

ТЕТРАЦИКЛИНОВАЯ ИНДУКЦИЯ ПРИРОДНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К БЕДАКВИЛИНУ У *Mycobacterium smegmatis* MC2 155

© 2024 А. А. Ватлин^{1,2,*}, Д. А. Цыбизов¹, В. С. Летвинова², В. Н. Даниленко²

¹Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, 117198 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: vatlin_alexey123@mail.ru

Поступила в редакцию 28.02.2024 г.

После доработки 04.04.2024 г.

Принята к публикации 00.04.21024 г.

Возникновение антибиотикорезистентности у микроорганизмов, включая микобактерии, представляет собой серьезную проблему в современной медицине, снижая эффективность лечения. В современном мире довольно широко обсуждается влияние на возникновение антибактериальной устойчивости минимальных селективных концентраций антибиотиков (МСК), которые значительно ниже классических минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Предполагается, что такие микроконцентрации могут являться дополнительным механизмом отбора лекарственно устойчивых штаммов, что особенно актуально в связи с накоплением концентраций антибиотиков в окружающей среде в результате антропогенной деятельности. В контексте микобактерий понимание процессов индукции устойчивости к антибиотикам на уровне МСК является особенно важным для разработки эффективных стратегий лечения и контроля распространения лекарственной устойчивости. Цель данной работы — изучение индукции системы природной лекарственной устойчивости у микобактерий при воздействии на клетку концентрациями, значительно ниже стандартных МИК, не влияющими на рост клетки. Был проведен анализ устойчивости *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 к одному из основных антибиотиков второго ряда, применяемых в медицинской практике, — бедаквилину, при индукции тетрациклином, офлоксацином и канамицином. Установлено, что одним из механизмов, влияющим на изменение чувствительности штамма *M. Smegmatis* mc2 155 при индукции микроконцентрациями тетрациклина, является система выброса антибиотика из клетки — MmpS5-MmpL5.

Ключевые слова: антибиотики, природная лекарственная устойчивость, резистом, микобактерии, *Mycobacterium smegmatis* mc2 155, MmpS5-MmpL5.

DOI: 10.31857/S0016675824100105 **EDN:** WEPZUF

Антибиотикорезистентность представляет собой глобальную проблему ВОЗ, связанную с передачей бактерий и генов антибиотикорезистентности между людьми, животными и окружающей средой, а также с накоплением антибиотиков в окружающей среде [1]. В последнее время появляется все больше данных о возможности индукции природной лекарственной устойчивости концентрациями антибиотиков значительно ниже известных МИК — минимальные селективные концентрации (МСК) [2–4]. Показано, что концентрации в несколько сот раз ниже значений МИК соответствующих антимикробных препаратов для бактерий могут вызывать изменения в фенотипе резистентности и индуцировать лекарственную устойчивость [5–7]. При этом появляются данные о накоплении в окружающей среде концентраций значительно выше МСК [8].

В предыдущей работе нами было показано, что низкие концентрации тетрациклина, канамицина и офлоксацина, не влияющие на рост микобактериальных клеток, могут активировать систему природного резиста, приводя к повышению устойчивости *M. Smegmatis* mc2 155 и увеличению экспрессии гена *whiB* — основного транскрипционного регулятора, вовлеченного в процесс формирования устойчивости *M. Smegmatis* mc2 155 и увеличению экспрессии гена *whiB* — основного транскрипционного регулятора, вовлеченного в процесс формирования устойчивости [9–11]. Также ранее нами была разработана тест-система для оценки выброса из клетки разрабатываемых новых антибиотиков клеточной помпой MmpS5-MmpL5 [12, 13]. Согласно литературным данным, данная система ответственна за выброс целого ряда антибиотиков из клетки, в частности, широко применяемого

противотуберкулезного препарата второго ряда — бедаквилина, а ее активация приводит к повышению устойчивости у микобактерий к целому ряду антибиотиков [14].

Настоящая работа посвящена анализу индукции системы природной лекарственной устойчивости тетрациклином, офлоксацином и канамицином в концентрациях, не влияющих на рост клетки, на повышение уровня устойчивости к бедаквилину за счет активации клеточной помпы MmpS5-MmpL5.

В работе использовался штамм бактерий *M. smegmatis* mc2 155. Культивирование бактерий проводили на агаризованной среде M290 (M290, Himedia, India) и в жидкой среде Middlebrook 7H9. Определение антибактериальной устойчивости *M. smegmatis* проводили с использованием бумажных дисков, как описано в [15], с модификациями: культуры *M. smegmatis* выращивались на протяжении ночи в среде Middlebrook 7H9 до начала экспоненциальной фазы ($OD_{600} = 1.2$), после чего разбавлялись в пропорции 1 : 9 : 10 (культура : вода : M290) и в количестве 5 мл наслаивались как верхний слой на чашки Петри со средой M290. При индукции устойчивости антибиотики тетрациклин (0,015 мкг/мл), офлоксацин (0,08 мкг/мл) и канамицин (0,03 мкг/мл), не влияющие на рост [9], добавлялись в жидкую среду и выращивались до той же фазы роста, что и контроль без индукции. После этого на агар наносили диски из фильтровальной бумаги с антимикубактериальными препаратами. Эксперимент проводился в трех независимых биологических повторностях.

Выделение РНК и измерение уровня экспрессии гена *MSMEG_1380* и *MSMEG_1382* с использованием РТ-ПЦР проводили по описанной ранее методологии без модификаций [9]. Метод оценки экспрессии ($\Delta\Delta Ct$), p -value ≤ 0.001 . Используемая последовательность праймеров:

q1380-f 5'-CTGCTCGACGAACCATGCGAAAC-3'
и q1380-r

5'-AAGGGTCTTGAGCCGAATCTCAACG-3'
(*MSMEG_1380*),

q1382-f
5'-ACCACGCAGATCATGAACAACGACT-3'
и q1382-r

5'-GAAATCGTCGAAGTCCGCCAGATGA-3'
(*MSMEG_1382*),

qsigAs-sm-f
5'-CGAGCTTGTTGATCACCTCGACCAT-3'
и qsigAs-sm-r

5'-CTCGACCTCATCCAGGAAGGCAAC-3'
(*sigA*),

qftsZs-sm-f
5'-AGCAGCTCCTCGATGTCGTCCTT-3'
и qftsZs-sm-r

5'-GCCTGAAGGGCGTCGAGTTTCAT-3' (*ftsZ*).

Для оценки скорости роста культуру *M. Smegmatis* разводили в среде Middlebrook 7H9 до $OD_{600} = 0.1$ (исследовался планктонный рост). Измерение оптической плотности клеточной суспензии проводили на приборе SmartSpec Plus (Bio-Rad) в течение 25,5 ч каждые 1.5 часа. При индукции в среду добавлялся тетрациклин в концентрации 0,015 мкг/мл. Бедаквилин добавлялся в концентрации 0,5 нМ (1/20 от МИК) и 1 нМ (1/10 от МИК). Эксперимент проведен в трех независимых повторностях.

Ранее нами было показано, что индукция малыми концентрациями антибиотиков (тетрациклином, офлоксацином, стрептомицином и канамицином) может приводить к активации генов природного резиста и повышать уровень устойчивости к различным антибиотикам через активацию глобальных транскрипционных регуляторов [9]. Одними из наиболее распространенных в микобактериальной клетке являются TetR-зависимые транскрипционные регуляторы, которые могут регулировать широкий ряд генов, ответственных за формирование лекарственной устойчивости [16]. Одним из таких генов является клеточная мульти-субстратная помпа *mmpS5-mmpL5* [17], которая, как нами было показано ранее, напрямую регулируется транскрипционным регулятором *MSMEG_1380* [12]. Сама же клеточная помпа MmpS5-MmpL5 (по литературным данным) вовлечена в процесс выброса широко применяемых в медицинской практике антибиотиков — клоfazимина и бедаквилина [18, 19]. При этом стоит отметить, что в соответствии с нормами Агентства министерства

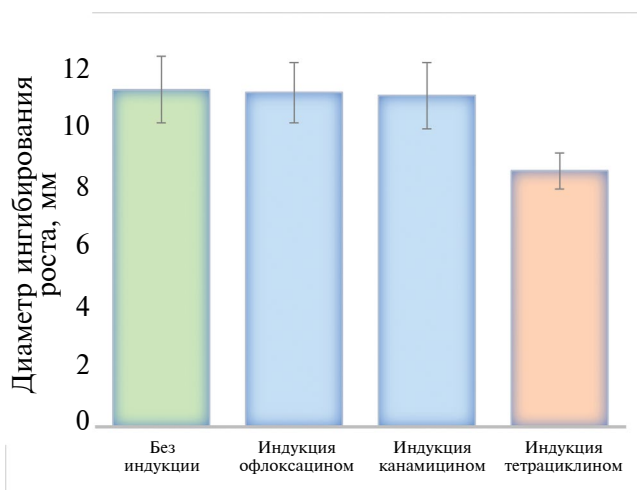


Рис. 1. Диаметры зон ингибирования роста культуры *M. smegmatis* mc2 155 бедаквилином (0,01 нмоль/диск) при индукции офлоксацином, канамицином и тетрациклином. Зеленый столбец — контрольный образец без индукции. Столбцы представляют средние значения в мм. Стандартное отклонение рассчитано из трех независимых биологических повторностей.

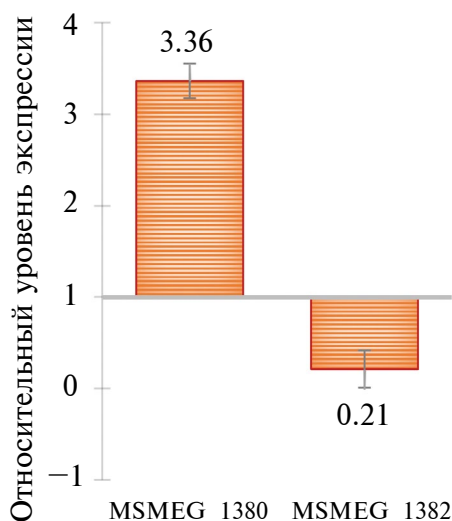


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов *MSMEG_1380* и *MSMEG_1382* в клетках *M. smegmatis* mc2 155, культивируемых в присутствии тетрациклина в концентрации, не влияющей на рост клеток. Экспрессия изучаемых генов при отсутствии антибиотиков принята за единицу; стандартное отклонение рассчитано из трех независимых биологических повторов.

здравоохранения США (FDA, USA) суточная доза для широко применяемого в сельском хозяйстве при производстве продуктов питания тетрациклина составляет 25 г/кг массы тела в сутки (FDA: Sec.556.720) [20]. На основании данного предположения нами была выдвинута гипотеза, что минимальные концентрации тетрациклина, которые не влияют на рост клетки, могут приводить к активации TetR-зависимых транскрипционных регуляторов и увеличению активности клеточной помпы MmpS5-MmpL5.

Для проверки данного предположения мы провели индукцию устойчивости штамма *M. smegmatis* mc2 155 тетрациклином, офлоксацином и канамицином в концентрациях, не влияющих на рост клеток. Было показано, что индукция офлоксацином и канамицином не приводит к изменению уровня устойчивости клеток к бедаквилину, тогда как индукция тетрациклином делает клетки более устойчивыми к бедаквилину (рис. 1). На основании полученных данных об индукции тетрациклином устойчивости к бедаквилину нами был проведен анализ изменения уровня экспрессии TetR-зависимого транскрипционного репрессора *MSMEG_1380* и регулируемой им помпы MmpS5-MmpL5 (ген *MSMEG_1382*) при индукции

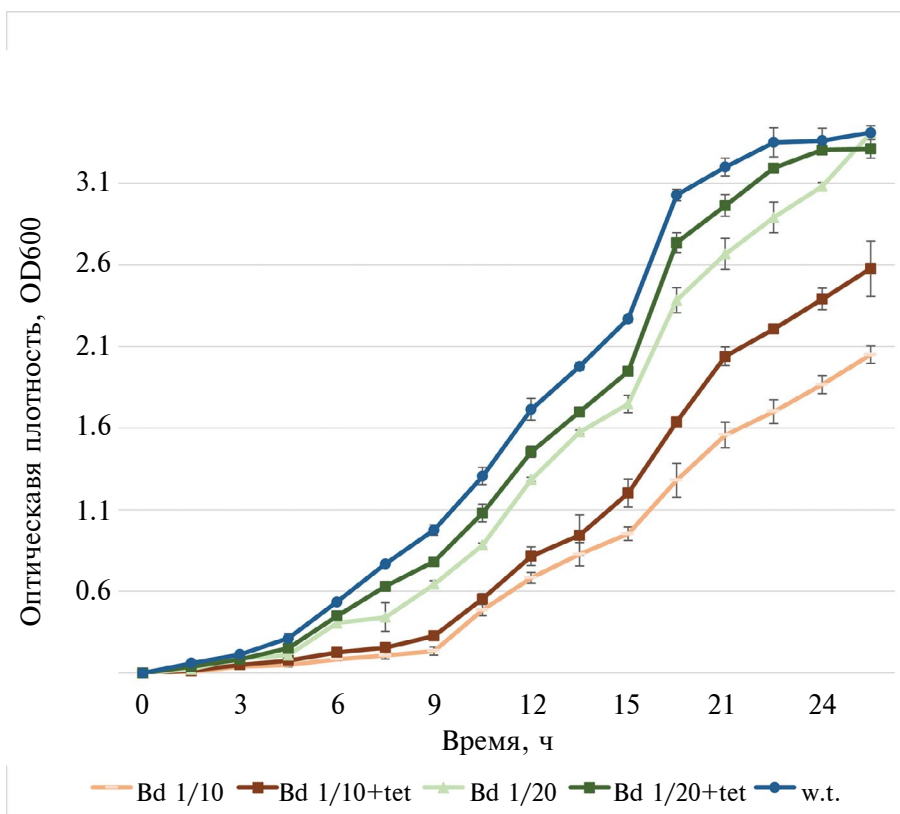


Рис. 3. Кривая роста штамма *M. smegmatis* mc2 155 (w.t., желтый) в присутствии бедаквилина (Bd, зеленый), а также в присутствии бедаквилина и индуктора тетрациклина (Bd+tet, синий). Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трех независимых повторах.

клеток тетрациклином. Было показано, что концентрации, не влияющие на рост клеток, вызывают 4.78-кратное снижение экспрессии *MSMEG_1380*, что в свою очередь вызывает повышение уровня экспрессии гена *MSMEG_1382* в 3.36 раза (рис. 2).

На основании полученных данных далее провели анализ скорости роста *M. smegmatis* в среде с бедаквилином при индукции тетрациклином. Нами было проведено сравнение скорости роста штамма *M. smegmatis* mc2 155 в трех различных условиях: контроль (w.t.), штамм в присутствии индуктора (тетрациклина) и бедаквилина и штамм в присутствии бедаквилина без индукции. Концентрации бедаквилина составляли 1/20 МИК, 0.5 нМ и 1/10 от МИК, 1 нМ соответственно. Использование большей концентрации приводило к существенному замедлению роста штамма и невозможности оценки результатов (рис. 3).

В результате проведенного исследования мы выявили, что штамм без обработки антибиотиками имеет более высокую скорость роста в отличие от штамма в присутствии бедаквилина в концентрациях 1/20 и 1/10 от МИК. При этом скорость роста штамма при добавлении в среду микроконцентрации тетрациклина увеличивалась. Данные результаты подтверждают предположение о влиянии минимальных селективных концентраций антибиотиков на скорость роста штаммов, что может приводить к отбору штаммов с индуцированными генами резистента [5].

В настоящей работе показано увеличение устойчивости культуры микобактерий *M. smegmatis* mc2 155 к бедаквилину при индукции тетрациклином. Оценка возможного механизма индукции выявила снижение экспрессии TetR-зависимого транскрипционного репрессора *MSMEG_1380* и увеличение экспрессии регулируемой им помпы MmpS5-MmpL5 (ген *MSMEG_1382*), что может приводить к выбросу бедаквилина из клетки. Полученные далее результаты подтверждают разницу в скорости роста у *M. smegmatis* mc2 155 при индукции устойчивости природного резистента низкими концентрациями тетрациклина в присутствии бедаквилина, что подтверждает предположение о возможности отбора штаммов с индуцированной устойчивостью из-за разницы в скорости роста.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00066, <https://rscf.ru/project/22-74-00066/>.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Larsson D.G.J., Flach C.F. Antibiotic resistance in the environment: 5 // Nat. Rev. Microbiol. 2022. V. 20. № 5. P. 257–269. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x
2. Hjort K., Fermér E., Tang P.C., Andersson D.I. Antibiotic minimal selective concentrations and fitness costs during biofilm and planktonic growth // mBio. Am. Soc. for Microbiology, 2022. V. 13. № 3. doi: 10.1128/mbio.01447-22
3. Stanton I.C., Murray A.K., Zhang L. et al. Evolution of antibiotic resistance at low antibiotic concentrations including selection below the minimal selective concentration: 1 // Commun. Biol. 2020. V. 3. № 1. P. 1–11. doi: 10.1038/s42003-020-01176-w
4. Swinkels A.F., Fischer E.A.J., Korving L. et al. Defining minimal selective concentrations of amoxicillin, doxycycline and enrofloxacin in broiler-derived cecal fermentations by phenotype, microbiome and resistome // bioRxiv, 2023. doi: 10.1101/2023.11.21.568155
5. Gullberg E., Cao S., Berg O.G. et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations // PLoS Pathog. 2011. V. 7. № 7. doi: 10.1371/journal.ppat.1002158
6. Gullberg E., Albrecht L.M., Karlsson C. et al. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals // mBio. 2014. V. 5. № 5. doi: 10.1128/mBio.01918-14
7. Liu A., Fong A., Becket E. et al. Selective advantage of resistant strains at trace levels of antibiotics: A simple and ultrasensitive color test for detection of antibiotics and genotoxic agents // Antimicrob. Agents Chemother. 2011. V. 55. № 3. P. 1204–1210. doi: 10.1128/AAC.01182-10
8. Sandegren L. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations // Ups. J. Med. Sci. 2014. V. 119. № 2. P. 103–107. doi: 10.3109/03009734.2014.904457
9. Vatlin A.A., Bekker O.B., Shur K.V. et al. Kanamycin and ofloxacin activate the intrinsic resistance to multiple antibiotics in *Mycobacterium smegmatis* // Biology (Basel). 2023. V. 12. № 4. doi: 10.3390/biology12040506
10. Прозоров А., Даниленко В. Системы “токсин-анти-токсин” у бактерий: инструмент апоптоза или модуляторы метаболизма? // Микробиология. 2010. Т. 79. № 2. С. 147–159.
11. Прозоров А.А., Федорова И.В., Беккер О.Б., Даниленко В.Н. Факторы вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*: генетический контроль, новые концепции // Генетика. 2014. Т. 50. № 8. С. 885.
12. Maslov D.A., Shur K.V., Vatlin A.A., Danilenko V.N. MmpS5-MmpL5 transporters provide mycobacterium smegmatis resistance to imidazo[1,2-b][1,2,4,5]

- tetrazines // Pathogens. 2020. V. 9. № 3.
doi: 10.3390/pathogens9030166
13. Шур К.В., Фролова С.Г., Акимова Н.И., Маслов Д.А. Тест-система для *in vitro* скрининга кандидатов в антимикобактериальные препараты на устойчивость, опосредованную mmpS5-mmpL5-транспортерами // Генетика. 2021. Т. 57. № 1. С. 108–111.
doi: 10.1134/S1022795421010154
14. Yamamoto K., Nakata N., Mukai T. et al. Coexpression of MmpS5 and MmpL5 contributes to both efflux transporter MmpL5 trimerization and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // mSphere. 2021. V. 6. № 1.
doi: 10.1128/mSphere.00518-20
15. Shahbaaz M., Maslov D.A., Vatlin A.A. et al. Repurposing based identification of novel inhibitors against MmpS5-MmpL5 efflux pump of *Mycobacterium smegmatis*: A combined in silico and in vitro study // Biomedicines. 2022. V. 10. № 2.
doi: 10.3390/biomedicines10020333
16. Deng W., Li C., Xie J. The underling mechanism of bacterial TetR/AcrR family transcriptional repressors // Cell Signal. 2013. V. 25. № 7. P. 1608–1613.
doi: 10.1016/j.cellsig.2013.04.003
17. Richard M., Gutiérrez A.V., Viljoen A.J. et al. Mechanistic and structural insights into the unique tetr-dependent regulation of a drug efflux pump in *Mycobacterium abscessus* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00649
18. Andries K., Villellas C., Coeck N. et al. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline // PloS One. 2014. V. 9. № 7.
doi: 10.1371/journal.pone.0102135
19. Hartkoorn R.C., Uplekar S., Cole S.T. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis* // Antimicrob. Agents Chemother. 2014. V. 58. № 5. P. 2979–2981.
doi: 10.1128/AAC.00037-14
20. 2CFR – Code of Federal Regulations Title 21. URL: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=556&showFR=1&ubpartNode=21:6.0.1.1.18.2> (accessed: 06.03.2023).

Tetracycline Induction of Natural Drug Resistance to Bedaquiline in *Mycobacterium smegmatis* mc2 155

A. A. Vatlin^{1, 2, *}, D. A. Tsybizov¹, V. S. Letvinova², V. N. Danilenko²

¹*Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198 Russia*

²*Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: vatlin_alexey123@mail.ru*

The emergence of antibiotic resistance in microorganisms, including mycobacteria, poses a serious problem in modern medicine, reducing treatment effectiveness. In the modern world, there is considerable discussion about the influence of minimal selective concentrations of antibiotics (MSC), which are significantly lower than classical minimal inhibitory concentrations (MIC), on the emergence of antibacterial resistance. It is assumed that such microconcentrations may act as an additional mechanism for selecting drug-resistant strains, which is particularly relevant due to the accumulation of antibiotic concentrations in the environment as a result of human activity. In the context of mycobacteria, understanding the processes of induction of resistance to antibiotics at the MSC level is especially important for the development of effective treatment strategies and control of the spread of drug resistance. The aim of this study was to investigate the induction of the natural drug resistance system in mycobacteria under the influence of concentrations significantly lower than standard MIC and not affecting cell growth. The resistance of *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 to one of the main antibiotics used in medical practice, bedaquiline, was analyzed during induction by tetracycline, ofloxacin, and kanamycin. It was established that one of the mechanisms influencing the change in sensitivity of the *M. smegmatis* mc2 155 strain during induction by microconcentrations of tetracycline is the antibiotic efflux system – MmpS5-MmpL5.

Keywords: antibiotics, natural drug resistance, resistome, mycobacteria, *Mycobacterium smegmatis* mc2 155, MmpS5-MmpL5.