

МІКРОБІОЛОГІЧНА ОБГРУНТОВАНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ СИНЕРГІЧНИХ КОМБІНАЦІЙ ПОЛІМІКСИНУ З НІЗИНОМ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Книш О. В., Мартинов А. В.

Державна установа «Інститут мікробіології та
імунології ім. І. І. Мечникова Національної
академії медичних наук України»

Вступ. Інфекції, спричинені резистентними до антибіотиків збудниками, набувають дедалі більшого поширення і стають однією з найсерйозніших проблем сьогодення для систем охорони здоров'я більшості країн світу. У 2017 році Всесвітня організація охорони здоров'я опублікувала глобальний пріоритетний перелік стійких до антибіотиків бактерій, для яких терміново потрібні нові протимікробні препарати або нові терапевтичні стратегії [3,4]. Повільне відкриття та розробка нових антибіотиків не в змозі наздогнати швидке зростання стійкості до них [5]. Перспективною стратегією боротьби з резистентними збудниками є поєднання протимікробних препаратів з різними механізмами дії, оскільки бактеріям складніше розвивати резистентність проти кількох механізмів одночасно [6]. Особливий інтерес викликає залучення у боротьбу проти резистентних бактерій антимікробних пептидів, стійкість до яких розвивається значно повільніше, ніж до звичайних антибіотиків [6–10].

Більшість «супербактерій», перелічених у «Global priority list of antibiotic-resistant bacteria», є грам-негативними [1,3,4]. Їхня зовнішня мембрана відіграє роль бар'єра для протимікробних засобів, мішені яких розташовані у внутрішній мембрані або в цитоплазмі бактерій. Поєднання препаратів, що забезпечують проникність зовнішньої мембрани, з препаратами, механізм протимікробної дії яких реалізується в периплазмі або цитоплазмі бактерій, видається доволі перспективним підходом до боротьби зі стійкими до антибіотиків грам-негативними патогенами [8,11].

Метою нашого дослідження було проаналізувати доступні дані наукової літератури останніх семи років, що свідчать про доцільність та обгрунтованість комбінованого застосування поліміксинів і нізину проти клінічно значущих, зокрема антибіотикорезистентних, грам-негативних бактерій.

Поліміксини відкриті в 1947 році як клас антибіотиків, ефективних проти грам-негативних збудників інфекцій [12–14]. Природні поліміксини (А, В, С, D та Е) являють собою нерибосомальні циклічні ліпопептиди, які продукуються як вторинні метаболіти ґрунтовими, морськими та рослинними грам-позитивними спороутворюючими бактеріями *Paenibacillus polymyxa* [12,14,15]. В 1950-х роках ці антибіотики були залучені в активне клінічне

використання. Але через нефротоксичні та нейротоксичні побічні ефекти були замінені іншими антибіотиками [13–16]. Загрозливі темпи зростання кількості резистентних штамів, особливо серед грам-негативних бактерій, змусили повернутися до клінічного використання поліміксинів. В зв'язку з чим виникла необхідність в удосконаленні схем їх дозування та узгодженні рекомендацій щодо оптимальних умов їх призначення [13,15,17]. Наразі поліміксини зарезервовані як препарати «останньої лінії» при лікуванні інфекцій, спричинених збудниками з множинною резистентністю до лікарських засобів (MDR, multiple drug resistance) [12,13,15]. Вони належать до обмеженого переліку антибіотиків, ефективних проти таких «супербактерій»: представників родини *Enterobacteriaceae* (зокрема *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.* тощо), *Pseudomonas aeruginosa* та *Acinetobacter baumannii*, які особливо швидко набувають множинну резистентність [9,13,16,18,19].

Поліміксин В і поліміксин Е (колістин) є двома найбільш вивченими та використовуваними варіантами [15]. Вони виявилися найменш нефротоксичними серед поліміксинів [14]. Обидва препарати є високоосновними завдяки п'яти вільним аміногрупам [13]. Їхні структури відрізняються лише однією амінокислотою (D-Phe/D-Leu відповідно) в положенні 6 пептидного кільця [14,19]. Поліміксин В складається із суміші поліміксину В1 і поліміксину В2, а колістин - із суміші колістину А (поліміксин Е1) і колістину В (поліміксин Е2). Різниця між цими чотирма сполуками полягає в заміщенні жирної кислоти в структурі ліпопептиду, де вона складається з 6-метилоктанової кислоти в поліміксинах В1 і Е1 і 6-метилгептанової кислоти в поліміксинах В2 і Е2 [14]. Поліміксам В і Е притаманні подібні механізми дії та спектри активності [14,19]. Однак вони мають різну фармакокінетику та фармакодинаміку. Поліміксин В не всмоктується зі шлунково-кишкового тракту, його вводять у вигляді активної антибактеріальної сполуки поліміксину В сульфату внутрішньовенно, місцево (у вигляді розчину або мазі, перорально для дезінфекції травного тракту у вигляді препаратів, що не розсмоктуються, або у вигляді очних і вушних крапель), інгаляційно та інтратекально. Колістин вводять парентерально у неактивній формі, що не має внутрішньої антибактеріальної активності (колістину метансульфонат або колістиметат натрію); він повинен бути перетворений *in vivo* в активну форму. Колістин використовується переважно місцево. Обидві форми колістину можуть застосовуватися інгаляційно [14]. Поліміксини не ефективно дифундують у тканини, не проникають у спинномозкову рідину, а також у плевральну та черевну порожнину [20]. Поліміксину В надають перевагу при лікуванні інвазивних інфекцій завдяки його меншій нефротоксичності [17,21]. Кращі фармакокінетичні характеристики поліміксину В

дозволяють застосовувати його у разі необхідності швидко досягти бажаної концентрації препарату в плазмі та надійно її підтримувати [17]. При лікуванні інфекцій нижніх сечовивідних шляхів перевагу надають бактеріологічно неактивному колістину метансульфонату (колістиметату), який виводиться в сечовий міхур та гідролізується до бактеріологічно активної форми, колістину. Але значна варіабельність фармакокінетики препарату між пацієнтами, зокрема гідролізу до активної форми, ускладнює вибір його необхідної дози [17]. Поліміксини, які наразі використовуються, є препаратами з дуже вузькими терапевтичними вікнами [21].

Структура поліміксинів. Поліміксини є катіонними декапептидами (рис. 1), що складаються з

циклічного гептапептиду, з'єднаного з *N*-кінцевим хвостом жирної кислоти через трипептидний бічний ланцюг (екзоциклічний лінкер) [12,14,19,22]. Загальна властивість поліміксинів - присутність в структурі *L*- α - γ -діаміномасляної кислоти (Dab), амінокислоти треоніну та розгалуженої жирної кислоти. Вони відрізняються за амінокислотним складом. Всі, окрім поліміксину С, містять лейцин; поліміксини В і С містять фенілаланін і лише поліміксин D містить серин [14]. Варіанти поліміксинів відрізняються між собою гідрофобним залишком в положенні 6 і змінними ланцюгами жирних кислот, ацетильованих у положенні 1 [15]. П'ять залишків Dab забезпечують загальний заряд +5 *e* [19].

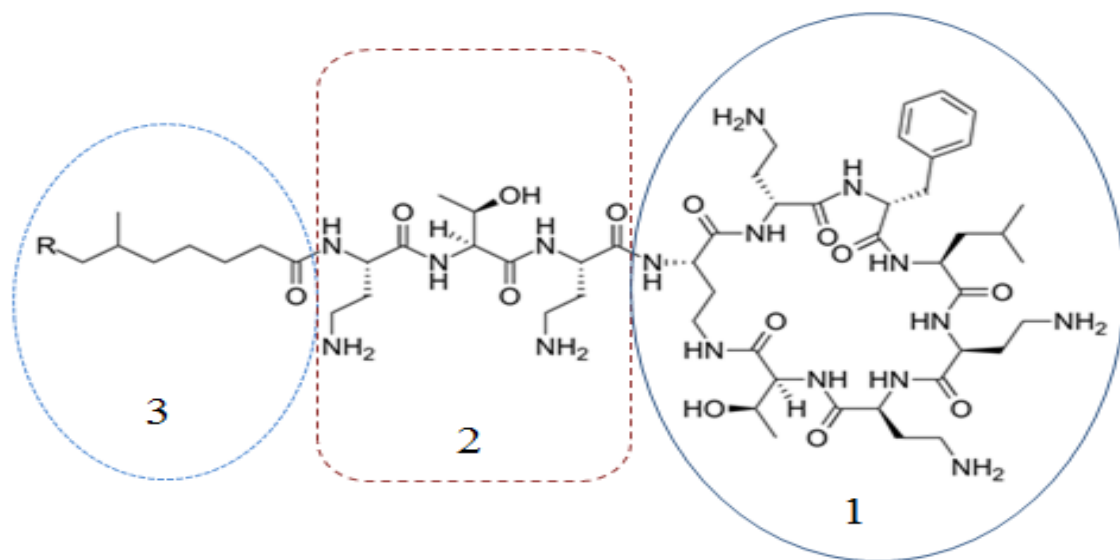


Рисунок 1. Структура поліміксину В: 1 - циклічний гептапептид; 2 – екзоциклічний лінкер; 3 – хвіст

Хімічна структура поліміксинів має вирішальне значення для їх антибактеріальної активності. Зв'язування поліміксинів з ліпополісахаридом (ЛПС), як і подальша антибактеріальна активність, корелює з довжиною та об'ємністю *N*-кінцевого жирного ацильного ланцюга. Сім-дев'ять атомів вуглецю є оптимальними для спорідненості зв'язування [14].

Також критично важливою для активності поліміксинів є наявність багатьох позитивно заряджених бічних ланцюгів Dab, які взаємодіють з фосфатними групами на ліпіді А. Для афінності зв'язування ЛПС важливі особливості залишків Dab: катіонний характер, дві метиленові групи бічного ланцюга Dab і характерний порядок залишків Dab у первинній послідовності поліміксину, який забезпечує правильний просторовий розподіл позитивних зарядів для електростатичних взаємодій з фосфатами ліпиду А. Залишки Dab, особливо ті, що лежать у циклічному гептапептиді, є незамінними для антимікробної активності. D-фенілаланін і L-лейцин у

положеннях 6 і 7 в межах гептапептидного кільця в поліміксині В та D-лейцин і L-лейцин в аналогічних положеннях в колістині забезпечують гідрофобний мотив, який, як вважають, вставляється в зовнішню мембрану бактерій і стабілізує комплексоутворення ЛПС через гідрофобну взаємодію з жирними ацильними ланцюгами ліпиду А. Комбінація топографічних хімічних особливостей і особливої конфігурації кільцевої структури поліміксину виявляється ідеальною для ефективного зв'язування з ЛПС і подальшої пермеабілізації мембрани. Спроби ввести додаткові залишки Dab мали результатом отримання значно менш активних сполук, ніж поліміксини [14].

Механізм дії поліміксинів. Бактерицидна дія поліміксинів реалізується через руйнування зовнішньої мембрани [12]. Вибірковість дії цих антибіотиків пов'язана з особливістю структури грам-негативних бактерій, що полягає в присутності в складі зовнішньої і внутрішньої мембрани молекул ЛПС [13]. Складається ЛПС з ліпиду А (ендотоксину),

основного олігосахариду та полісахаридних ланцюгів О-антигену. Синтезується ЛПС у внутрішній мембрані бактерії, потім транспортується специфічними транспортними шляхами до зовнішньої мембрани, де утворює домінуючу молекулу зовнішнього листка та відіграє важливу роль у бар'єрній функції зовнішньої мембрани [14,23]. Щільне упакування молекул ЛПС забезпечується двовалентними катіонами Mg^{2+} і Ca^{2+} , які взаємодіють з негативно зарядженим фрагментом ліпиду А [24].

Спочатку відбувається електростатична взаємодія катіонних бічних ланцюгів L- α - γ -діаміномасляної кислоти (Dab) поліміксину з аніонними фосфатними і пірофосфатними групами ліпідної частини молекули ЛПС та гідрофобна взаємодія залишків поліміксину у положеннях 6 і 7 з відповідними структурами ЛПС [13,14,25,26]. Поліміксини конкурентно витісняють двовалентні катіони з фосфатних груп мембранних ліпідів, що призводить до дестабілізації зовнішньої клітинної мембрани і дозволяє гідрофобному жирному ацильному хвосту молекули поліміксину бути вставленим у зовнішню мембрану, послабити упаковку сусідніх жирних ацильних ланцюгів ліпиду А, викликаючи розширення зовнішньої мембрани [14]. Дослідження взаємодії поліміксинів з нативними ділянками зовнішньої мембрани *Escherichia coli* за допомогою атомно-силової мікроскопії з високою роздільною здатністю, а також структурних і біохімічних аналізів показало, що поліміксини організовують ЛПС у гексагональні жорсткі кристалічні структури. Параметри кристалічної решітки змінюються з варіаціями молекул ЛПС і поліміксину. Утворення кристалічних структур корелює з антимікробною активністю поліміксину (значення мінімальної інгібіторної концентрації поліміксину завжди близьке до концентрації, необхідної для індукції утворення кристалічної структури) і чутливістю різних штамів бактерій (відсутнє у стійких до поліміксину штамів). Кількісні вимірювання показують, що кристалічні структури зменшують товщину мембрани та збільшують її площу і жорсткість [15]. На електронних мікрофотографіях можна виявити позаклітинні везикули, а також типові «пальцеподібні виступи» зовнішньої мембрани під дією поліміксину [13]. Відбувається вивільнення ЛПС, реструктуризація, дезорганізація, порушення цілісності зовнішньої мембрани. Остання втрачає бар'єрну функцію і стає проникною для багатьох шкідливих агентів, зокрема лізоциму та антибіотиків [13,27]. Витік периплазматичного вмісту призводить до втрати важливих компонентів, таких як бета-лактамази [13]. Далі поліміксини дифундують до внутрішньої мембрани, і, взаємодіючи з молекулами ЛПС, викликають її руйнування, витік цитоплазматичного вмісту і зрештою спричиняють летальний ефект [13–16].

Крім того, існує думка, що поліміксини опосередковують злиття внутрішніх листків зовнішньої мембрани та зовнішнього листка внутрішньої мембрани, індують обмін фосфоліпідів між ними, спричиняючи втрату специфічності фосфоліпідного складу та осмотичний дисбаланс, який завершується загибеллю клітин [14].

Додатковими механізмами пошкодження бактеріальних клітин поліміксинами можуть бути інгібування активності NADH-хіноноксидоредуктази, окислювальний стрес з утворенням гідроксильних радикалів і активних форм кисню, які негативно впливають на функціонування ферментів, порушують цілісність ДНК, ліпідів і білків [13,14,28]. Нещодавні дослідження продемонстрували генерацію окисних пошкоджень у грампозитивних клітинах *Bacillus subtilis* і *P. polymyxa*, що свідчить про існування механізмів негативного впливу поліміксину на грампозитивні клітини [29]. Виявлені ознаки руйнування клітинної стінки *M. tuberculosis* за впливу поліміксину зумовлюють інтерес до його застосування як потенціатора антимікобактеріальних препаратів [30].

Спектр активності. Прийнято вважати, що на грампозитивні бактерії, грамнегативні коки (наприклад, *Neisseria* spp.), еукаріотичні мікроби (гриби), паразити та клітини ссавців поліміксини зазвичай не впливають [13,14]. Природна стійкість до поліміксинів притаманна деяким грамнегативним бактеріям: *Pseudomonas mallei*, *Morganella morganii*, *Vibrio cholerae*, *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium* spp., *Edwardsiella* spp., *Brucella*, *Legionella* та *Campylobacter*, і часто пов'язана з модифікаціями ліпиду А ЛПС [14].

Поліміксини демонструють антибактеріальну активність по відношенню до більшості представників родини *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. і *Shigella* spp.) та неферментуючих грам-негативних поширених патогенів (*A. baumannii* та *P. aeruginosa*) [14]. У міжнародних рекомендаціях 2020 року вказані значення мінімальних інгібіторних концентрацій (МИК), згідно з якими визначають належність виділених штамів *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* та *Acinetobacter* до чутливих, резистентних або проміжних у відповіді на поліміксини [31,32].

Токсичність. Найпоширенішим і клінічно значущим побічним ефектом поліміксинів є нефротоксичність [14]. Поліміксин В і колістин зв'язуються з мембраною щіткової облямівки клітин проксимальних канальців нирок, і після поглинання пригнічують мітохондріальний транспорт електронів (дихання) цих клітин, викликають збільшення продукції супероксиду і активують каспази, які призводять до клітинного апоптозу [13,21,33]. Спроби зменшити нефротоксичність поліміксинів шляхом одночасного додавання антиоксидантів не

забезпечили достатньою кількістю переконливих доказів необхідності регулярного введення цієї групи препаратів для профілактики нефротоксичності [17,21,33].

Окрім нефротоксичності, при системному застосуванні поліміксинів можливі реакції гіперчутливості та нейротоксичність. Остання спостерігається приблизно у 7% пацієнтів і є результатом пошкодження нейронів окислювальним стресом, що призводить до мітохондріальної дисфункції з подальшим апоптозом [14].

Модифікації поліміксинів. Перші спроби модифікувати структуру поліміксинів в 1970-х роках були спрямовані на підвищення їхньої безпечності. Модифікації були обмежені ацилюванням/алкілюванням аміногруп бічного ланцюга залишку Dab або заміною N-кінцевого жирного ацильного ланцюга і не дозволили досягти бажаних результатів. Не зовсім вдалим виявилися і наступні розробки вдосконалених поліміксинів внаслідок відсутності надійних синтетичних платформ та обмеженого розуміння фармакології поліміксину [14]. В останні роки зусилля науковців були спрямовані на створення нових похідних поліміксину зі значними перевагами перед старими [13]. Встановлення кореляції між кількістю позитивних зарядів у молекулі поліміксину з його здатністю зв'язуватися з клітинами проксимальних каналців нирок сприяло розробці менш нефротоксичних похідних NAB739 і NAB815, які несуть лише три позитивних заряди замість п'яти, як в старих поліміксинах, і ефективно виводяться з сечею [34]. Перевершили старі поліміксини за протимікробною активністю і виявилися менш нефротоксичними за них похідні, які мають змінений жирний ацильний хвіст і вкорочену лінійну частину (SPR206), змінені аміноацильні групи в циклічній та лінійній частинах (FADDI-02 та FADDI-287), з'єднаний хвіст жирного ацилу із циклічною частиною через складноефірний зв'язок (MicuRx-12). Низка похідних довели свою ефективність при моделюванні інфекційної патології у тварин (FADDI-02, FADDI-287, CA824, MicuRx-12 і SPR206). Деякі знаходяться на етапі дослідження як нові лікарські засоби (MRX-8). Виділені чималі кошти на програми, спрямовані на відкриття нових поліміксинів, повторну розробку старих, а також проведення доклінічних досліджень. Успішно пройшов клінічну фазу 1 SPR741, який не має прямої антибактеріальної активності, однак сенсibilізує мішені до більш ніж 10 різних антибіотиків-партнерів, зазвичай активних лише проти грам-позитивних бактерій та синергічний з кількома бета-лактамами антибіотиками, ефективними проти грам-негативних бактерій [13].

Важливі аспекти оцінки антибактеріальної активності поліміксинів. Дослідницьким групам, які зайняті розробкою похідних поліміксину, слід звернути увагу на важливий практичний аспект: активність поліміксинів

сильно варіює в залежності від умов тестування (середовище росту) та може значно знижуватися внаслідок адсорбції поліміксину на лабораторних пластиках аж до інактивації [35]. Для забезпечення належного порівняння результатів необхідно використовувати стандарт CLSI/EUCAST (метод мікророзведення бульйону Мюллера-Хінтона (CAMHB) з обов'язковим дотриманням певних умов його проведення або метод розведення агару) [13].

Резистентність до поліміксинів. Останнім часом в усьому світі спостерігається зростання резистентності бактерій до антибіотиків, і поліміксини не є виключенням [22]. Поліміксин-стійкі штами все ще не надто розповсюджені, однак, як і у випадку з усіма антибіотиками, резистентність до поліміксину з часом стане більш поширеною, крім того, постійно існує ризик розвитку резистентності до поліміксинів під час терапії [13,17]. Тому наразі ведуться пошуки шляхів отримання похідних, активних проти штамів, резистентних до старих поліміксинів [35]. Стіійкість бактерій до поліміксинів може бути хромосомною, пов'язаною з модифікацією ЛПС, або закодованою на переносних генетичних елементах, а саме генах *mcr* або *mgrB* [16,20,22]. Однак у цьому відношенні поліміксини мають певні переваги перед іншими антибіотиками. Незважаючи на те, що поліміксини або їхні похідні не мають бактерицидної дії на стійкі до поліміксинів штами, вони здатні їх сенсibilізувати до різних «антибіотиків-партнерів» або «анти-грампозитивних антибіотиків», які потрапляють у грам-негативну клітину після порушення бар'єрної функції зовнішньої мембрани поліміксином. Поліміксини сенсibilізують резистентні мішені до таких партнерських антибіотиків, як: рифампіцин, азитроміцин, кларитроміцин, міноциклін, фузидієву кислоту, зидовудин та кілька інших препаратів [13,36–38]. Таку ж властивість мають похідні поліміксину NAB739 та SPR741 [13,39].

Виникнення резистентності до поліміксинів, препаратів «останньої лінії» для лікування інфекцій, спричинених збудниками з множинною резистентністю, вимагає нагальної розробки нових альтернативних протимікробних стратегій, серед яких заслуговує на увагу застосування синергічних комбінацій антибіотиків з антимікробними пептидами [40,41].

Нізин. Антимікробні пептиди мають явні переваги перед звичайними антибіотиками, серед яких: повільніше виникнення резистентності, антибіоплівкова активність широкого спектру та здатність сприятливо модулювати імунну відповідь господаря [18]. Одним з перспективних для використання у медичній галузі антимікробним пептидом є нізин, що продукується бактеріями родів *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* та *Blautia* і належить до лантибіотиків, бактеріоцинів I класу, субтипу A [7,42–44]. Ці бактеріоцини є невеликими (<5 кДа) термостабільними катіонними пептидами,

синтезованими на бактеріальних рибосомах з мРНК, посттрансляційно модифікованими, що містять кілька незвичайних амінокислот (лантіонін, β -метиллантіонін, дегідроаланін та дегідробутирин) [45]. Нізін загально визнаний як безпечний (GRAS) і схвалений для використання в якості харчової добавки Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ), Управлінням з контролю за продуктами і ліками США (FDA) і Європейським агентством з безпеки харчових продуктів (EFSA) з присвоєним номером E 234. За даними EFSA, допустима добова норма споживання нізину становить 1 мг/кг маси тіла [46]. Нізін досі не схвалений для клінічного застосування, але багато досліджень *in vitro* продемонстрували його виражену протимікробну активність, особливо щодо стійких до антибіотиків штамів бактерій [47].

Структура, механізм та спрямованість протимікробної дії нізину. Відомо кілька механізмів протимікробної дії нізину. Проходження нізину через

клітинну стінку чутливих мікроорганізмів починається з його електростатичних і гідрофобних взаємодій з її аніонними компонентами. Подвійна дія нізину (утворення пор і пригнічення синтезу клітинної стінки) опосередковується двома структурними доменами, розташованими на N- і C-кінцях (рис. 2). Три лантіонінові кільця на N-кінцевому домені нізину утворюють клітоподібну оболонку навколо пірофосфатної групи ліпиду II, що призводить до порушення синтезу пептидоглікану клітинної стінки. Зв'язування нізином ліпиду II сприяє утворенню пор у клітинній мембрані. Пептид, що лежить паралельно площині мембрани, згинається в шарнірній області, занурює C-кінець в мембрану і утворює пору, через яку відбувається швидкий витік внутрішньоклітинних речовин і приплив іонів кальцію в цитоплазму. Це призводить до деполаризації цитоплазматичної мембрани і загибелі бактерій [48,49].

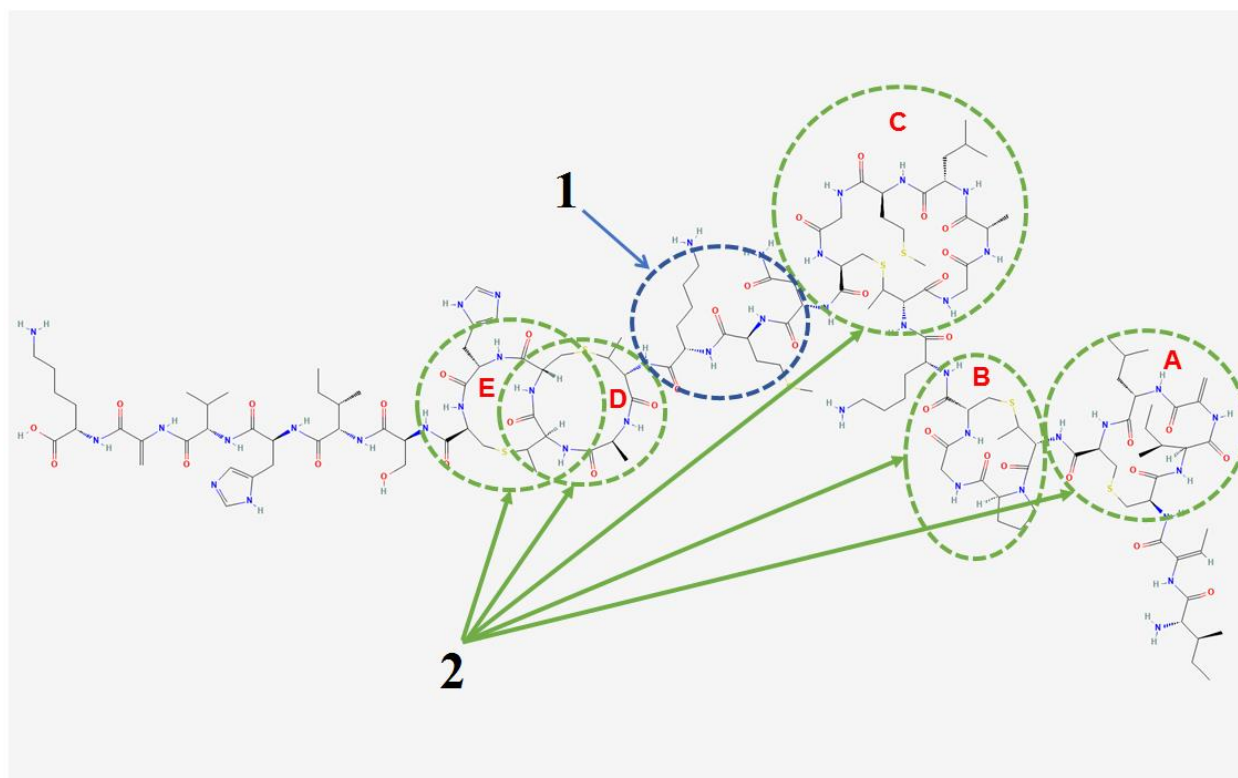


Рисунок 2. Структура нізину: 1 – шарнірна область; 2 - лантіонінові кільця A, B, C, D, E

Також нізін може деформувати мембрану як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій за рахунок неспецифічної взаємодії з фосfolіпідами, викликаючи порушення її природної кривизни, симетрії, щільності упаковки ліпідів, утворення водних порожнин та підвищення її проникності [49]. Нуклеотропна активність нізину полягає в порушенні реплікації ДНК [50,51].

Нізін активний переважно проти грампозитивних бактерій і має обмежену активність щодо

грам-негативних бактерій через нездатність проникати через їх зовнішню мембрану і досягати ліпиду II, розташованого на внутрішній мембрані. Тобто, основною перешкодою, яку необхідно здолати нізину, щоб подіяти на грам-негативні бактерії, є зовнішня мембрана. Модифікація самої молекули нізину або комбіноване застосування зі сполуками (наприклад, етилендіамінтетраоцтовою кислотою) чи фізичними чинниками (термічна обробка, заморожування тощо), які порушують бар'єрну

функцію зовнішньої мембрани, надає нізину можливість реалізувати свій антимікробний потенціал проти грам-негативних бактерій [41,48,52]. Роль пермеабілізуючої сполуки, яка полегшує проходження нізином зовнішньої мембрани, може відігравати антибіотик поліміксин.

Синергічний ефект комбінацій поліміксину та нізину. Низка *in vitro* досліджень довели наявність синергічного ефекту комбінацій поліміксинів та нізину проти грам-негативних бактерій [8,9,40,53,54]. Комбінація нізин-поліміксин продемонструвала ефективне пригнічення біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa*. Автори дійшли висновку, що завдяки зв'язуванню компонента ліпиду А ліпополісахариду поліміксином і, таким чином, пермеабілізації зовнішньої мембрани *P. aeruginosa*, транзит нізину до його цільового ліпиду ІІ цитоплазматичної мембрани полегшується, що призводить до явного синергічного ефекту. Синергічна взаємодія комбінації антибіотика з антимікробним пептидом дозволяє знизити концентрацію поліміксину, отже може бути потенційним шляхом зменшення нефротоксичності поліміксинів під час лікування інфекцій, спричинених *P. aeruginosa* [54,55]. Комбінація нізину та колістину також виявилася успішною при видаленні біоплівок *E. coli* [9,55].

Chi H. та Holo H. виявили синергізм поліміксину В з нізином проти всіх трьох протестованих штамів *Acinetobacter* (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus* і навіть стійкого до поліміксину *A. iwoffii*) та *Escherichia coli* LMGT 3704. Порівняно з окремими протимікробними препаратами, поєднання цих двох сполук спричинило приблизно 2-10 кратне зниження МІК для поліміксину В [53].

Комбінації нізину та поліміксину продемонстрували синергічний ефект щодо трьох з восьми (38%) ізолятів з широкою резистентністю до антибіотиків (XDR) і шести із семи (86%) панрезистентних (PDR) ізолятів *A. baumannii*. Синергію спостерігали при застосуванні нижчих за терапевтичні концентрацій поліміксину В, що може допомогти зменшити дозозалежні побічні ефекти цього антибіотика. Для вивчення клінічних можливостей необхідні додаткові дослідження фармакокінетики та фармакодинаміки нізину [40].

Jahangiri A. зі співавторами дослідили вплив комбінації нізину з колістином на п'ять клінічних ізолятів *A. baumannii* з широкою стійкістю до антибіотиків (XDR), п'ять стійких до колістину клінічних ізолятів *P. aeruginosa*, референтні штами *A. baumannii* ATCC 19606 та *P. aeruginosa* ATCC 27853. Встановлено, що комбінація антибіотика з лантибіотиком мала синергічний ефект щодо референтних штамів, одного клінічного ізоляту *A. baumannii* і трьох клінічних ізолятів *P. aeruginosa*. Щодо решти досліджуваних клінічних ізолятів спостерігався адитивний ефект. Автори припустили, що така відмінність ефектів може бути пов'язана з

різними механізмами резистентності клінічних ізолятів. Високу частоту адитивного ефекту, що забезпечила ця комбінація, теж можна вважати важливим позитивним фактом, оскільки при цьому зменшувався показник МІК антибіотика і бактерії з категорії резистентних переходили в категорію чутливих. При такому підході антибіотики, до яких бактерії раніше були стійкі, можна повторно використовувати [8].

Висновки

Аналіз даних літератури за останні сім років свідчить про обґрунтованість і перспективність комбінованого застосування препаратів з різними механізмами протимікробної дії. Комбінація антибіотика поліміксину з лантибіотиком нізином демонструє переважно синергічний протимікробний ефект проти грам-негативних, зокрема антибіотикорезистентних бактерій. Ймовірний механізм синергії полягає в забезпеченні поліміксином через порушення цілісності зовнішньої мембрани доступу нізину до мішені на внутрішній мембрані (ліпід ІІ) з наступною реалізацією його протимікробного потенціалу. Синергічна взаємодія антибіотика з лантибіотиком дозволяє знизити концентрацію антибіотика, зменшуючи тим самим ймовірність розвитку токсичних ефектів. Адитивний ефект, який спостерігається замість синергічного, свідчить про різну чутливість бактеріальних штамів/ізолятів та притаманні їм різні механізми резистентності. Але адитивний ефект теж має важливе позитивне значення, так як супроводжується зниженням показника МІК антибіотика і говорить про можливість відновлення чутливості бактерій до нього.

Microbiological substantiation of the use of synergistic polymyxin-nisin combinations (review) Knysh O. V., Martynov A. V.

Solving the problem of antibiotic resistance requires the development of new antimicrobial drugs and/or new therapeutic strategies. A promising strategy to combat resistant pathogens is to combine antimicrobials with different mechanisms of action, since it is more difficult for bacteria to develop resistance against several mechanisms at the same time. Of particular interest are antimicrobial peptides, resistance to which develops much more slowly than to conventional antibiotics. Most of the superbugs that pose a serious threat to human health today are gram-negative. Their outer membrane plays the role of a barrier for antimicrobial agents whose targets are located in the inner membrane or in the cytoplasm of bacteria. Review of research reports over the past seven years suggests that combining polymyxins with nisin results in a synergistic or additive antimicrobial effect. Polymyxin- nisin combinations have been shown to be effective against clinically significant gram-negative pathogens such as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The probable mechanism of synergy consists in

providing polymyxin due to the violation of the integrity of the outer membrane of nisin access to the target on the inner membrane (lipid II) with the subsequent realization of its antimicrobial potential. The synergistic interaction of an antibiotic with a lantibiotic allows to reduce the concentration of the antibiotic, thereby reducing the likelihood of developing toxic effects. The additive effect also has an important positive value, as it is accompanied by a decrease of antibiotic's minimal inhibition concentration and indicates the possibility of restoring the sensitivity of bacteria to it. Therefore, synergistic polymyxin-nisin combinations deserve further study and application in clinical practice.

Key words: polymyxin, nisin, synergistic combination, antibiotic resistance, gram-negative bacteria, additive effect, outer membrane, lipopolysaccharide (LPS).

References

- Breijyeh, Z.; Jubeh, B.; Karaman, R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules* 2020, 25 (6), 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>.
- Church, N. A.; McKillip, J. L. Antibiotic Resistance Crisis: Challenges and Imperatives. *Biologia (Bratisl.)* 2021, 76 (5), 1535–1550. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00697-x>.
- Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; et al. Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: The WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 2018, 18 (3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
- WHO. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics (WHO, 2017).
- Chahine, E. B.; Dougherty, J. A.; Thornby, K.-A.; et al. Antibiotic Approvals in the Last Decade: Are We Keeping Up With Resistance? *Ann. Pharmacother.* 2022, 56 (4), 441–462. <https://doi.org/10.1177/10600280211031390>.
- Lewies, A.; Plessis, L. H. D.; Wentzel, J. F. The Cytotoxic, Antimicrobial and Anticancer Properties of the Antimicrobial Peptide Nisin Z Alone and in Combination with Conventional Treatments. In *Cytotoxicity*; Çelik, T. A., Ed.; InTech, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71927>.
- Soltani, S.; Hammami, R.; Cotter, P. D.; et al. Bacteriocins as a New Generation of Antimicrobials: Toxicity Aspects and Regulations. *FEMS Microbiol. Rev.* 2021, 45 (1), fuaa039. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuua039>.
- Jahangiri, A.; Neshani, A.; Mirhosseini, S. A.; et al. Synergistic Effect of Two Antimicrobial Peptides, Nisin and P10 with Conventional Antibiotics against Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* and Colistin-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates. *Microb. Pathog.* 2021, 150, 104700. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104700>.
- Al Atya, A. K.; Abriouel, H.; Kempf, I.; et al. Effects of Colistin and Bacteriocins Combinations on the In Vitro Growth of *Escherichia Coli* Strains from Swine Origin. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 2016, 8 (4), 183–190. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9227-9>.
- Lewies, A.; Du Plessis, L. H.; Wentzel, J. F. Antimicrobial Peptides: The Achilles' Heel of Antibiotic Resistance? *Probiotics Antimicrob. Proteins* 2019, 11 (2), 370–381. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9465-0>.
- Li, Q.; Cebrián, R.; Montalbán-López, M.; et al. Outer-Membrane-Acting Peptides and Lipid II-Targeting Antibiotics Cooperatively Kill Gram-Negative Pathogens. *Commun. Biol.* 2021, 4 (1), 31. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01511-1>.
- Chiu, S.; Hancock, A. M.; Schofner, B. W.; et al. Causes of Polymyxin Treatment Failure and New Derivatives to Fill the Gap. *J. Antibiot. (Tokyo)* 2022, 75 (11), 593–609. <https://doi.org/10.1038/s41429-022-00561-3>.
- Vaara, M. Polymyxins and Their Potential Next Generation as Therapeutic Antibiotics. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 1689. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01689>.
- Ayoub Moubareck, C. Polymyxins and Bacterial Membranes: A Review of Antibacterial Activity and Mechanisms of Resistance. *Membranes* 2020, 10 (8), 181. <https://doi.org/10.3390/membranes10080181>.
- Manioglu, S.; Modaresi, S. M.; Ritzmann, N.; et al. Antibiotic Polymyxin Arranges Lipopolysaccharide into Crystalline Structures to Solidify the Bacterial Membrane. *Nat. Commun.* 2022, 13 (1), 6195. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33838-0>.
- Sabnis, A.; Hagart, K. L.; Klöckner, A.; et al. Colistin Kills Bacteria by Targeting Lipopolysaccharide in the Cytoplasmic Membrane. *eLife* 2021, 10, e65836. <https://doi.org/10.7554/eLife.65836>.
- Tsuji, B. T.; Pogue, J. M.; Zavascki, A. P.; et al. International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* 2019, 39 (1), 10–39. <https://doi.org/10.1002/phar.2209>.
- Magana, M.; Pushpanathan, M.; Santos, A. L.; et al. The Value of Antimicrobial Peptides in the Age of Resistance. *Lancet Infect. Dis.* 2020, 20 (9), e216–e230. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30327-3).
- Weerakoon, D.; Petrov, K.; Pedebos, C.; et al. Polymyxin B1 within the *E. Coli* Cell Envelope: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. Rev.* 2021, 13 (6), 1061–1070. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00869-8>.
- Stefaniuk, E. M.; Tyski, S. Colistin Resistance in Enterobacterales Strains – A Current View. *Pol. J.*

- Microbiol. 2019, 68 (4), 417–427.
<https://doi.org/10.33073/pjm-2019-055>.
21. Nation, R.; Rigatto, M.; Falci, D.; et al. Polymyxin Acute Kidney Injury: Dosing and Other Strategies to Reduce Toxicity. *Antibiotics* 2019, 8 (1), 24.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics8010024>.
22. Nang, S. C.; Li, J.; Velkov, T. The Rise and Spread of Mcr Plasmid-Mediated Polymyxin Resistance. *Crit. Rev. Microbiol.* 2019, 45 (2), 131–161.
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1492902>.
23. Bertani, B.; Ruiz, N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus* 2018, 8 (1), ecosalplus.ESP-0001-2018.
<https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018>.
24. Sun, J.; Rutherford, S. T.; Silhavy, T. J.; et al. Physical Properties of the Bacterial Outer Membrane. *Nat. Rev. Microbiol.* 2022, 20 (4), 236–248.
<https://doi.org/10.1038/s41579-021-00638-0>.
25. Li, Z.; Velkov, T. Polymyxins: Mode of Action. In *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*; Li, J., Nation, R. L., Kaye, K. S., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2019; Vol. 1145, pp 37–54. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_4.
26. Khadka, N. K.; Aryal, C. M.; Pan, J. Lipopolysaccharide-Dependent Membrane Permeation and Lipid Clustering Caused by Cyclic Lipopeptide Colistin. *ACS Omega* 2018, 3 (12), 17828–17834.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02260>.
27. Si, W.; Wang, L.; Usongo, V.; et al. Colistin Induces *S. Aureus* Susceptibility to Bacitracin. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 2805.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02805>.
28. Lima, M. R.; Ferreira, G. F.; Nunes Neto, W. R.; et al. Evaluation of the Interaction between Polymyxin B and *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm and Planktonic Cells: Reactive Oxygen Species Induction and Zeta Potential. *BMC Microbiol.* 2019, 19 (1), 115.
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1485-8>.
29. Yu, Z.; Zhu, Y.; Fu, J.; et al. Enhanced NADH Metabolism Involves Colistin-Induced Killing of *Bacillus Subtilis* and *Paenibacillus Polymyxa*. *Molecules* 2019, 24 (3), 387.
<https://doi.org/10.3390/molecules24030387>.
30. Koen, N.; van Breda, S. V.; Loots, D. T. Elucidating the Antimicrobial Mechanisms of Colistin Sulfate on *Mycobacterium Tuberculosis* Using Metabolomics. *Tuberculosis* 2018, 111, 14–19.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.05.001>.
31. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
32. Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th e.
33. Gai, Z.; Samodelov, S.; Kullak-Ublick, G.; et al. Molecular Mechanisms of Colistin-Induced Nephrotoxicity. *Molecules* 2019, 24 (3), 653.
<https://doi.org/10.3390/molecules24030653>.
34. Vaara, M. New Polymyxin Derivatives That Display Improved Efficacy in Animal Infection Models as Compared to Polymyxin B and Colistin. *Med. Res. Rev.* 2018, 38 (5), 1661–1673.
<https://doi.org/10.1002/med.21494>.
35. Gallardo-Godoy, A.; Hansford, K.; Muldoon, C.; et al. Structure-Function Studies of Polymyxin B Lipononapeptides. *Molecules* 2019, 24 (3), 553.
<https://doi.org/10.3390/molecules24030553>.
36. Brennan-Krohn, T.; Pironti, A.; Kirby, J. E. Synergistic Activity of Colistin-Containing Combinations against Colistin-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018, 62 (10), e00873-18.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00873-18>.
37. MacNair, C. R.; Stokes, J. M.; Carfrae, L. A.; et al. Overcoming Mcr-1 Mediated Colistin Resistance with Colistin in Combination with Other Antibiotics. *Nat. Commun.* 2018, 9 (1), 458.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-02875-z>.
38. Loose, M.; Naber, K. G.; Hu, Y.; et al. Urinary Bactericidal Activity of Colistin and Azidothymidine Combinations against Mcr-1-Positive Colistin-Resistant *Escherichia Coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2019, 54 (1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.04.011>.
39. Tyrrell, J. M.; Aboklaish, A. F.; Walsh, T. R.; et al. The Polymyxin Derivative NAB739 Is Synergistic with Several Antibiotics against Polymyxin-Resistant Strains of *Escherichia Coli*, *Klebsiella Pneumoniae* and *Acinetobacter Baumannii*. *Peptides* 2019, 112, 149–153.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.12.006>.
40. Thomas, V. M.; Brown, R. M.; Ashcraft, D. S.; et al. Synergistic Effect between Nisin and Polymyxin B against Pandrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2019, 53 (5), 663–668.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.03.009>.
41. Lewies, A.; Wentzel, J. F.; Jordaan, A.; et al. Interactions of the Antimicrobial Peptide Nisin Z with Conventional Antibiotics and the Use of Nanostructured Lipid Carriers to Enhance Antimicrobial Activity. *Int. J. Pharm.* 2017, 526 (1–2), 244–253.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.071>.
42. O’Sullivan, J. N.; O’Connor, P. M.; Rea, M. C.; et al. Nisin J, a Novel Natural Nisin Variant, Is Produced by *Staphylococcus Capitis* Sourced from the Human Skin Microbiota. *J. Bacteriol.* 2020, 202 (3).
<https://doi.org/10.1128/JB.00639-19>.
43. Hatzioanou, D.; Gherghisan-Filip, C.; Saalbach, G.; et al. Discovery of a Novel Lantibiotic Nisin O from *Blautia Obeum* A2-162, Isolated from the Human Gastrointestinal Tract. *Microbiology* 2017, 163 (9), 1292–1305. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000515>.
44. Lawrence, G. W.; Garcia-Gutierrez, E.; Walsh, C. J.; et al. Nisin G Is a Novel Nisin Variant Produced by a Gut-Derived *Streptococcus Salivarius*; preprint; *Microbiology*, 2022.
<https://doi.org/10.1101/2022.02.15.480493>.
45. Meade; Slattery; Garvey. Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight against Multi Drug

- Resistant Species: Resistance Is Futile? *Antibiotics* 2020, 9 (1), 32. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010032>.
46. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS); Younes, M.; Aggett, P.; et al. Safety of Nisin (E 234) as a Food Additive in the Light of New Toxicological Data and the Proposed Extension of Use. *EFSA J.* 2017, 15 (12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5063>.
47. Barbosa, A. A. T.; de Melo, M. R.; da Silva, C. M. R.; et al. Nisin Resistance in Gram-Positive Bacteria and Approaches to Circumvent Resistance for Successful Therapeutic Use. *Crit. Rev. Microbiol.* 2021, 47 (3), 376–385. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1893264>.
48. Li, Q.; Montalban-Lopez, M.; Kuipers, O. P. Increasing the Antimicrobial Activity of Nisin-Based Lantibiotics against Gram-Negative Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018, 84 (12), e00052-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00052-18>.
49. Prince, A.; Sandhu, P.; Ror, P.; et al. Lipid-II Independent Antimicrobial Mechanism of Nisin Depends On Its Crowding And Degree Of Oligomerization. *Sci. Rep.* 2016, 6 (1), 37908. <https://doi.org/10.1038/srep37908>.
50. Galván Márquez, I. J.; McKay, B.; Wong, A.; et al. Mode of Action of Nisin on *Escherichia Coli*. *Can. J. Microbiol.* 2020, 66 (2), 161–168. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0315>.
51. Jensen, C.; Li, H.; Vestergaard, M.; et al. Nisin Damages the Septal Membrane and Triggers DNA Condensation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 1007. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01007>.
52. Özdemir, F. N.; Buzrul, S.; Özdemir, C.; et al. Determination of an Effective Agent Combination Using Nisin against *Salmonella* Biofilm. *Arch. Microbiol.* 2022, 204 (3), 167. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02766-4>.
53. Chi, H.; Holo, H. Synergistic Antimicrobial Activity Between the Broad Spectrum Bacteriocin Garvicin KS and Nisin, Farnesol and Polymyxin B Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Curr. Microbiol.* 2018, 75 (3), 272–277. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1375-y>.
54. Field, D.; Seisling, N.; Cotter, P. D.; et al. Synergistic Nisin-Polymyxin Combinations for the Control of *Pseudomonas* Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* 2016, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01713>.
55. Mathur, H.; Field, D.; Rea, M. C.; et al. Fighting Biofilms with Lantibiotics and Other Groups of Bacteriocins. *Npj Biofilms Microbiomes* 2018, 4 (1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0053-6>.