

© Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., 2019

УДК 579.843.1:577.1

ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ НА ХОЛЕРНЫЙ ВИБРИОН
(НА ПРИМЕРЕ ВЕЩЕСТВА АЦЕТИЛ-N-ЦИСТЕИНА-L)

О.В. Дуванова, Б.Н. Мишанькин

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора,
ул. Горького, д. 117/40, г. Ростов-на-Дону, 344002, Россия

Изучено действие вещества ацетил-N-цистеина-L на холерный вибрион. Его минимальная подавляющая концентрация для штаммов *Vibrio cholerae* El Tor O1 и O139 серогрупп составила 1–2,5 мг/мл на плотных питательных средах – агаре Мартена (рН 7,6) и LB (рН 7,2), тогда как на синтетической среде Бхаскарана с использованием в качестве единственного источника углерода 0,1 % глюкозы, 0,05 % N-ацетил-β-D-глюкозамина или коллоидного хитина (0,027 %) она снижалась до 50–250 мкг/мл. Обнаружена способность вещества ацетил-N-цистеина-L подавлять активность очищенного фермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (хитобиазы). Выявленное антибактериальное действие вещества ацетил-N-цистеина-L в отношении штаммов *Vibrio cholerae* El Tor O1 и O139 серогрупп с разной эпидемической значимостью (наличие/отсутствие генов *ctxAB* и *tcpA*) указывает на целесообразность рассмотрения вопроса о возможности включения этого вещества в состав компонентов растворов, используемых при регидратационной терапии случаев диареегенных заболеваний.

Ключевые слова: *V. cholerae*, штаммы, N-ацетил-L-цистеин, N-ацетил-β-D-глюкозаминидазная активность, 4-метилумбеллиферил-N-ацетил-β-D-глюкозаминид (4-MUF.GlcNAc).

O.V. Duvanova, B.N. Mishan'kin □ ESTIMATION OF ANTIBACTERIAL EFFECT ON VIBRIO CHOLERAЕ (ON THE EXAMPLE OF THE SUBSTANCE ACETYL-N-CYSTEINE-L) □ Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, 117/40 Gorky Str., Rostov-on-Don, 344002, Russia.

We studied the effect of the substance acetyl-N-cysteine-L on cholera *Vibrio*. Its minimum inhibitory concentration for the strains of *Vibrio cholerae* El Tor O1 and O139 serogroup was 1–2.5 mg/ml in solid nutrient media - Martin's agar (pH 7.6) and LB (pH 7.2), while in Bhaskaran synthetic medium, using glucose (0.1 per cent) as the sole carbon source, N-acetyl-β-D-glucosamine (0.05 per cent) or colloidal chitin (0.027 per cent) it was reduced to 50–250 µg/ml. The ability of the substance acetyl-N-cysteine-L substance to suppress the activity of the purified enzyme N-acetyl-β-D-glucosaminidase (chitobiasis) was found. Antibacterial effect detected of the substance acetyl-N-cysteine-L against the strains of *Vibrio cholerae* El Tor O1 and O139 serogroups with different epidemic significance (presence / absence of *ctxAB* and *tcpA* genes) indicates the advisability of considering the issue on the possibility of including this substance in composition of solution components used in the rehydration therapy of diarrheal diseases.

Key words: *V. cholera*, strains, acetyl-N-cysteine-L, N-acetyl-β-D-glyukozaminidase activity, 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (4-MUF.GlcNAc).

Ацетил-N-цистеин-L (C₅H₉NO₃S) – ацилированная тиолсодержащая аминокислота (предшественник L-цистеина и глутатиона). Ацетилцистеин является основным действующим веществом некоторых препаратов, широко применяемых в различных областях медицины [1, 6, 11, 15]. В связи с расшифрованным механизмом действия и обнаруженными свойствами открываются новые области и перспективы его применения. Несмотря на то что в ряде экспериментальных и клинических исследований обнаружены антибактериальные свойства ацетил-N-цистеина-L для некоторых микроорганизмов [14] и выявлена его способность уменьшать адгезию некоторых возбудителей к слизистым оболочкам, оказывая прямое разрушающее воздействие на внеклеточный матрикс и позволяя рассматривать ацетил-N-цистеин-L в терапии инфекций, которые связаны с образованием биопленок [1, 7] в составе которых микроб приобретает свою гиперинфекциозность [16], потенциал действия ацетил-N-цистеина-L остается не до конца изученным. Отсутствие в доступной литературе сведений по влиянию вещества ацетил-N-цистеина-L на холерный вибрион инициировало исследование чувствительности к нему штаммов *Vibrio cholerae* El Tor O1 и O139 серогрупп.

Цель исследования – изучить действие вещества ацетил-N-цистеина-L на штаммы холерных вибрионов разных серогрупп, выделенных из различных источников и с разной эпидемической значимостью (наличие/отсутствие генов *ctx AB* и *tcpA*).

Материалы и методы. При выполнении исследований в зависимости от решаемой задачи использовали разные группы штаммов: 6 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor (*ctx+* *tcp+*), 6 дефектных по синтезу токсина и токсинорегулируемых пилей штаммов (Δ *ctx* Δ *tcp*), выделенных из воды поверхностных водоемов, 12 штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы, из которых 6 (*ctx+* *tcp+*) были выделены из клинического материала, а 6 атоксигенных (Δ *ctx* Δ *tcp*) – из проб воды поверхностных водоемов. Штаммы получали из музея живых культур с центром патогенных вибрионов ФКУЗ «Ростовский НИПЧИ», где их хранили в лиофилизированном состоянии.

В работе использовали вещество ацетил-N-цистеин-L (Россия). Коллоидный хитин (0,027 %) готовили по методу Balasubramanian et al. [8].

Для культивирования микроорганизмов применяли агар Мартена (рН 7,6), LB (рН 7,2) (Дифко) и Бхаскарана с использованием в качестве единственного источника углерода 0,1 % глюкозы (Россия), 0,05 % N-ацетил-β-D-глюкозамина (Serva) или коллоидного хитина (0,027 %). N-ацетил-β-D-глюкозаминидазную активность у холерных вибрионов выявляли качественно [9] и количественно с применением флуорогенного субстрата 4-метилумбеллиферил-N-ацетил-β-D-глюкозаминида (4-MUF GlcNAc, Sigma). Реакция оценивали на флюоресцентном спектрофотометре Hitachi F-2500 с использова-

нием лицензионной программы FL Solutions. Выделение и очистку фермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы осуществляли по методу [2].

Результаты исследования. Установлено, что все штаммы *Vibrio cholerae* El Tor O1 и O139 серогрупп оказались чувствительными к веществу ацетил-N-цистеину-L независимо от объекта выделения и набора детерминант вирулентности. Обнаружено антибактериальное действие ацетил-N-цистеина-L в концентрации 1–2,5 мг/мл. Небезынтересно отметить, что на плотных питательных средах – агаре Мартена (рН 7,6) и LB (рН 7,2) – МПК ацетил-N-цистеина-L для штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, выделенных из различных источников, независимо от наличия/отсутствия генов *ctxAB* и *tcpA* составляла 1–2,5 мг/мл. В то же время на синтетической среде Бхаскарана с использованием в качестве единственного источника углерода 0,1 % глюкозы, 0,05 % – N-ацетил-β-D-глюкозамина или коллоидного хитина (0,027 %) МПК снижалась до 50–250 мкг/мл. Выявлена 10-кратная разница в чувствительности к веществу ацетил-N-цистеину-L на полных и голодной средах, которая, по-видимому, объясняется как широким спектром его действия как тиолсодержащего антиоксиданта на различные системы микроба, так и влиянием отдельных компонентов сред на этот процесс.

Особенно интересно поведение вибрионов на среде с хитином, полимером, играющим важную роль в экологии возбудителя холеры. Обнаруженный хитинолитический комплекс у холерных вибрионов [5], включающий не менее 5 хитиназ, позволяет с большей определенностью поддерживать утверждение [13] о существовании у пандемичных штаммов *V. cholerae* экологической ниши вне человека, но ассоциированной с хитин-содержащими организмами.

Катаболический каскад, согласно схеме Hunt D.E. et al. [10], начинается с расщепления полимера на олигомеры внеклеточными хитиназами (гены VC0769, VC1952, VCA0027), которые хотя и обладают разной активностью или регуляцией, действуют согласованно при превращении хитина в попадающие затем в периплазматическое пространство олигосахариды $(GlcNAc)_n$. Сюда можно отнести N-ацетил-β-D-глюкозаминидазу и N-ацетилгексозаминидазу (VC2217 и VC0613). В периплазме же олигосахариды хитина под действием периплазматических хитодекстриназы (VCA0700) и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы деградируют до $(GlcNAc)_{1,2}$ [12].

Большой интерес для нас представляла обнаруженная ранее у холерных вибрионов N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза (К.Ф.3.2.1.30) – фермент, входящий в состав хитинолитического комплекса и выполняющий важную роль в утилизации хитина, а также наделяющий холерный вибрион определенными конкурентными преимуществами и участвующий в выживании/сохранении холерных вибрионов [2, 3].

В ходе анализа полученных результатов обнаружено, что кроме антибактериального эффекта на штаммы холерных вибрионов выявлено влияние вещества ацетил-N-цистеина-L и на активность очищенного препарата N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы. Активность фермента, принимающего участие в выживании/сохранении холерных вибрионов, ингибировалась на 50 % после 15-минутной инкубации N-ацетил-

β-D-глюкозаминидазы с 1,5 мМ (250 мкг/мл) ацетил-N-цистеина-L при использовании для регистрации активности флуорогенного субстрата 4-MUF. GlcNAc. Концентрации в 0,36–0,75 мМ (30–125 мкг/мл) подавляли активность на 25–30 %, тогда как большие концентрации препарата – 500 мкг и выше (3 мМ и выше) полностью ингибировали активность фермента (таблица), что объясняется наличием в структуре его каталитического домена четырех остатков цистеина. Взятые для контроля очищенные препараты нейраминидазы и *ompT*-протеазы холерного вибриона, не содержавшие в своем составе остатков цистеина, в присутствии вещества ацетил-N-цистеина-L активность сохраняли полностью.

Таблица. Влияние вещества ацетил-N-цистеина-L на активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы *V. cholerae* P-18950

Table. Effect of the substance acetyl-N-cysteine-L on the activity of N-acetyl-β-D-glucosaminidase *V. cholerae* P-18950

| Реагенты | Концентрация | Относительная активность, % |
|--------------------|---------------|-----------------------------|
| Контроль | – | 100 |
| ацетил-N-цистеин-L | 1,5mM | 50 |
| ацетил-N-цистеин-L | 3 mM (и выше) | 0 |

Обнаруженная способность вещества ацетил-N-цистеина-L подавлять активность очищенного фермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (хитобиазы) холерного вибриона, вероятно, может определенным образом влиять на ход событий при заболевании и вибриононосительстве.

Таким образом, повышенная чувствительность возбудителя холеры к веществу ацетил-N-цистеину-L на средах с коллоидным хитином объясняется присутствием в структурах перечисленных выше ферментов большого числа (8–11) остатков цистеина, способных формировать чувствительные к ацетилцистеину дисульфидные связи, разрывы которых сопровождаются образованием сульфгидрильных (-SH) групп, ведущих к нарушению функций белков (включая некоторые ферменты) с последующей гибелью клетки. Нельзя исключить и возможности вещества ацетил-N-цистеина-L подавлять биологическую активность *ctxA* и *ctxB* – субъединиц, а также *zot*-токсина, токсин-корегулируемых пилей и гемагглютинин/протеазы (HA/P) холерных вибрионов, несущих в своем составе от 2 до 4 остатков цистеина, что будет являться предметом дальнейших исследований и расширит наши представления о биологии возбудителя.

Заключение.

Полученные данные указывают на способность вещества ацетил-N-цистеина-L оказывать антибактериальный эффект на все взятые в исследование штаммы *Vibrio cholerae* El Tor O1 и O139 серогрупп с разной эпидемиологической значимостью (наличие/отсутствие генов *ctxAB* и *tcpA*) и выделенных из различных источников. Показано, что на плотных питательных средах – агаре Мартена (рН 7,6) и LB (рН 7,2) – минимальная подавляющая концентрация (МПК) вещества ацетил-N-цистеина-L для штаммов *V. cholerae* El Tor O1 и O139 серогрупп составила 1–2,5 мг/мл, тогда как на синтетической среде Бхаскарана с использованием в качестве единственного источника углерода 0,1 % глюкозы, 0,05 % N-ацетил-β-D-глюкозамина или

коллоидного хитина (0,027 %) МПК снижалась до 50–250 мкг/мл. Выявлена способность вещества ацетил-N-цистеина-L подавлять активность очищенного фермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (хитобиазы), участвующего как в утилизации хитина, так и в выживании/сохранении холерных вибрионов.

Полученные результаты представляют теоретический и практический интерес. Они дополняют наши представления о механизме действия вещества ацетил-N-цистеина-L, что в перспективе сможет расширить показания к его применению, учитывая полученные недавно данные об антибактериальном действии этого вещества в отношении биопленок холерных вибрионов [4].

Обнаруженные свойства вещества ацетил-N-цистеина-L могут указывать на целесообразность рассмотрения вопроса о возможности его включения в состав компонентов растворов, используемых при регидратационной терапии случаев диареегенных заболеваний, обусловленных возбудителями II–IV групп патогенности.

ЛИТЕРАТУРА

(п. 7–16 см. References)

1. Голуб А.В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. № 1. С. 23–29.
2. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С. и др. N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза холерных вибрионов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2016. № 2. С. 41–48.
3. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Сорокин В.М. и др. Оценка влияния температуры культивирования на активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы у холерных вибрионов // Здоровье населения и среда обитания. 2016. № 4 (277). С. 42–44.
4. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Титова С.В. и др. Действие N-ацетил-L-цистеина на биопленки холерного вибриона // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2018. № 2. С. 83–87.
5. Мишанькин Б.Н., Шиманюк Н.Я., Водопьянов С.О. и др. Изучение хитинолитического комплекса холерного вибриона сероварианта O139 // Биотехнология. 2010. № 1. С. 32–40.
6. Ушкалова Е.А. Ацетилцистеин в клинической практике: настоящее и перспективы // Фармацевтика. 2007. № 17. С. 30–36.

REFERENCES

1. Golub A.V. Bacterial'nye bioplenki – novaya tsel' terapii? [Bacterial biofilms – a new goal of therapy?]. *Kliniches-kaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*, 2012, no. 1, pp. 23–29. (In Russ.)
2. Duvanova O.V., Mishan'kin B.N., Vodopyanov A.S. et al. N-acetyl-β-D-glyucosaminidaza kholernykh vibriovov [N-acetyl-β-D-gluco-

- saminidase of cholera vibrios]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*, 2016, no. 4 (277), pp. 42–44. (In Russ.)
3. Duvanova O.V., Mishan'kin B.N., Sorokin V.M. et al. Otsenka vliyaniya temperatury kul'tivirovaniya na aktivnost' N-acetyl-β-D-glyucosaminidazy u kholernykh vibriovov [Evaluation of cultivation temperature effect on the activity of N-acetyl-β-D-glyucosaminidase in cholera vibrios]. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*, 2016, no. 4 (277), pp. 41–48. (In Russ.)
4. Duvanova O.V., Mishan'kin B.N., Titova S.V. et al. Deistvie N-acetyl-L-tsisteina na bioplenki kholernogo vibriona [Effect of N-acetyl-L-cysteine on biofilms of *Vibrio cholerae*]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*, 2018, no. 2, pp. 83–87. (In Russ.)
5. Mishan'kin B.N., Shimanyuk N.Ya., Vodopyanov S.O. et al. Izuchenie khitinoliticheskogo kompleksa kholernogo vibriona serovarianta O139 [The study chitinolytic complex of *Vibrio cholerae* O139 serovar]. *Biotehnologiya*, 2010, no. 1, pp. 32–40. (In Russ.)
6. Ushkalova E.A. Atsetiltstsistein v klinicheskoy praktike: nastoyashchee i perspektivy [Acetylcysteine in clinical practice: present and perspectives]. *Farmatsevtika*, 2007, no. 17, pp. 30–36. (In Russ.)
7. Aslam S., Darouiche R.O. Role of antibiofilm – antimicrobial agents in control of the device – related infections. *Int. J. Artif. Organs*, 2011, vol. 34, no. 9, pp. 752–758.
8. Balasubramanian R., Manocha M.S. Cytosolic and membrane-bound chitinase of two mucoraceous fungi: a comparative study. *Canad. J. Microbiol.*, 1992, no. 38, pp. 331–338.
9. O'Brien M., Colwell R. A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide. *Applied Environm. Microbiol.*, 1987, vol. 53, no. 7, pp. 1718–1720.
10. Hunt D.E., Gevers D., Vanora N.M. et al. Conservation of the chitin utilization pathway in the Vibrionaceae. *Appl. Environm. Microbiol.*, 2008, vol. 74, no. 1, pp. 44–51.
11. Huynh H.Q., Couper R.T., Tran C.D. et al. N-acetylcysteine, a novel treatment for *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Dis. Sci.*, 2004, vol. 49, pp. 1853–1861.
12. Keyhani N.O., Roseman S. Physiological aspects of chitin metabolism in marine bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, vol. 1473, pp. 108–122.
13. Lipp E.K. A. Huq, R.R. Colwell. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, vol. 15, no. 4, pp. 757–770.
14. Parry M.F., Neu H.C. Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro. *J. Clin. Microbiol.*, 1977, vol. 5, no. 1, pp. 58–61.
15. Prescott L.F., Illingworth R.N., Critchley J.A.J.H. et al. Intravenous N-acetylcysteine: the treatment of choice for paracetamol poisoning. *British Med. J.*, 1979, no. 2, pp. 1097–1100.
16. Tamayo R., Patimalla B., Camilli A. Growth in a biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 2010, vol. 78, no. 8, pp. 3560–3569.

Контактная информация:

Дуванова Ольга Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
e-mail:olga_duvanova@mail.ru

Contact information:

Duvanova Olga, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of diagnosis of particularly dangerous infections of Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор
e-mail:olga_duvanova@mail.ru

© Мозжерова М.А., 2019

УДК 616-093/-098

ВИДЫ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* В ИЗОЛЯТАХ ИЗ ПОЛОСТИ РТА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ БРЯНСКОЙ ОБЛАСТИ

М.А. Мозжерова

НУЗ «Центральная больница № 4 ОАО «РЖД», ул. Плюшева, д. 15-а, стр. 1, г. Москва, 111398, Россия

Проведено обследование ротовой полости 174 ВИЧ-инфицированных пациентов, находящихся на диспансерном наблюдении и лечении в Брянском Центре по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, с выполнением комплекса бактериологических и паразитологических исследований. Показано преобладание неальбиканских видов, а также микст-инфекций с двумя и более видами грибов рода *Candida*.

Ключевые слова: орофарингеальный кандидоз, не-альбиканские виды *Candida*, антифунгиальная чувствительность, резистентность к флуконазолу.

M.A. Mozzherova □ SPECIES OF YEAST-LIKE FUNGI OF THE GENUS *CANDIDA* IN ISOLATES FROM THE ORAL CAVITY IN HIV-INFECTED PATIENTS OF THE BRYANSK REGION □ Central hospital no. 4 of JSC «Russian Railways», 15-a Plusheva Str., Bild. 1, Moscow, 111398, Russia.

We examined the oral cavity of 174 HIV-infected patients who are on dispensary supervision and treatment in the Bryansk Center for the prevention and control of AIDS and infectious diseases with the implementation of a complex of bacteriological and parasitological studies. The predominance of non-albican species, as well as mixed infections with two or more species of fungi of the genus *Candida* were shown.

Key words: oropharyngeal candidiasis, non-albicans *Candida* species, antifungal sensitivity, resistance to fluconazole.