивации клеток *E. coli* CFT073, подвергшихся воздействию антибиотика, с использованием модифицированного диско-диффузионного метода. Этап 1: диск с TET размещался на поверхности агара МНВ-II. Пунктирные линии обозначают диаметр чистой зоны, окружающей диск с TET. Этап 2: диски с TET на чашке с агаром МНВ-II заменяются на диск с глюкозой, cPAC + глюкоза или только с cPAC. Диаметр чистой зоны (CZ) и отсутствие образования колоний внутри чистой зоны, окружающей диск с cPAC +глюкоза, указывают на отсутствие реактивации клеток, подвергшихся воздействию антибиотика, после замены диска на этапе 2, а колонии внутри зоны ингибирования (обозначены черной стрелкой), окружающей диск с глюкозой, обозначают реактивацию клеток, подвергшихся воздействию антибиотика. Только диск с cPAC предотвращал реактивацию бактерий, наиболее вероятно по причине синергизма с остатками TET. Показаны только репрезентативные изображения трех независимых экспериментов. Диаметр диска: 6 мм. Появление устойчивости к антибиотикам у В) *E. coli* CFT073 и С) *P. aeruginosa* PA14 в течение 21 серийного пересева в присутствии суб-МИК TET по сравнению с 400 мкг/мл⁻¹ cPAC в отдельности или в комбинации с 100 мкг/мл⁻¹ cPAC.

Продолжительность выживания являлась значимо большей ($\chi^2 = 143$, $df = 1$, $P < 0,05$) по сравнению с медианой продолжительности выживания 36 часов в группе лечения только SMX (Рисунок 3В). Медиана выживаемости инфицированных личинок, которые обрабатывались только cPAC, являлась примерно такой же, как и личинок, которые обрабатывались только SMX (Рисунок 3В), в отличие от отсутствия антибактериальной активности данной концентрации cPAC *in vitro* и в модели кормления мух. Как и в анализе кормления *D. melanogaster*, отсутствовали различия в кривых выживаемости неинфицированных личинок *G. mellonella* и личинок, которые лечились только cPAC или SMX (Рисунок S5B, дополнительная информация). Данные результаты подтверждают, что cPAC в концентрации 50 мкг/мл⁻¹ усиливает активность SMX *in vivo*.



Надписи на рисунке:
µg/mL = мкг/мл
untreated = без лечения

Рисунок 3. Синергичный защитный эффект сPAC, комбинированного с антибиотиком, *in vivo* в модели инфекции у насекомых. А) В модели *in vivo* кормления мух *D. melanogaster* оценивался синергизм сульфаметоксазола (SMX) и сPAC. Мухи (N = 30 в каждой экспериментальной группе) инфицировались путем введения внутрь клеток *P. aeruginosa* PA14 и содержались на агаре с добавлением SMX и сPAC. Результатами являются измерения, сделанные в экспериментах с тремя повторностями (*, P < 0,05, логранговый критерий (Мантеля-Кокса)). В) Синергизм *in vivo* SMX и сPAC оценивался в модели инфекции у личинок *G. mellonella*. Личинки *G. mellonella* инфицировались летальной дозой клеток *P. aeruginosa* PA14. Через 3 ч личинкам *G. mellonella* (N = 20 в каждой экспериментальной группам) в место инфицирования инъецировались сPAC или SMX по отдельности или в комбинации. Результатами являются измерения, сделанные в независимых экспериментах с двумя повторностями (*, P < 0,005, логранговый критерий (Мантеля-Кокса)).

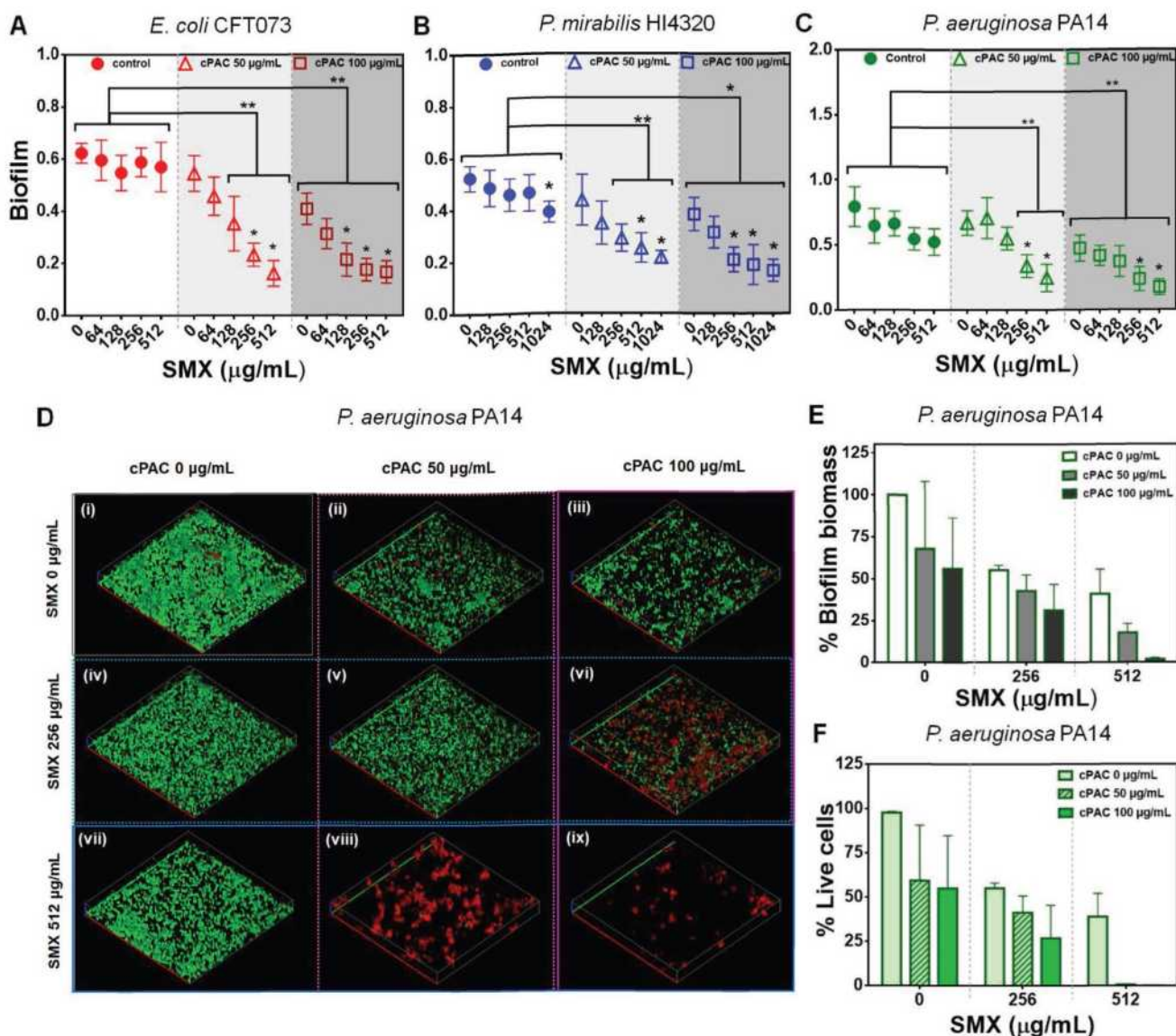
2.5. сPAC в сочетании с антибиотиком препятствует образованию биопленки

Для оценки способности сPAC препятствовать образованию биопленок во время лечения антибиотиками на микротитровальных планшетах выращивались биопленки монокультур бактерий в присутствии различных концентраций сPAC и SMX. Как показано на **Рисунке 4А-С**, сPAC уменьшал образование биопленки *E. coli* CFT073, *P. mirabilis* HI4320 и *P. aeruginosa* PA14. сPAC изолировано в концентрации 100 мкг/мл⁻¹ значительно (P < 0,05) ингибировало образование биопленок монокультур, что согласуется с результатами других исследований, в которых показано, что сPAC или экстракты клюквы могут уменьшать адгезию бактерий.⁽⁸⁻¹¹⁾ Важно то, что сPAC в сочетании с SMX значительно (P < 0,01) ингибировало образование биопленок в зависимости от дозы (Рисунок 4А-С; Рисунок S1D, дополнительная информация). Необработанные контрольные биопленки состояли из жизнеспособных клеток (Рисунок 4D, зеленого цвета), прикрепленных к поверхности и образующих плотные микроколонии (Рисунок 4Di). SMX изолировано в оцененных концентрациях оказывал минимальное влияние на образование биопленок. В противоположность к этому, комбинация сPAC и SMX характеризовалась уменьшением общей плотности прикрепленной биомассы и жизнеспособности по сравнению с необработанными биопленками (Рисунок 4E, F). Интересно то, что сравнительно большая часть биомассы, обработанной SMX в концентрации 512 мкг/мл⁻¹ в сочетании с сPAC, состояла из убитых бактерий (Рисунок 4Dviii, ix). Если предположить, что немногие, оставшиеся живыми, клетки в присутствии SMX в концентрации 512 мкг/мл⁻¹ и сPAC в концентрации 50 мкг/мл⁻¹ неактивны, но способны реактивироваться после прекращения воздействия антибиотика и образовать новую биопленку, увеличение концентрации сPAC до 100 мкг/мл⁻¹ явилось достаточным для уничтожения этих выживших клеток. Так как

комбинация cPAC и SMX является более эффективной в разрушении биопленок, чем каждое из данных веществ по отдельности, полученные результаты свидетельствуют о том, что cPAC действует синергично с SMX, уменьшая способность бактерий образовывать биопленки, и подтверждают гипотезу о том, что cPAC способствует разрушению dormantных клеток в присутствии антибиотика.

2.6. Механизмы, посредством которых cPAC потенцирует активность антибиотиков

Для определения механизмов, посредством которых cPAC потенцирует активность антибиотиков, мы количественно оценивали изменение проницаемости наружных мембран бактериальных клеток, используя 1-N-фенилнаптиламин (NPN) в качестве индикатора. Данные опыты показали, что cPAC увеличивает проницаемость наружных мембран бактериальных клеток (**Рисунок 5A-C**). Измерение активности эффлюксного насоса с использованием этидия бромида (EtBr) в качестве субстрата, являющегося флуоресцентным индикатором, показало, что, в отличие от снижения флуоресценции необработанных клеток (**Рисунок 5D-F**), флуоресценция клеток, обработанных cPAC или ингибитором эффлюксного насоса, карбонилцианид *m*-хлорфенил-гидразоном (**1**), не уменьшалась с течением времени по причине прекращения эффлюкса EtBr (**Рисунок 5D-F**). Описанные наблюдения показывают, что cPAC способен ингибировать эффлюксные насосы множественной лекарственной резистентности. Для дальнейшего изучения взаимодействия между cPAC и эффлюксными насосами множественной лекарственной резистентности мы использовали систематический анализ МИК для *P. aeruginosa* PA14 с мутациями эффлюксных насосов методом шахматной доски. Повышенная экспрессия систем эффлюксных насосов приводит к увеличению устойчивости к антибиотикам по сравнению с таковой у изолятов дикого типа, в то время как инактивирование белковых компонентов эффлюксных насосов связано с увеличением накопления антибиотиков внутри клеток и чувствительности к антибиотикам.⁽²⁹⁾ В настоящей статье мы показываем, что способность cPAC повышать активность TET коррелирует с активностью эффлюксного насоса. Мутантные штаммы с нефункционирующими эффлюксными насосами являлись более чувствительными к TET, чем штаммы дикого типа, при этом добавление cPAC не приводило к дополнительному увеличению активности TET. Таким образом, cPAC не потенцировал активность TET против мутантов с не функционирующим эффлюксным насосом (**Рисунок 5G**). Указанное отсутствие потенцирования TET хорошо коррелирует с потенцированием cPAC активности TET против дикого штамма *P. aeruginosa* PA14 с функционирующими эффлюксными насосами (**Рисунок 1C**). Интересно то, что cPAC не вызывал значимого повреждения мембран бактериальных клеток (**Рисунок 5H**) по сравнению со значимым ($P < 0,05$) разрушением мембраны цетилтриметиламмония бромидом (СТАВ), агентом, разрушающим клеточную мембрану, что свидетельствует о том, что увеличение проницаемости наружной мембраны и целевое специфическое ингибирование эффлюксного насоса достигается с помощью cPAC без нарушения целостности клеточной мембраны.



Надписи на рисунке:

µg/mL = мкг/мл

control = контроль

Biofilm = биопленка

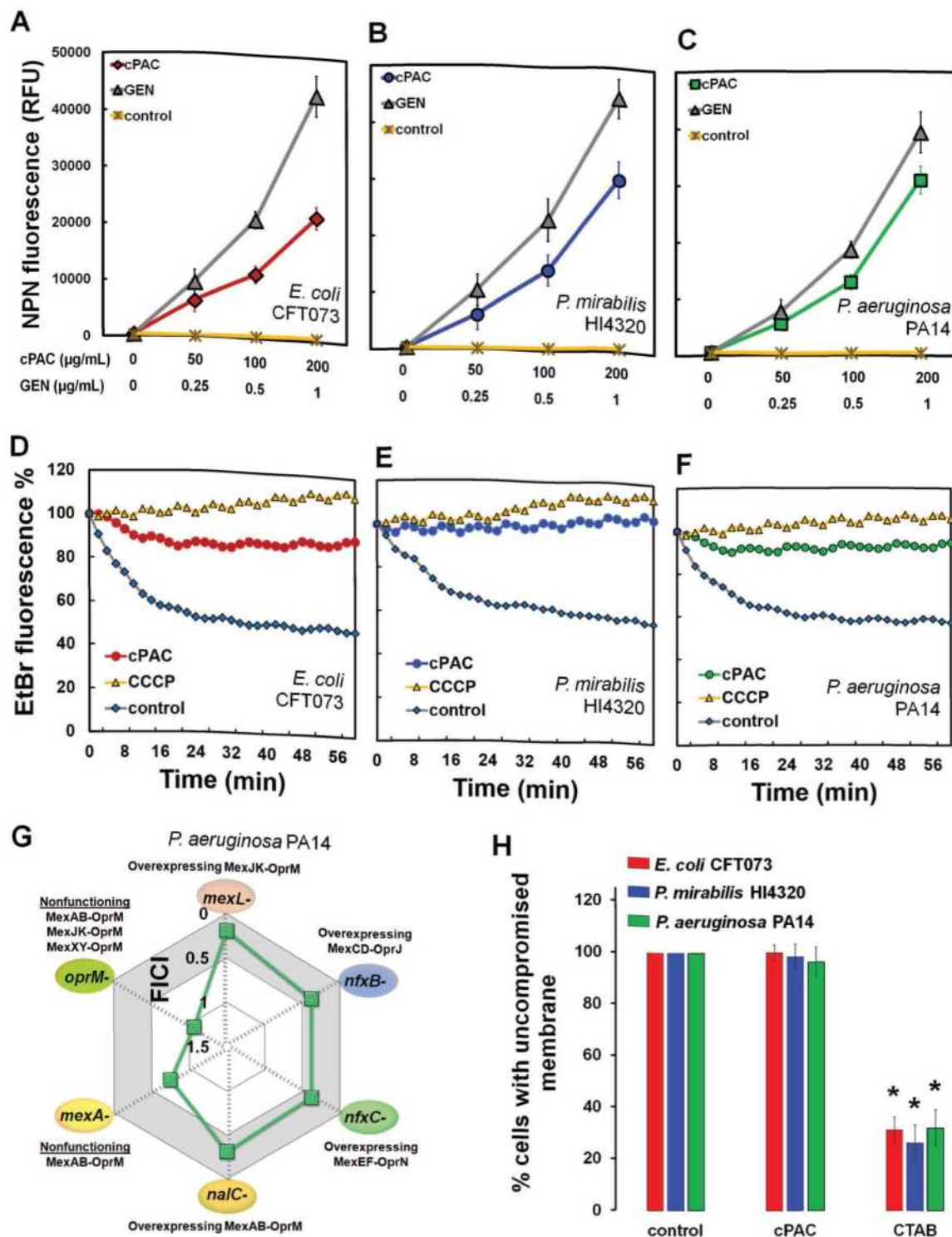
% Biofilm biomass = % биомассы биопленки

% Live cells = % живых клеток

Рисунок 4. Влияние только cPAC и в сочетании с SMX на формирование биопленки А) *E. coli* CFT073, В) *P. mirabilis* HI4320 и С) *P. aeruginosa* PA14. На диаграммах представлены нормализованные показатели плотности биопленки (оптическая плотность (OD)₅₇₀/клетка OD₆₀₀) при субингибирующих концентрациях SMX. Указаны статистически значимые отличия показателей каждого образца, обработанного cPAC и SMX, от показателей контроля (образцов, обработанных только соответствующей концентрацией SMX) (**, P < 0,01; *, P < 0,05; двусторонний дисперсионный анализ (ANOVA)), а также показателей образцов, обработанных cPAC и SMX, по сравнению с показателями образцов, обработанных той же концентрацией cPAC без SMX (*, P < 0,05; двусторонний ANOVA). D) Изображения биопленок *P. aeruginosa* PA14, выращенных с добавлением или без добавления cPAC и/или суб МИК SMX, полученные методом конфокальной микроскопии. Клетки зеленого цвета являются жизнеспособными клетками с неповрежденными мембранами, а клетки красного цвета являются мертвыми клетками. Каждое изображение выбрано в качестве наиболее показательного результата эксперимента, выполненных в трех повторностях. E) Биомасса биопленки в процентах от необработанной биомассы и F) процент живых клеток в каждой обработанной колонии определялся количественно на изображениях конфокальной микроскопии. На всех изображениях конфокальной микроскопии длина красной и зеленой оси составляет 100 мкм, а длина синей оси z составляет 10 мкм.

2.7. cPAC взаимодействует с компонентами эффлюксных насосов *in silico*

Для выяснения способности cPAC ингибировать активность эффлюксных насосов, мы провели анализ *in silico* стыковки белковых комплексов эффлюксного насоса AcrAB-TolC *E. coli* и MexAB-OprM *P. aeruginosa* с димерной молекулой cPAC типа А в качестве исследуемого лиганда. Домены компонентов эффлюксного насоса AcrAB-TolC и MexAB-OprM, связывающиеся с лигандами, обладают достаточным пространством для размещения молекулы cPAC со средним объемом 497,1 Å³ (Таблица S1, дополнительная информация). Мы оценили *in silico* структурное взаимодействие cPAC с компонентами выходного протока, адаптера и переносчика эффлюксных насосов (Рисунок 6А; Рисунок S6А-Г, дополнительная информация). Результаты анализа молекулярной стыковки cPAC с комплексом выходного протока позволяют предположить, что cPAC, по всей вероятности, связывается с экваториальным доменом выходного протока TolC (Рисунок 6А) и с доменом скрученного кольца выходного протока OprM (Рисунок S6А-С, дополнительная информация).



Надписи на рисунке:

RFU = единица относительной флуоресценции

µg/mL = мкг/мл

control = контроль

NPN fluorescence = флуоресценция NPN

EtBr fluorescence = флуоресценция EtBr

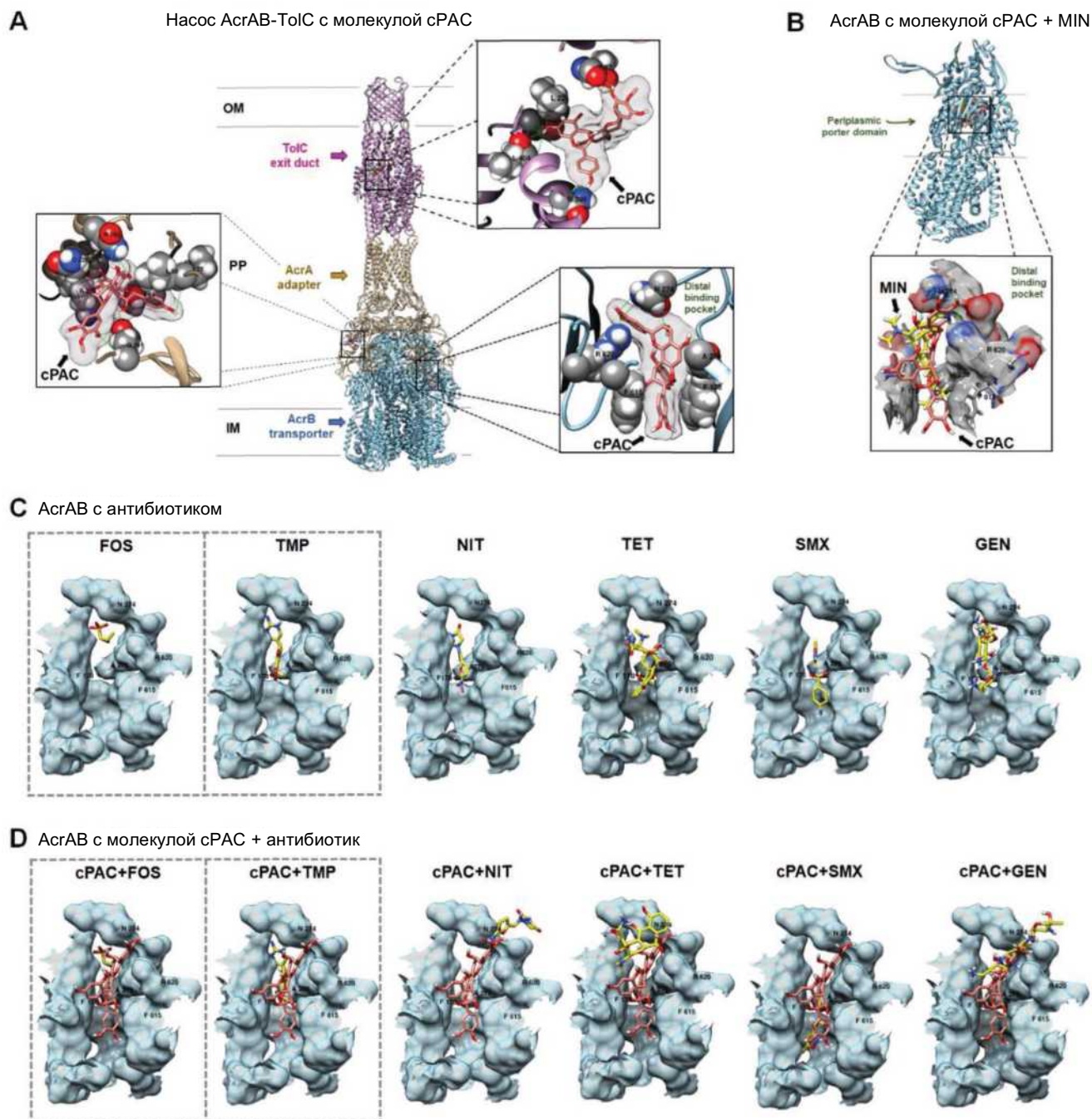
Time (min) = время (мин)

Overexpressing = повышенная экспрессия

Nonfunctioning = не функционирующий

% cells with uncompromised membrane = % клеток с неповрежденной мембраной

Рисунок 5. Механизмы, посредством которых сРАС, потенцирует активность антибиотиков. сРАС опосредует захват NPN А) *E. coli* CFT073, В) *P. mirabilis* HI4320, and С) *P. aeruginosa* PA14. Бактериальные клетки предварительно обрабатывались сРАС или гентамицином (Gen) для обеспечения захвата NPN. Контроль представляет собой флуоресценцию NPN в присутствии только сРАС без бактерий. Ингибирование полилекарственного эффлюксного насоса сРАС или известным ингибитором эффлюксного насоса СССР D) *E. coli* CFT073, Е) *P. mirabilis* HI4320 и F) *P. aeruginosa* PA14. Контролем являются необработанные бактерии. G) Определялась МИК *in vitro* комбинации сРАС с ТЕТ. Показаны значения FICI комбинации сРАС + ТЕТ для *P. aeruginosa* PA14 с мутацией эффлюксного насоса: *mexL*- (с повышенной экспрессией MexJK-ОргМ), *nfxB*- (с повышенной экспрессией MexCD-ОргJ), *nfxC*- (с повышенной экспрессией MexEF-ОргN), *nalC*- (с повышенной экспрессией MexAB-ОргМ), *mexA*- (с не функционирующим насосом MexAB-ОргМ) и *oprM*- (с не функционирующими насосами MexAB-ОргМ, MexJKОргМ и MexXY-ОргМ). Расположение FICI $\leq 0,5$ выделено серой зоной. H) Влияние сРАС на целостность клеточной мембраны. Клетки каждого штамма предварительно обрабатывались только сРАС или агентом, разрушающим клеточную мембрану, СТАВ. Соотношение зеленой и красной флуоресценции нормализовано по таковому у необработанного контроля и выражено в процентах от контроля. Все количественные анализы независимо повторялись три раза (* P <0,05; критерий Стьюдента).



Надписи на рисунке:

MIN = миноциклин

exit duct = выходной проток

adapter = адаптер

transporter = переносчик

Periplasmic porter domain = периплазматический портовый домен

Distal binding pocket = дистальный связывающий карман

Рисунок 6. Анализ молекулярной стыковки cPAC с эффлюксным насосом AcrAB-ToIC. А) Общий вид сбоку, на котором в форме лент показаны белковые комплексы эффлюксных насосов с пристыкованной молекулой cPAC типа A (димерная форма эпикатехина) на фоне плоскости мембраны грамотрицательной клетки (OM = наружная мембрана; PP = периплазматическое пространство); IM = внутренняя мембрана). На увеличенных вставках показана карта электронной плотности ($2F_0 - F_C$) cPAC в местах связывания с белками выходного протока, адаптера и переносчика полилекарственного эффлюксного насоса. Показаны аминокислотные остатки вокруг каждого места связывания, а также

все возможные водородные связи показаны в форме зеленых линий. На лентовидной схеме трехсоставного эффлюксного насоса цветами выделены: выходной проток TolC (розовый цвет), адаптер AcrA (золотистый цвет) и переносчик AcrB (синий цвет). В) На увеличенных вставках мономера AcrB показана стыковка молекулы cPAC (красного цвета) с дистальным связывающим карманом в сокристаллической структуре комплекса AcrB-MIN (углерод желтого цвета обозначает молекулу MIN, как она показана в кристаллической структуре наибольшего разрешения, PDB 4U8Y). С) Анализ молекулярной стыковки различных субстратов эффлюксного насоса (желтый цвет) к дистальному связывающему карману переносчика AcrB. D) На увеличенных вставках показано оптимальное положение связывания cPAC (красный цвет) и субстрата (желтый цвет) с дистальным связывающим карманом AcrB. Модели стыковки непотенцированных антибиотиков выделены пунктирной рамкой.

Результаты анализов молекулярной стыковки также прогнозируют, что cPAC может образовывать водородные связи с аминокислотными остатками (N274, A279 и R620) дистального кармана связывания с субстратом AcrB, которые являются критическими для связывания и переноса в выходной проток антибиотика/субстрата, а также правильного функционирования всего эффлюксного насоса (Рисунок 6A). cPAC показал наибольшее сродство к компонентам эффлюксного насоса AcrB и MexB с энергиями связывания $-9,9$ и $-9,6$ ккал/моль⁻¹, соответственно (Таблица S1, дополнительная информация).

Насос AcrAB-TolC выводит различные антибиотики. Тем не менее, сообщается о связывании с активным участком AcrB только сокристаллических структур миноциклина (MIN) и доксорубина.⁽³⁰⁾ Для того, чтобы сравнить связывание cPAC с таковым достаточно охарактеризованного субстрата эффлюксного насоса, мы пристыковали cPAC к дистальному карману связывания периплазматического портового домена AcrB, сокристаллизованного с MIN, и обнаружили, что cPAC и MIN связывались с одной и той же бороздой дистального кармана связывания субстрата (Рисунок 6B). Мы отдельно оценили предполагаемую стыковку субстратов AcrB, таких как FOS, TMP, NIT, TET, SMX и GEN, в отсутствие и в присутствии cPAC (Рисунок 6C, D). Все оцененные субстраты связываются с комплексом AcrB-cPAC, в частности, в той же борозде дистального связывающего кармана, в котором связывается MIN (Рисунок 6C). Интересно то, что на положение связывания FOS и TMP не влияло присутствие cPAC (Рисунок 6D), что согласуется с неспособностью cPAC потенцировать *in vitro* активность FOS или TMP против *E. coli* (Рисунок 1A). В противоположность к этому, мы наблюдали различные конформации связывания потенцированных антибиотиков NIT, TET, SMX и GEN в присутствии cPAC по сравнению с таковыми без cPAC (Рисунок 6C, D). Это говорит о том, что связывание cPAC в дистальном связывающем кармане приводит к ингибированию эффлюкса в результате взаимодействия с предпочтительным положением связывания потенцированных антибиотиков. И последнее, мы подтвердили, что конформация связывания cPAC в дистальном связывающем кармане AcrB аналогична конформации известных ингибиторов эффлюксного насоса (Рисунок S7A-F, дополнительная информация), что подтверждает гипотезу о том, что cPAC действует как мощный ингибитор эффлюксного насоса.

3. Обсуждение

Устойчивость к тетрациклину является достаточно документированным феноменом, причиной которого является активность эффлюксного насоса и развитие приобретенной устойчивости к антибиотикам.⁽³¹⁾ Мы обнаружили, что в присутствии cPAC полностью подавляется развитие устойчивости *E. coli* и *P. aeruginosa* к лечению TET. Таким образом, способность cPAC вмешиваться во внутренние механизмы резистентности позволяет предотвратить типично неизбежное в долгосрочной перспективе развитие приобретенной устойчивости к антибиотикам.

Мы показали, что *in vitro* cPAC увеличивает активность нескольких классов антибиотиков

против условно-патогенных для человека микроорганизмов, таких как *E. coli*, *P. mirabilis* и *P. aeruginosa*. Указанное потенцирование также наблюдается *in vivo*, по меньшей мере, такого антибиотика, как SMX. cPAC является особенно многообещающим агентом, потенцирующим антибиотики, по причине отсутствия у него собственной антимикробной активности. Агенты, которые не подавляют жизнеспособность патогенных бактерий, с меньшей вероятностью могут способствовать развитию резистентности, чем обычные антибиотики,⁽³²⁻³⁴⁾ поэтому они особенно хорошо подходят в качестве дополнения к лечению антибактериальными средствами. В соответствии с этим мы не наблюдали развития какой-либо устойчивости к cPAC.

Биопленки являются фактором хронических бактериальных инфекций, а также часто приводят к неэффективности лечения антибиотиками.^(35,36) Персистирующие и устойчивые к антибиотикам клетки тесно связаны с образованием биопленки,⁽⁵⁾ а также играют важную роль в обострении хронических инфекций. Сообщается о том, что фракция проантоцианидина клюквы в отдельности⁽¹⁹⁾ и в сочетании с ципрофлоксацином⁽³⁷⁾ подавляет кворумную сигнализацию микроорганизмов. Так как кворумная сигнализация необходима для нормального формирования биопленки, это согласуется с нашими наблюдениями о том, что cPAC в сочетании с антибиотиком значительно подавляет образование биопленки. Кроме того, мы предполагаем, что именно способность cPAC действовать не только на активно метаболизирующие, но и дормантные клетки, подвергшиеся воздействию антибиотиков, позволяет cPAC потенцировать активность антибиотиков против биопленок.

Механизмы внутренней резистентности к антибиотикам бактериальных клеток представляют собой естественные феномены, обнаруженные у бактерий, которые затрудняют лечение антибактериальными средствами. Например, *P. mirabilis* обладает внутренней устойчивостью к NIT и TET, а *P. aeruginosa* обладает внутренней устойчивостью к нескольким классам антибиотиков, включая аминогликозиды, β -лактамы, хинолоны и полимиксины.^(38,39) К внутренним механизмам резистентности относятся избирательная проницаемость внешней мембраны, неэффективный перенос антибиотиков и активный полилекарственный эффлюкс.^(40,41) Эффлюксные насосы AcrAB-TolC^(42,43) и MexAB-OprM⁽⁴⁴⁾ из семейства резистентности-клубнеобразования-разделения хорошо известны своей важностью для выживания бактерий и внутренней устойчивости к антибиотикам. Результаты нашего анализа *in silico* прогнозируют, что димерная молекула cPAC типа A (которая является основной концевой единицей фракции cPAC,⁽⁴⁵⁾) может занимать лиганд-связывающий карман переносчика AcrB у *E. coli* и переносчика MexB у *P. aeruginosa*.^(43, 44,46) Результаты расчетов молекулярной стыковки показывают, что из всех антибиотиков, активность которых оценивалась против *E. coli*, два непотенцированных антибиотика занимают одинаковое положение в дистальном связывающем кармане в присутствии и в отсутствие cPAC. В противоположность к этому, прогнозируется, что потенцированные антибиотики занимают другое положение связывания в присутствии cPAC, что будет препятствовать их эффлюксу из клетки. В условиях *in vitro* cPAC усиливал проницаемость мембран и уменьшал активность эффлюксного насоса у всех оцененных бактерий дикого типа. Неспособность cPAC усиливать активность антибиотиков против мутантов с дефектным эффлюксным насосом, подтверждает гипотезу о том, что специфическое действие cPAC на эффлюкс, является критическим для наблюдаемого усиления активности антибиотиков. Ранее было показано, что подавление активности эффлюксного насоса затрудняет формирование биопленки⁽⁴⁷⁾ и уменьшает патогенность⁽⁴⁸⁾ грамотрицательных бактерий. Это согласуется с нашими наблюдениями о том, что в

присутствии сРАС уменьшается образование биопленки. В целом, настоящее исследование подтверждает представленную концепцию и сформировало отправную точку для изучения молекулярного механизма описанного ингибирования сРАС эффлюксного насоса у бактерий.

В связи с тем, что у насекомых относительно развита систему противомикробной защиты, данная животная модель часто используется для получения информации об инфекционном процессе у млекопитающих.⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾ В обеих моделях инфекции, использованных в настоящем исследовании, доза сРАС 50 мкг/мл⁻¹ являлась достаточной для усиления активности оцененных антибиотиков и значимого увеличения выживаемости насекомых, инфицированных *P. aeruginosa*. Результаты указанных исследований *in vivo* открывают многообещающие перспективы для потенциальной разработки в будущем сРАС в качестве агента, потенцирующего активность антибиотиков у высших организмов. Тем не менее, лишь в немногих исследованиях представлена информация о безопасности сРАС для клеток человека⁽⁵¹⁾ или его биодоступности, а также скорости клиренса у животных.⁽⁵²⁾ В связи с этим, необходима дополнительная оценка эффективности и безопасности комбинированного лечения у млекопитающих *in vivo* (например, у мышей). Обнадуживает то, что согласно нашим данным сРАС способен повышать эффективность широкого спектра антибиотиков. Способность усиливать действие антибиотиков у пациентов может привести к улучшению результатов лечения и препятствовать появлению инфекций, устойчивых к антибиотикам.

4. Экспериментальная часть

Штаммы бактерий, условия культивирования и проантоцианидин клюквы. Штаммы условно-патогенных бактерий, использованные в настоящем исследовании: *E. coli* CF7073 (ATCC 700928), *P. mirabilis* H14320,⁽⁵³⁾ *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692), and *P. aeruginosa* PA14 (UCBPP-PA14).⁽⁵⁴⁾ Мутантные штаммы *P. aeruginosa* PA14, использованные в настоящем исследовании: *mexL*- (с повышенной экспрессией MexJK-ОргМ),⁽⁵⁵⁾ *nfxB*- (с повышенной экспрессией MexCD-ОргJ),⁽⁵⁵⁾ *nfxC*- (с повышенной экспрессией MexEF-ОргN),⁽⁵⁶⁾ *nalC*- (с повышенной экспрессией MexAB-ОргM),⁽⁵⁵⁾ *mexA*- (с нефункционирующим насосом MexAB-ОргM),⁽⁵⁵⁾ и *oprM*- (с не функционирующими насосами MexAB-ОргM, MexXY-ОргM и MexJK-ОргM).⁽⁵⁵⁾ Чистые исходные культуры хранились при температуре -80°C в 30% (объем/объем) замороженном растворе глицерина. Стартовые культуры готовились путем посева замороженных культур на агар с лизогенным бульоном (бульон LB, состоящий из 10 г/л⁻¹ триптона, 5 г/л⁻¹ дрожжевого экстракта и 5 г/л⁻¹ NaCl с добавлением 1,5% (масса/объем) агара («Фишер Сайентифик», провинция Онтарио, Канада)). После инкубации в течение ночи при температуре 37°C в одну колонию инокулировали 10 мл бульона Мюллера-Финтона с добавлением Ca²⁺ и Mg²⁺ (МНВ-II; «Оксид», «Фишер Сайентифик», Канада), после чего культуру инкубировали при 37°C на орбитальном шейкере при 200 об/мин в течение периода времени, определенного для каждого эксперимента. Бульон LB использовался для культивирования бактерий во всех экспериментах, если не указано иное. Очищенный проантоцианидин, выделенный из клюквы (сРАС, 93% проантоцианидинов, 7% антоцианинов и мономеров флавоноидов), получен из компании «Оушен Спрей Кранберри Инк.». Поставщик приготовил образец в соответствии с достаточно известными методами^(11, 57) путем обогащения экстракта из плодов клюквы. Сухой порошок сРАС растворялся в деионизированной воде и стерилизовался методом фильтрации (через мембранный фильтр из поливинилиденфторида (PVDF) с размером пор 0,22 мкм).

Определение МИК. МИК определялась путем приготовления двукратных серийных разведений сРАС и антибиотиков в бульоне МНВ-II. Диапазон концентрации антибиотиков (0,0003-1024 мкг/мл⁻¹) выбран на основании их известной активности против всех четырех штаммов бактерий. Рост колоний бактерий оценивался i) методом мониторинга размножения клеток (определяемого как появление осадка и мутности) в лунках,⁽⁵⁸⁾ ii) методом мониторинга оптической плотности клеточной суспензии в каждой лунке для света с длиной волны 600 нм (OD₆₀₀) и iii) методом анализа с использованием микротитровального планшета и резазурина.⁽⁵⁹⁾ Дополнительные данные представлены в дополнительной информации.

Анализ инфекции in vivo у мух D. melanogaster. Плодовые мухи (*D. melanogaster*) инфицировались путем введения возбудителей внутрь по методу анализа кормления мух, в котором мухи анестезировались,

выдерживались без доступа к пище и воде в течение нескольких часов и разделялись на флаконы с дисками фильтровальной бумаги, инокулированными свежими культурами *P. aeruginosa* PA14, и 5% сахарозным агаром (стерильным) с и без 50 мкг/мл⁻¹ сРАС отдельно или в сочетании с 256 мкг/мл⁻¹ SMX. В течение 14 дней после инфицирования ежедневно определялась смертность мух. Каждое лечение оценивалось два раза в трех повторностях. Дополнительные данные представлены в дополнительной информации.

Анализ инфекции in vivo у личинок Galleria mellonella. Двадцати личинкам *G. mellonella* из каждой группы лечения инъецировались активные культуры *P. aeruginosa*. Все инъецированные личинки инкубировались в чашках Петри при 28°C и относительной влажности 30% без доступа света. Ежедневно после инфицирования подсчитывалось количество мертвых личинок. Личинки считались мертвыми, если отсутствовали признаки жизни в ответ на прикосновение с последующим усилением меланизации. Дополнительные данные представлены в дополнительной информации.

Количественный анализ биопленок. Количественно определялось образование биопленки с использованием стандартной модели планшета для микротитрования⁽⁶⁰⁾ и окрашивания кристаллическим фиолетовым, которая подробно описана в Приложении S1 (дополнительная информация). Для визуализации и анализа, биопленки выращивались в течение 16 ч при 37°C в статических условиях, после чего смывались планктонные клетки. Непроницаемый для клеточной мембраны флуоресцентный краситель ТОГО-1 («Термо Фишер») и проницаемый для мембраны краситель SYTO 60 («Термо Фишер») добавлялись до конечных рабочих концентраций 2×10^{-6} и 10×10^{-6} М, соответственно.⁽⁶¹⁾ Биопленки визуализировались в виде z-стеков с использованием объектива 63x на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Zeiss 800. Как описано в дополнительной информации, живые клетки окрашивались в зеленый цвет, а мертвые клетки окрашивались в красный цвет.

Модифицированный диск-диффузионный анализ. Модифицированный диск-диффузионный анализ⁽⁶²⁾ использовался для оценки восстановления клеток, подвергшихся воздействию антибиотика. Настоящий модифицированный диск-диффузионный анализ проводился в два этапа. Этап 1 являлся таким же, как и в классическом диск-диффузионном анализе, а этап 2 был незначительно модифицирован. В кратком изложении, бактериальная культура, которая инкубировалась в течение ночи (бульон MFIB-II, 37°C, 200 об/мин), разбавлялась свежим бульоном MFIB-II до 106 КОЕ мл⁻¹ и высевалась на чашку с агаром MFIB-II. Этап 1. Имеющийся в продаже диск с антибиотиком ТЕТ 30 мкг или MIN 30 мш («Термо Сайентифик Оксайд», «Фишер Сайентифик», Канада) помещался на поверхность инокулированного агара, после чего чашка инкубировалась при 37°C в течение 18 часов. Изготавливались оригинальные диски из стерильных чистых дисков («Термо Сайентифик Оксайд», «Фишер Сайентифик», Канада) путем добавления 400 мкг глюкозы или 400 мкг сРАС с 400 мкг глюкозы или без глюкозы с дальнейшей сушкой при комнатной температуре. Этап 2. Диски с антибиотиком осторожно заменялись на оригинальные диски с глюкозой или сРАС или их комбинацией, после чего чашка инкубировалась при 37°C в течение дополнительных 18 часов.

Анализ развития резистентности. Для оценки *in vitro* развития резистентности с помощью стандартной методики последовательного пересева^(63, 64) клетки *E. coli* CFT073 и *P. aeruginosa* PA14 выращивались до экспоненциальной фазы в среде МНВ-II при 37°C. МИК определялась путем приготовления двукратных серийных разведений в 96-луночных планшетах для микротитрования. В каждую лунку инокулировался нужный штамм бактерий, после чего планшет инкубировался при 37°C в течение 18 ч в статических условиях. Рост бактериальных колоний оценивался i) методом мониторинга разномониторинга клеток (определяемого как появление осадка и мутности) в лунках,⁽⁵⁸⁾ ii) методом мониторинга оптической плотности клеточной суспензии в каждой лунке для света с длиной волны 600 нм (OD₆₀₀). Бактериальная суспензия с суб-МИК (0,5 × МИК) ТЕТ, сРАС, или сРАС + ТЕТ использовалась для приготовления инокулята с целью определения МИК на следующий день путем разбавления до конечной концентрации ~10⁶ КОЕ мл⁻¹ в бульоне МНВ-II. Описанная процедура пересева повторялась 21 раз. Каждый день определялось соотношение МИК, измеренной в текущий день, к МИК в день 0 (первого воздействия). Данные получались в форме относительного кратного увеличения МИК каждый день или после каждого пересева. Проводились два эксперимента с использованием биологически независимого материала.

Анализ увеличения проницаемости и целостности мембран. Влияние сРАС на проницаемость наружных мембран определялось с помощью анализа NPN («Сигма-Олдрич» Канада),⁽⁶⁵⁾ с некоторыми модификациями. После инкубации в течение ночи бактериальные культуры разводились 1:1 средой МНВ-II до конечного объема 10 мл с добавлением или без добавления сРАС или GEN (положительный контроль), после чего инкубировались до OD₆₀₀ 0,5-0,6 (37°C, 200 об/мин). Клетки собирались, промывались и ресуспендировались в буфере 4- (2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (FIEPES), содержащем 1×10^{-3} моль N-этилмалеимида (NEM; «Сигма-Олдрич», Канада). Аликвоты смешивались с NPN до конечной концентрации 10×10^{-6} М (в суспензии клеток), после чего измерялась флуоресценция с использованием считывающего устройства для микропланшетов (возбуждение: 350 нм; излучение: 420 нм).

Для оценки повреждения клеточной мембраны использовался набор BacLight (L-13152; «Инвитроген», «Лайф Технолоджис Инк.», Канада).⁽⁶⁶⁾ Показатели флуоресценции нормализовались по значениям необработанного контроля для определения соотношения доли клеток с поврежденной мембраной к доле клеток с неповрежденной мембраной. Дополнительные данные представлены в дополнительной информации.

Анализ эффлюкса EtBr. Для оценки влияния cPAC на ингибирование полилекарственного протонного насоса проводился анализ эффлюкса EtBr.⁽⁶⁷⁾ Культура каждого штамма после ночной инкубации разбавлялась 1:100 в бульоне MFIB-II до конечного объема 10 мл, и далее инкубировалась до OD₆₀₀ 0,8-1,0 (при 37°C, 150 об/мин). Клетки переносились в полистироловые микроцентрифужные пробирки (2 мл) и смешивались с 5×10^{-6} М EtBr и cPAC при 25% МИК или с протонным проводником СССР в концентрации 100×10^{-6} М («Сигма-Олдрич», Канада) в качестве положительного контроля. Пробирки с образцами без cPAC или протонного проводника использовались в качестве отрицательного контроля. Пробирки инкубировались в течение 1 часа (37°C, 150 об/мин). Затем инокулят доводился до OD₆₀₀ 0,4 путем разбавления бульоном МНВ-II, содержащим 5×10^{-6} М EtBr. 2 мл этой смеси подвергались осаждению (5000 x g, 10 мин, 4°C). Осадок немедленно переносился на лед и ресуспендировался в 1 мл МНВ-II, после чего аликвоты (200 мкл) переносились в полистироловый 96-луночный планшет черного цвета с прозрачным дном («Корнинг», «Фишер Сайентифик», Канада). Эффлюкс EtBr из клеток измерялся при комнатной температуре с использованием считывающего устройства для микропланшетов (длина волны возбуждения 530 нм; длина волны излучения 600 нм). Показатели регистрировались с интервалами 5 минут в течение 1 ч для определения активности эффлюксного насоса. Из всех показателей вычиталась фоновая флуоресценция среды. Проводились три независимых анализа.

Анализ стыковки in silico. Для прогнозирования участков связывания лигандов на целевых белковых структурах использовались сервер 3DLigandSite и автоматический метод поиска в библиотеке химических структур для выявления гомологичных веществ со связанными лигандами.⁽⁵⁸⁾ Эти связанные лиганды накладывались на целевую структуру белка для определения участка связывания с лигандом. Стыковка *in silico* проводилась с использованием инструмента Autodock Vina без включения молекул воды.⁽⁶⁹⁾ Результаты анализа стыковки *in silico* с помощью Autodock Vina сравнивались с данным веб-сервиса SwissDock (<http://www.swissdock.ch/>) для подтверждения точности и надежности характеристик прогнозируемых стыковочных комплексов. Методы стыковки лигандов описаны в дополнительной информации.

Статистический анализ. Там, где указано, для определения значимого отличия показателей cPAC от контроля использовался двусторонний критерий Стьюдента ($P < 0,05$). В анализе биопленки для определения статистической значимости различий в количестве биомассы использовался двусторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с последующими множественными сравнениями по методу Сидака. С помощью программы Graph Pad Prism 6 («Граф Пад Софтвеар Инк.», Сан-Диего, Калифорния) строились кривые выживаемости плодовых мух для проведения статистического анализа с использованием логрангового критерия (Мантеля-Кокса). Во всем тексте все описанные изменения (увеличение или уменьшение) являлись статистически значимыми. Статистически незначимые различия в тексте не упоминаются.

Полное описание методов. Подробное описание процедур и методов представлено в дополнительной информации.

Дополнительная информация

Дополнительную информацию можно получить в онлайн-библиотеке компании «Вайлей» или у автора.

Выражение признательности

Авторы благодарят С. Khoo («Оушен Спрей Кранберриз Инк.») за предоставление очищенного образца cPAC; М.-С. Groleau за техническую помощь в проведении экспериментов *in vivo* и полезные обсуждения; Е. Curling, J. Johnson и P. Sundaram за техническую помощь в предварительном скрининге потенцирования антибиотиков *in vitro*; и отдел новых методов визуализации в Университете Макгилла за предоставленную возможность использования конфокального микроскопа. Настоящее исследование финансировалось Советом естественных и технических исследований Канады (NSERC) и компаний «Оушен Спрей Кранберриз Инк.». N.T. является заведующей Канадской кафедры исследований биологических коллоидов, E.D. является заведующим Канадской кафедры социо-микробиологических исследований. V.V.M., E.D. и N.T. являются разработчиками экспериментов. V.V.M. проводил эксперименты *in vitro*, *in vivo* и по стыковке *in silico*, а также проводил анализ полученных результатов. M.O. выполняла конфокальную лазерную сканирующую микроскопию и анализ изображений биопленки. V.V.M. писал текст статьи, который затем

рецензировали М.О., N.T. и E.D.

Конфликт интересов

Nathalie Tufenkji и Vimal B. Maisuria подали заявку на патент (WO 2017/096484) по использованию фенольных соединений, полученных из клюквы, в качестве агента, синергично увеличивающего активность антибиотика против патогенных бактерий. Патентная заявка в настоящее время находится на рассмотрении в Ведомстве по патентам и товарным знакам США (USPTO), в которой оба автора указаны в качестве изобретателей. Все авторы заявляют, что у них нет других конфликтов интересов.

Ключевые слова

анти-биопленка, антимикробный, эффлюксный насос, множественная лекарственная устойчивость, потенцирование

Поступила в редакцию: 25 декабря 2018 года

Изменена: 3 апреля 2019 года

Опубликована онлайн:

-
- [1] J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, *Science* **1999**, 284, 1318.
 - [2] J. C. Kester, S. M. Fortune, *Git. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, 49, 91.
 - [3] K. Lewis, *Nat. Rev Microbiol.* **2007**, 5, 48.
 - [4] D. Davies, *Nat. Rev Drug Discovery* **2003**, 2, 114.
 - [5] R. A. Fisher, B. Gollan, S. Helaine, *Nat. Rev Microbiol.* **2017**, 15, 453.
 - [6] N. R. Blatherwick, *Arch. Intern. Med.* 1914, 74, 409.
 - [7] J. K. Crellin, J. Philpott, A. L. T. Bass, *A Reference Guide to Medicinal Plants*, Duke University Press, Durham, NC, USA **1990**.
 - [8] I. A. Eydelnant, N. Tufenkji, *Langmuir* **2008**, 24, 10273.
 - [9] N. Tufenkji, O. J. Rifai, K. Harmidy, I. A. Eydelnant, *Food Res. Int.* **2010**, 43, 922.
 - [10] K. Gupta, M. Y. Chou, A. Flowell, C. Wobbe, R. Grady, A. E. Stapleton, *J. Urol.* 2007, 777, 2357.
 - [11] A. B. Howell, J. D. Reed, C. G. Krueger, R. Winterbottom, D. G. Cunningham, M. Leahy, *Phytochemistry* 2005, 66, 2281.
 - [12] M. Chan, G. Hidalgo, B. Asadishad, S. Almeida, N. Muja, M.S. Mohammadi, S. N. Nazhat, N. Tufenkji, *Colloids Surf., B* 2013, 770, 275.
 - [13] G. Hidalgo, M. Chan, N. Tufenkji, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 77, 6852.
 - [14] J. McCall, G. Hidalgo, B. Asadishad, N. Tufenkji, *Can. J. Microbiol.* **2013**, 59, 430.
 - [15] C. O'May, A. Ciobanu, H. Lam, N. Tufenkji, *Biofouling* **2012**, 28, 1063.
 - [16] C. O'May, N. Tufenkji, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 77, 3061.
 - [17] R. K. Ulrey, S. M. Barksdale, W. Zhou, M. L. van Hoek, *BMC Complementary Altern. Med.* **2014**, 74, 499.
 - [18] G. Hidalgo, A. Ponton, J. Fatissou, C. O'May, B. Asadishad, T. Schinner, N. Tufenkji, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 77, 1532.
 - [19] V. B. Maisuria, Y. L. Los Santos, N. Tufenkji, E. Deziel, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 30169.
 - [20] P. Di Martino, R. Agniel, K. David, C. Templer, J. L. Gaillard, P. Denys, H. Botto, *World J. Urol.* **2006**, 24, 21.
 - [21] R. G. Jepson, G. Williams, J. C. Craig, *Cochrane Database Syst. Rev* 2012, 70, Cd001321.
 - [22] J. P. Lavigne, G. Bourg, C. Combescure, H. Botto, A. Sotto, *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, 74, 350.
 - [23] Y. Liu, M. A. Black, L. Caron, T. A. Camesano, *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, 93, 297.
 - [24] R. Raz, B. Chazan, M. Dan, *Clin. Infect. Dis.* **2004**, 38, 1413.
 - [25] A. B. Howell, *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, 57, 732.
 - [26] M. S. Diarra, G. Block, H. Rempel, B. D. Oomah, J. Harrison, J. McCallum, S. Boulanger, È. Brouillette, M. Gattuso, F. Malouin, *BMC Complementary Altern. Med.* **2013**, 73, 90.
 - [27] The Selection and Use of Essential Medicines, Report of the WHO Expert Committee (including the 20th WHO Model List of Essential Medicines and the 6th WHO Model List of Essential Medicines for Children), WHO technical report series; report no. 1006, World Health Organization, Geneva **2017**, pp. 62-1 72.
 - [28] L. Ejim, M. A. Farha, S. B. Falconer, J. Wildenhain, B. K. Coombes, M. Tyers, E. D. Brown, G. D. Wright, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 348.
 - [29] L. Pumbwe, L. J. Piddock, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 2861.
 - [30] T. Eicher, M. A. Seeger, C. Anselmi, W. Zhou, L. Brandstatter, Verrey, K. Diederichs, J. D.

- Faraldo-Gómez, K. M. Pos, *Elife* **2014**, 3, <https://doi.org/10.7554/eLife.03145.002>.
- [31] Y. Morita, J. Tomida, Y. Kawamura, *Front. Microbiol.* **2014**, 4, 422.
- [32] B. Lesic, F. Lepine, E. Deziel, J. Zhang, Q. Zhang, K. Padfield, M. H. Castonguay, S. Milot, S. Stachel, A. A. Tzika, R. G. Tompkins, G. Rahme, *PLoS Pathog.* **2007**, 3, 1229.
- [33] T. R. Shryock, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, 2, 425.
- [34] D. A. Rasko, V. Sperandio, *Nat. Rev Drug Discovery* 2010, 9, 11 7.
- [35] M. Rhen, S. Eriksson, M. Clements, S. Bergstrom, S. J. Normark, *Trends Microbiol.* **2003**, 77, 80.
- [36] S. S. Grant, D. T. Hung, *Virulence* **2013**, 4, 273.
- [37] A. Vadekeetil, V. Alexandar, S. Chhibber, K. Harjai, *Microb. Pathog.* **2016**, 90, 98.
- [38] C. M. O'Hara, F. W. Brenner, J. M. Miller, *Clin. Microbiol. Rev* **2000**13, 534.
- [39] M. Bassetti, A. Vena, A. Croxatto, E. Righi, B. Guery, *Drugs Context* **2018**, 7, 212527.
- [40] J. M. Blair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu, L. J. Piddock, *Nat. Rev Microbiol.* **2015**, 73, 42.
- [41] G. Cox, G. D. Wright, *Int.J. Med. Microbiol.* **2013**, 303, 287.
- [42] D. Du, Z. Wang, N. R. James, J. E. Voss, E. Klimont, T. Ohene-Agyei, H. Venter, W. Chiu, B. F. Luisi, *Nature* **2014**, 509, 512.
- [43] Z. Wang, G. Fan, C. F. Hryc, J. N. Blaza, I. I. Serysheva, M. F. Schmid, W. Chiu, B. F. Luisi, D. Du, *Elife* **2017**, 6, <https://doi.org/10.7554/eLife.24905.001>.
- [44] R. Nakashima, K. Sakurai, S. Yamasaki, K. Hayashi, C. Nagata, K. Hoshino, Y. Onodera, K. Nishino, A. Yamaguchi, *Nature* **2013**, 500, 102.
- [45] L. Y. Foo, Y. Lu, A. B. Howell, N. Vorsa, *Phytochemistry* **2000**, 54, 173.
- [46] A. V. Vargiu, P. Ruggerone, T. J. Opperman, S. T. Nguyen, H. Nikaido, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58, 6224.
- [47] M. Kvist, V. Hancock, P. Klemm, *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 7376.
- [48] L. J. Piddock, *Nat. Rev Microbiol.* **2006**, 4, 629.
- [49] J. Glavis-Bloom, M. Muhammed, E. Mylonakis, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, 770, 11.
- [50] D. O'Callaghan, A. Vergunst, *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, 73, 79.
- [51] S. Tanabe, J. Santos, V. D. La, A. B. Howell, D. Grenier, *Molecules* **2011**, 76, 2365.
- [52] R. Rajbhandari, N. Peng, R. Moore, A. Arabshahi, J. M. Wyss, S. Barnes, J. K. Prasain, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 6682.
- [53] H. L. Mobley, J. W. Warren *J. Clin. Microbiol.* **1987**, 25, 2216.
- [54] L. G. Rahme, E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins, M. Ausubel, *Science* **1995**, 268, 1899.
- [55] N. T. Liberati, J. M. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, E. Drenkard, Wu, J. Villanueva, T. Wei, F. M. Ausubel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 703, 2833.
- [56] M. G. Lamarche, E. Deziel, *PLoS One* **2011**, 6, e24310.
- [57] M. A. Martin, S. Ramos, R. Mateos, J. P. J. Marais, Bravo-Clemente, C. Khoo, L. Goya, *Food Res. Int.* **2015**, 77, 68.
- [58] Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, CLSI document M07-A8, Approved Standard, 7th ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA **2009**, pp. 18-20.
- [59] J. C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 2720.
- [60] J. Rosenblatt, R. Reitzel, T. Dvorak, Y. Jiang, R. Y. Hachem, I. I. Raad, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, 57, 3555.
- [61] M. Okshevsky, R. L. Meyer, *J. Microbiol. Methods* **2014**, 705, 102.
- [62] O. Gefen, B. Chekol, J. Strahilevitz, N. Q. Balaban, *Sci. Rep.* **2017**, 7, 41284.
- [63] X. Yang, S. Goswami, B. K. Gorityala, R. Domalaon, Y. Lyu, Kumar, G. G. Zhanel, F. Schweizer, *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 3913.
- [64] L. L. Ling, T. Schneider, A. J. Peoples, A. L. Spoering, I. Engels, P. Conlon, A. Mueller, T. F. Schaberle, D. E. Hughes, S. Epstein, M. Jones, L. Lazarides, V. A. Steadman, D. R. Cohen, C. R. Felix, K. A. Fetterman, W. P. Millett, A. G. Nitti, A. M. Zullo, C. Chen, K. Lewis, *Nature* **2015**, 577, 455.
- [65] T. J. Falla, D. N. Karunaratne, R. E. Hancock, *J. Biol. Chem.* **1996**, 277, 19298.
- [66] L. Boulou, M. Prevost, B. Barbeau, J. Coallier, R. Desjardins, *J. Microbiol. Methods* **1999**, 37, 77.
- [67] V. B. Maisuria, Z. Hosseinidoust, N. Tufenkji, *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, 87, 3782.
- [68] M. N. Wass, L. A. Kelley, M. J. Sternberg, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, W469.
- [69] O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2010**, 37, 455.