

ВАРНЕРИН – НОВЫЙ ЛАНТИОНИНСОДЕРЖАЩИЙ ПЕПТИД: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ*



В.П. Коробов,
кандидат медицинских наук,
заведующий лабораторией
биохимии развития
микроорганизмов,
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН



Л.М. Лемкина,
кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник,
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН



Т.В. Полюдова,
кандидат биологических наук,
младший научный сотрудник,
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН

Негативные последствия широкого и во многом бесконтрольного употребления антибиотиков, проявляющиеся быстрым формированием устойчивых к этим соединениям бактерий, определяют необходимость экстренной разработки эффективных путей ингибирования антибиотикорезистентности. Одним из направлений решения проблемы может стать использование низкомолекулярных катионных пептидов, которые на всех уровнях организации живых систем функционируют в качестве эффективных факторов подавления неблагоприятного бактериального окружения. Выделенный авторами низкомолекулярный пептид варнерин относится к семейству лантибиотиков, обладает высокой устойчивостью к различным неблагоприятным внешним факторам и широким спектром антибактериального действия, в основе которого лежит быстрое нарушение мембранного аппарата бактерий с запуском цепи событий, приводящих к полному лизису клеток.

Установление А. Флемингом бактериолитического действия зеленой плесени открыло новую, антибиотическую эру подавления возбудителей инфекционных

заболеваний человека и животных. Однако уже после первых лет успешного практического использования антибиотиков появились сведения о снижении эффектив-

* Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №№ 04-04-96148-р2004урал_а, 06-04-81032-Бел_а, 07-04-01546-а, 07-04-13531-офи_ц, 07-04-96070-р_урал_а, Программ РАН «Фундаментальные науки – медицине» и «Молекулярная и клеточная биология» и гранта конкурса фундаментальных исследований, выполняемых совместно организациями УрО и ДВО РАН.

ности антибактериального действия этих соединений. С начала 80-х годов прошлого столетия объем данных о формировании и быстром географическом распространении антибиотикорезистентных штаммов бактерий стал стремительно нарастать, при этом выявилось определяющее значение таких штаммов в поддержании высокого уровня инфекционных заболеваний [4].

Появление устойчивости к антибиотикам является защитной реакцией бактериальных популяций на неблагоприятные факторы среды за счет селекции клонов клеток, нейтрализующих антибиотики путем их химических модификаций, деструкции, изменения структуры клеточных мишеней или формирования особых систем выброса в окружающую среду. В связи с этим постоянная необходимость подавления инфекционных факторов, с одной стороны, и высокие адаптационные свойства бактерий – с другой, определяют непрерывный поиск и внедрение в клиническую практику новых соединений с механизмами действия, отличными от таковых у широко используемых антибиотиков.

В свете представленного, пристальное внимание исследователей привлекают низкомолекулярные антибактериальные соединения пептидной природы, которые продуцируются и эффективно используются микроорганизмами в конкурентной борьбе за источники питания и жизненное пространство. Синтезируемые на рибосомах антибактериальные пептиды обладают сравнительно небольшой молекулярной массой (до 50–60 остатков аминокислот) и часто – выраженным суммарным положительным зарядом. Важной характеристикой этих соединений является амфифильность и выраженная мимикрия пространственной структуры их молекул при изменении гидрофобности окружающей среды. Это особое свойство наиболее полно реализуется при контакте пептидов с мембранными структурами, вызывая нарушение контроля проницаемости мембран с резким снижением протондвижущей силы и полную дезорганизацию их структуры вплоть до лизиса

бактериальной клетки. Действие некоторых антибактериальных пептидов осуществляется через специфические внутриклеточные мишени [2].

Наиболее полно изучены низкомолекулярные катионные пептиды грампозитивных бактерий, в частности лантибиотиков – пептиды с характерными особенностями молекул – наличием в структуре остатков дегидрированных аминокислот, двойная связь которых атакуется сульфгидрильными группами остатков цистеина с формированием $-C-S-C-$ связей и образованием необычных аминокислот: лантионина и β -метиллантионина. Появление прочных тиоэфирных связей приводит к циклизации структуры полипептидной цепи и одновременно повышает устойчивость пептидов к факторам окружающей среды, в том числе протеазам. Характерной биологической особенностью лантибиотиков является широкий спектр их ингибирующего действия на клетки не только грампозитивных, но и некоторые штаммы грамотрицательных бактерий [1].

Удивительным фактом истории самого известного из лантибиотиков – низина является то, что десятилетия его использования в качестве пищевого консерванта не привели к появлению низинрезистентных штаммов. Это позволяет рассматривать лантибиотиков в качестве перспективных средств подавления возбудителей различных инфекционных заболеваний человека и животных и стимулирует поиск новых пептидов этого класса, которые представляют не только академический, но и выраженный практический интерес [5].

В работе представлены данные о варнерине – новом пептиде семейства лантибиотиков. Пептид продуцируется бактериями *Staphylococcus warneri* IEGM KL-1 при культивировании на жидких питательных средах [3]. Комбинацией различных хроматографических процедур варнерин выделен в электрофоретически гомогенном состоянии. Чистота полученного препарата пептида, обладающего молекулярной массой 2999 Da, подтверждена обратно-фазовой хроматографией высо-

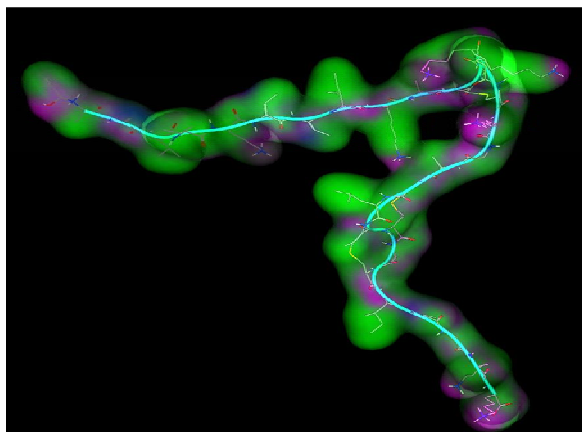


Рис. 1. Пространственная структура варнерина (светлыми участками молекулы представлены гидрофобные области, затемненными – катионные зоны)

кого давления и масс-спектрометрией. Изучением аминокислотного состава в составе пептида обнаружено два остатка β-метиллантионина, а проведением сиквенса – наличие уникальной последовательности аминокислотных остатков, что позволяет рассматривать варнерин в качестве нового представителя семейства лантибиотиков.

Изучение пространственной структуры варнерина показало, что все положительно заряженные и гидрофобные остатки аминокислот хорошо представлены на поверхности молекулы, что должно значительно облегчать взаимодействие пептида с мембранными структурами бактериальных клеток (рис. 1).

Представленная на рис. 1 пространственная структура пептида в виде «бумеранга» позволяет предполагать его выраженные мембранотропные эффекты, вплоть до полной дезорганизации структуры и функций клеточных мембран.

Анализ антибактериальной активности пептида выявил ингибирующее действие на развитие грампозитивных бактерий родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus* и *Rhodococcus*. Пептид эффективно подавляет рост антибиотикоустойчивых штаммов *S.epidermidis*, в том числе штамма, резистентного к антибиотику фторхинолонового ряда ципрофлоксацину.

Исследования показали, что варнерин проявляет выраженную устойчивость к пептиду в среду формирования биопле-

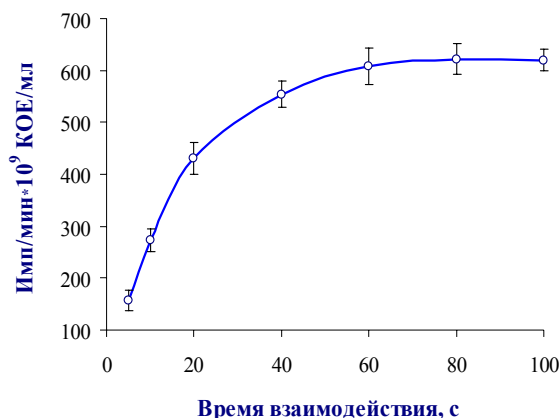


Рис. 2. Динамика связывания антибактериального 14С-пептида с клетками *S.epidermidis* 33

термической обработке при 100°C, полностью сохраняет биологическую активность после двухчасового пребывания в различных средах при pH от 2,0 до 8,0 и вызывает снижение (на 20–98 %) накопления биомассы чувствительных бактерий *S.epidermidis* в диапазоне pH от 5,0 до 9,0 с максимумом эффекта при pH 7,0–8,0. Особо важной особенностью пептида является его относительная устойчивость к действию протеолитических ферментов.

Внесение варнерина в бактериальную культуру приводит к моментальному, уже через минуту достигающему насыщения, связыванию с клетками (рис. 2).

Адсорбция пептида вызывает ускорение поглощения бактериями кислорода, которое, по-видимому, отражает разобщающее действие варнерина, поскольку одновременно наблюдаются резкое падение электрической компоненты мембранного потенциала и гибель практически половины бактерий (рис. 3).

При электронно-микроскопическом исследовании интактных бактериальных клеток (рис. 4, а) и подвергшихся атаке варнерином (рис. 4, б) обнаруживаются резкие нарушения мембранного аппарата в виде многочисленных инвагинаций и везикуляции цитоплазматической мембраны, локальных изменений плотности цитоплазмы и толщины клеточных стенок, которые, в конечном итоге, приводят к лизису большей части клеток.

Выраженное литическое действие варнерина обнаружено и в экспериментах на биопленках *S.epidermidis* 33. Внесение нок приводит к значительному снижению

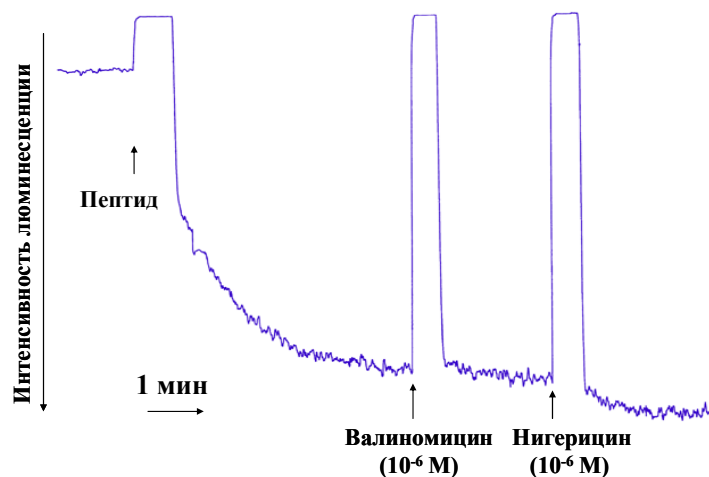


Рис. 3. Падение мембранного потенциала клеток *S.epiderm-dis* 33 под действием варнерина (125 мкг/мл)

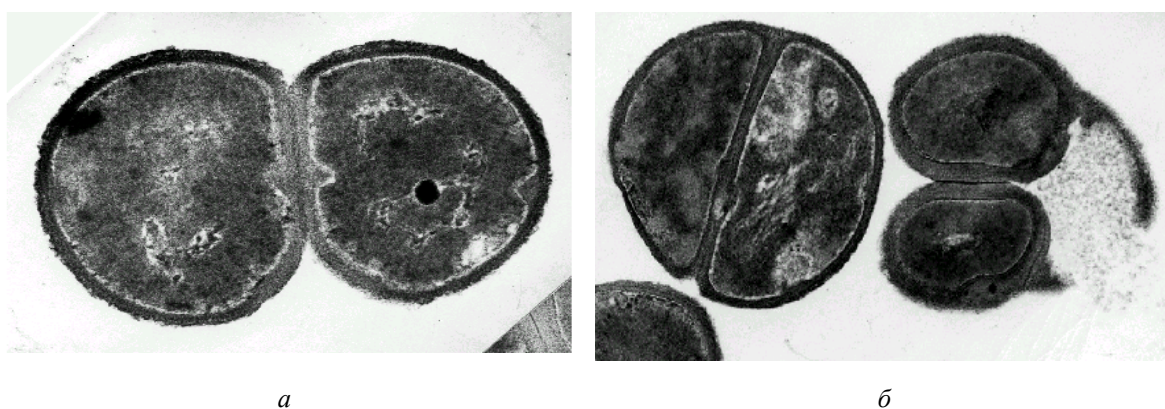


Рис. 4. Электронная микроскопия срезов клеток *S.epidermidis*, подвергнутых обработке варнерином (125мкг/мл) в течение 4 ч

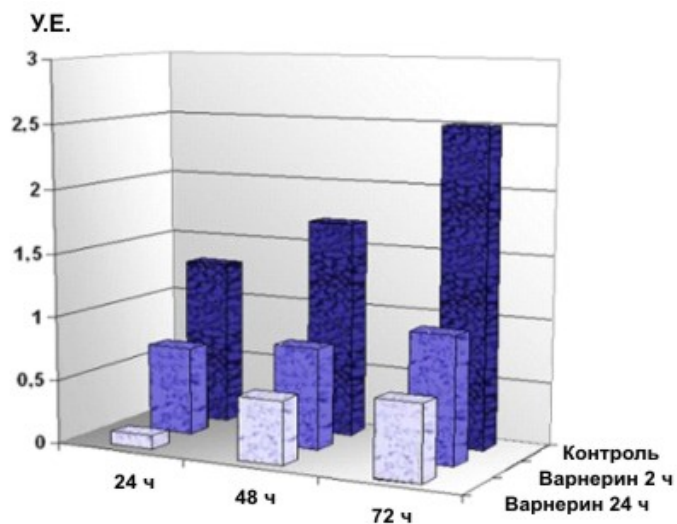


Рис. 5. Снижение биомассы биопленок под действием варнерина, планшеты, полистирол (условные единицы, У.Е.)

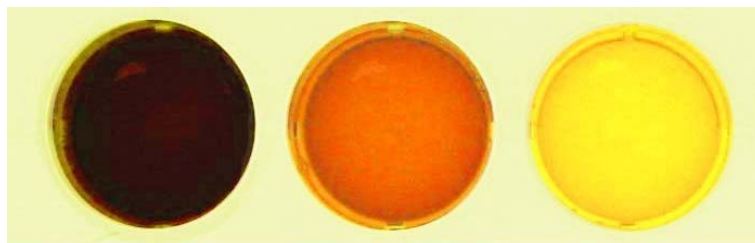


Рис. 6. Влияние варнерина на жизнеспособность бактерий *S.epidermidis* 33 в биопленках, чашки Петри, полистирол (окрашивание тетразолием)

биомассы этих образований (рис. 5).

Эффект варнерина проявляется как на начальных стадиях образования пленочных структур (24 ч инкубации), так и на зрелых биопленках (72 ч инкубации). При этом литическое действие пептида обнаруживается уже через 2 ч действия, но наиболее ярко – через 24 ч. Разрушающее биопленки действие пептида сопровождается значительным снижением жизнеспособности входящих в них клеточных компонентов (рис. 6).

Результаты экспериментов на пленочных структурах указывают на выраженный диспергирующий эффект варнерина, что особенно важно для разработки методов борьбы с заболеваниями особой груп-

пы – так называемыми катетер-ассоциированными инфекциями, этиологическими факторами которых чаще всего являются бактерии рода *Staphylococcus*.

Таким образом, имеющиеся данные позволяют рассматривать варнерин в качестве перспективного средства профилактики и лечения заболеваний бактериальной этиологии как самостоятельно, так и в комбинации с другими антибактериальными препаратами. Одновременно представленное указывает на необходимость разработки лабораторного регламента получения этого пептида в количествах, необходимых для проведения биологических испытаний.

Библиографический список

1. Guder A., Wiedemann I., Sahl HG. // Biopolymers. – 2000. – Vol. 55 (1). – P. 62–73.
2. Hoffmann A., Pag U., Wiedemann I., Sahl YG. // Farmaco. – 2002. – Vol. 57 (8). – P. 685–691.
3. Korobov V.P., Lemkina L.M., Polyudova T.V. // Dokl. Biol. Sci. – 2003. – Vol. 390. – P. 703–705.
4. Levy S.T. // Clin. Infect. Dis. 2001. Vol. 33 (Suppl 3). S124-9.
5. Pag U., Sahl HG. // Curr. Pharm. Des. – 2002. – Vol. 8 (9). – P. 815–833.