

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.182.99

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКЗОГЕННЫХ АНИОННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ В ОТНОШЕНИИ *Mycobacterium tuberculosis* И *Escherichia coli*

Ю.А. Микулович¹, научный сотрудник, Г.М. Сорокоумова^{1, @}, доцент,
А.А. Селищева², ведущий научный сотрудник, В.И. Швец¹, профессор

¹Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий),
кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Москва, 119571 Россия

²МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

@ Автор для переписки, e-mail: galinams@yandex.ru

Исследовано влияние анионных фосфолипидов: кардиолипина, фосфатидилглицерина и фосфатидной кислоты на рост грамотрицательных бактерий *E. coli* BL21(DE3), а также на грамположительные бактерии *M. tuberculosis* H37Rv. Показано, что воздействие всех изученных анионных фосфолипидов на бактерии имеет дозозависимый характер: липиды в концентрациях до 335 мкМ не оказывают никакого действия на бактерии, тогда как в концентрациях выше 335 мкМ ингибируют рост и вызывают гибель клеток обоих микроорганизмов. С помощью тест-системы на основе штамма *E. coli* CSH50 *sfIA::lacZ* при культивировании бактерий с указанными фосфолипидами обнаружена индукция ДНК-репарационного SOS-ответа клеток, что является свидетельством повреждения ДНК из-за стабилизации липидами переходных комплексов ДНК-топоизомеразы (I или II типа) с временно расщепленной этим ферментом ДНК. Однако ни фосфатидилглицерин, ни фосфатидная кислота не влияли на активность ДНК-топоизомераз обоих типов из *E. coli* в экспериментах *in vitro*. В то же время кардиолипин, несмотря на ингибирование активности этих ферментов, не стабилизировал переходные комплексы. Таким образом, повреждение ДНК в присутствии этих анионных фосфолипидов не связано с их действием на ДНК-топоизомеразы. Полученные данные об их бактерицидной активности в отношении грамположительных *M. tuberculosis* и грамотрицательных *E. coli* позволяют предложить анионные фосфолипиды в качестве самостоятельных антибактериальных агентов или же в виде матрицы для создания эффективных липосомальных форм лекарственных препаратов, в частности, противотуберкулезных.

Ключевые слова: анионные фосфолипиды, бактерицидное действие, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, ДНК-топоизомеразы.

THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXOGENOUS ANIONIC PHOSPHOLIPIDS AGAINST *Mycobacterium tuberculosis* AND *Escherichia coli*

Yu.L. Mikulovich¹, G.M. Sorokoumova^{1, @}, A.A. Selishcheva², V.I. Shvets¹

¹Moscow Technological University (Institute of Fine Chemical Technologies),
Moscow, 119571 Russia

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

@Corresponding author e-mail: galinams@yandex.ru

The effect of anionic phospholipids, namely, cardiolipin, phosphatidylglycerol and phosphatidic acid, on the growth of gram-negative bacteria *E. coli* BL21(DE3), as well as gram-positive bacteria *M. tuberculosis* H37Rv was investigated in this study. The influence of all anionic phospholipids tested on the bacteria growth was shown to be dose-dependent. Lipids at concentrations below 335 μM didn't affect, while at 335 μM and above they repressed bacteria growth and caused cellular death of both type of microorganisms. SOS response induction was observed by using strain *E. coli* CSH50 *sfIA::lacZ* during cultivation *E. coli* with cardiolipin, phosphatidylglycerol and phosphatidic acid. This indicates DNA damage through double-strand breaks. One reason of the DNA damage could be stabilization of transient complexes of DNA topoisomerase (types I and II) with DNA temporary broken by anionic phospholipids. However, neither phosphatidylglycerol

nor phosphatidic acid affect the activity of types I and II DNA topoisomerases from E. coli in vitro. In contrast, cardiolipin inhibited DNA topoisomerase I and DNA gyrase (type II topoisomerase), but didn't stabilize transient complexes of the enzyme with DNA. It indicates that DNA damage due to anionic phospholipids exposure didn't result from inhibition of DNA topoisomerase activity through stabilization of the transient complex of the enzyme with DNA. The obtained results of cardiolipin, phosphatidylglycerol and phosphatidic acid bactericidal activity against gram-positive M. tuberculosis and gram-negative E. coli make it possible to use anionic phospholipids as individual antimicrobial agents or as a matrix of effective and non-toxic liposomal drugs for tuberculosis treatment.

Keywords: anionic phospholipids, bactericidal activity, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, DNA topoisomerases.

Введение

В настоящее время резистентные штаммы *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ, возбудитель туберкулеза) с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (соответственно МЛУ и ШЛУ) получили широкое распространение во всем мире, поэтому по-прежнему актуален поиск новых противотуберкулезных препаратов (ППП). Одним из перспективных направлений является создание липосомальных форм антибиотиков. При этом «пустые» (без антибиотика) липосомы на основе природного анионного липида кардиолипина (КЛ), выделенного из сердца быка, как нами показано ранее, обладают антибактериальной активностью в отношении чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv [1] и резистентного штамма *M. tuberculosis* MS-115 с МЛУ [2].

Анионные фосфолипиды (ФЛ): КЛ, фосфатидилглицерин (ФГ) и фосфатидная кислота (ФК) являются структурными компонентами клеточной мембраны большинства про- и эукариотических клеток. В частности, КЛ обнаружен в цитоплазматической мембране грамотрицательных бактерий *E. coli* [3] и грамположительных *M. tuberculosis* [4], а также во внутренней мембране митохондрий эукариот [5], ФГ – в цитоплазматической мембране *E. coli*. Кроме того, ФГ является предшественником в биосинтезе КЛ. Анионные ФЛ располагаются в плазматической мембране бактерий в процессе деления клетки неравномерно – в основном, в центральной части клетки и у ее полюсов, – образуя так называемые «домены». Это особенно важно при выборе и узнавании центра деления клетки амфифильными белками клеточного цикла, например, DnaA (инициация репликации ДНК в *oriC*) [6], MinD (часть MinCDE-системы, предотвращающей позиционирование дивисомы у полюсов *E. coli*) [7] и FtsA (бактериальный актин, который является белком-линкером для белка FtsZ (бактериальный тубулин), отвечающий за нацеливание Z-кольца на центральный мембранный домен). КЛ и ФГ взаимодействуют с компонентами дыхательной цепи: сукцинатдегидрогеназой, формиатдегидрогеназой N (FdnGHI), нитратредуктазным комплексом (NarGHI) [8]. В последнем случае такое взаимодействие приводит к активации NarGHI за счет правильной фикса-

ции гидрохинонового субстрата [8]. Кроме того, КЛ и ФГ взаимодействуют с белками транслокационного комплекса SecYEG [9], белками-переносчиками, ответственными за множественную лекарственную устойчивость [10]. В процессе клеточного дыхания КЛ, благодаря своим анионным свойствам и связыванию с белками окислительного фосфорилирования, выступает протонной ловушкой, поставляя протоны к АТФ-синтазе [11]. В литературе также имеются данные о том, что наличие анионных ФЛ, в частности ФК, необходимо для нормального функционирования K⁺-канала KcsA в *Streptomyces lividans*, поскольку в отсутствие этих ФЛ данный канал находится в закрытом состоянии [12]. Не менее интересным является участие КЛ в образовании спор бактериями *Bacillus subtilis* [13]. Также известно, что КЛ ингибирует *in vitro* активность ДНК-топоизомеразы I, отвечающей за топологическое состояние ДНК [14], и Lon-протеазы [15] из *E. coli*.

ФК не является таким широко распространенным компонентом мембран, как ФГ и КЛ, однако, несмотря на ее малые количества в клетках по сравнению с общим количеством ФЛ, является ключевым интермедиатом в биосинтезе триацилглицеринов, а также важной сигнальной молекулой [16].

Итак, в норме анионные ФЛ присутствуют во всех бактериальных клетках и выполняют важные функции, например, сигнальную (ФК) или строительную и регуляторную (ФГ и КЛ).

Целью нашей работы было изучение действия экзогенных анионных фосфолипидов КЛ, ФГ и ФК (в виде липосом) на рост *E. coli*, а также ФГ и ФК – на рост чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv для определения специфичности их действия и установления возможного механизма действия.

Экспериментальная часть

Материалы. В работе использовали динатриевую соль кардиолипина из сердца быка, в состав которого входят остатки линолевой (~87%) и олеиновой (~8%) кислот (Avanti Polar Lipids, США); ФГ и ФК, полученные нами методом ферментативного полусинтеза [17] при действии фосфолипазы D из капусты на фосфатидилхолин (ФХ) из сои Lipoid

S-100 (Lipoid GmbH, Германия); плазмиду pUC19 (Invitrogen, США); топоизомеразу I из *E. coli* (New England Biolabs, США); ДНК-гиразу, предоставленную доктором Энтони Максвеллом (John Innes Centre, Великобритания).

В работе использовались растворители: хлороформ, метанол, ацетон марки х.ч. (Химмед, Россия).

В качестве объектов исследования использовались следующие микроорганизмы: стандартизованная культура лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, штаммы *Escherichia coli* BL21 (DE3) и CSH50 λ sfIA::lacZ.

Методы. Липосомы (большие одноламеллярные везикулы, БОЛВ) из ФЛ (ФК, ФГ и КЛ) получали экструзией мультиламеллярных везикул (МЛВ) методом, описанным в работах [1, 2].

Влияние анионных ФЛ на рост *M. tuberculosis*. Культивировали *M. tuberculosis* H37Rv в течение 2 недель при 37°C и стандартизовали по лекарственной чувствительности и КОЕ. Затем в 96-ти-луночный планшет вносили 150 мкл липосом из ФЛ (50, 100, 200, 335, 500, 669 мкМ) в бульоне Дюбо и 100 мкл *M. tuberculosis* H37Rv (5×10^5 КОЕ). В качестве контрольных образцов в лунки планшета вносили: 1) *M. tuberculosis* H37Rv без препаратов и 2) бульон Дюбо. Планшет помещали в CO₂-инкубатор и культивировали микобактерии при 37°C в течение 20 сут. Через каждые 1-2 сут измеряли оптическую плотность культуры при 600 нм (OD₆₀₀) на планшетном ридере «Sigma» (США).

Влияние анионных ФЛ на рост *E. coli*. Ночную культуру клеток *E. coli* BL21(DE3) пересеивали в свежую жидкую среду LB (1:50) и культивировали при 37°C до достижения логарифмической фазы роста (OD₆₀₀ = 0.1). В 96-ти-луночный планшет вносили 50 мкл клеток *E. coli* и липосомы из ФЛ (конечная концентрация липида 100, 200, 335 и 500 мкМ) и добавляли среду LB до конечного объема 100 мкл. В качестве контрольного образца использовали *E. coli* без препаратов. Планшет инкубировали при 37°C в течение 5 ч с перемешиванием 200 об/мин. Рост культуры контролировали каждый час, измеряя OD₆₀₀. Через 5 ч проводили посев серии 10-кратных разведений на 1.5% агар LB, чашки Петри термостатировали при 37°C в течение 24 ч, затем проводили подсчет КОЕ.

Изучение ДНК-репарационного SOS-ответа *E. coli* при инкубации с ФЛ. Газон клеток *E. coli* CSH50 λ sfIA::lacZ на поверхности агаризованной среды МакКонки (Difco, США) получали по методике [18]. На него наносили по 5 мкл препаратов: 1 и 1.5 мМ ФЛ в виде БОЛВ, 12 мкМ ципрофлоксацина и 30 мкМ микроцина В (McB) в качестве положительных контролей и 20 мкМ микроцина С (McC) как от-

рицательный контроль. Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение 24 ч.

Получение и выделение суперскрученной ДНК для реакций с топоизомеразой I и ДНК-гиразой. Суперскрученную плазмиду pUC19 получали и выделяли щелочным лизисом по протоколу с помощью QIAGEN Plasmid Maxi Kit.

Получение релаксированной ДНК для реакции с ДНК-гиразой в присутствии АТФ. Для получения релаксированной ДНК суперскрученную pUC19 обрабатывали топоизомеразой I *E. coli* в течение ночи в буфере, состав которого описан ниже (см. Реакция релаксации суперскрученной ДНК, катализируемая топоизомеразой I). Останавливали реакцию инаktivированием фермента, нагревая реакционную смесь при 65°C в течение 20 мин.

Реакции с топоизомеразой проводили в твердотельном термостате «Гном» (ДНК-технология, Россия), рассчитанном на микропробирки типа Eppendorf.

Реакция релаксации ДНК, катализируемая топоизомеразой I. Реакционная смесь общим объемом 15 мкл содержала 2 мкг суперскрученной ДНК pUC19, 5 мкл липосом ФЛ с концентрациями 90, 300 и 600 мкМ и 2.5 ед. акт. топоизомеразы I *E. coli* в буфере, имеющим следующий состав: 50 мМ ацетат натрия, 20 мМ трис-ацетат (рН 7.9), 10 мМ ацетат магния и 1 мМ дитиотреитол (ДТТ). Реакцию проводили при 37°C в течение 90 мин, после чего останавливали, добавляя к реакционной смеси 15 мкл STEB-буфера (40% сахароза, 100 мМ трис-НСl, рН 7.5, 1 мМ ЭДТА, 2 мг/мл бромфеноловый синий) и 15 мкл хлороформа. Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 0.9% (w/v) агарозном геле в ТАЕ-буфере (40 мМ трис-ацетат, 1 мМ ЭДТА), не содержащем бромистого этидия, в течение 2 ч (70 В). По окончании фореа гель окрашивали бромистым этидием (10 мкг/мл), продукты реакции анализировали с помощью трансиллюминатора с использованием программного обеспечения гель-документации (Хеликон, Россия).

Реакция суперскручивания ДНК, катализируемая ДНК-гиразой в присутствии АТФ. Реакционная смесь объемом 15 мкл состояла из 2 мкг релаксированной ДНК pUC19, 5 мкл липосом ФЛ с концентрациями 90, 300, 600 мкМ, 1 и 1.5 мМ и 1.5 ед. акт. ДНК-гиразы *E. coli* в буфере следующего состава: 35 мМ трис-НСl (рН 7.5), 24 мМ КСl, 4 мМ MgCl₂, 2 мМ ДТТ, 1.8 мМ спермидин, 1 мМ АТФ, 6.5% (w/v) глицерин и 0.1 мг/мл альбумин. Реакцию проводили при 37°C в течение 30 мин, анализ продуктов реакции осуществляли по методике, описанной для топоизомеразы I. В качестве положительного контроля использовали ципрофлоксацин.

Результаты и их обсуждение

Влияние анионных ФЛ на рост *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Как было показано нами ранее, природный фосфолипид КЛ обладает антибактериальной активностью в отношении микобактерий туберкулеза [1, 2]. В настоящем исследовании изучали действие на микобактерии других анионных ФЛ – ФГ и ФК, – которые являются структурными

компонентами КЛ. Эти липиды были получены нами путем ферментативного перефосфатидирования ФХ соевых бобов с использованием фосфолипазы D из капусты. Выбор соевого ФХ в качестве источника для получения ФК и ФГ обусловлен тем, что его жирнокислотный состав близок к составу КЛ из сердца быка и представлен преимущественно остатками линолевой кислоты C18:2 (70%) (рис. 1).

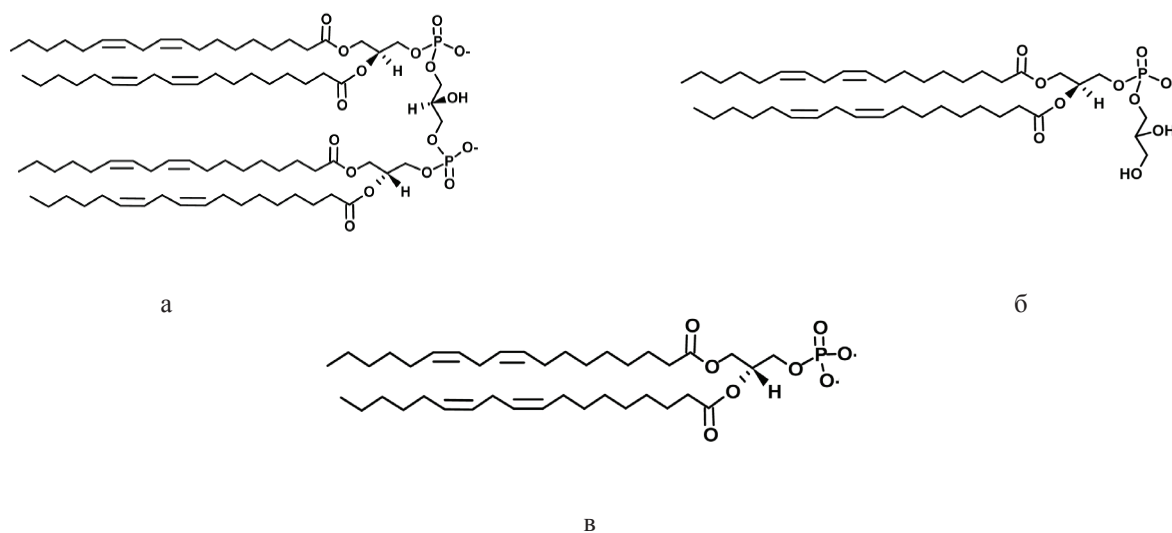


Рис. 1. Структурные формулы фосфолипидов: кардиолипина (а), фосфатидилглицерина (б) и фосфатидной кислоты (в).

Было изучено влияние указанных выше липидов на рост чувствительного к ПТП штамма *M. tuberculosis* H37Rv. О росте бактерий судили по величине оптической плотности культуры, измеренной при длине волны 600 нм (OD_{600}). На рис. 2 представлены кривые роста *M. tuberculosis* H37Rv

(исходно 10^5 КОЕ) в течение 20 сут в присутствии ФЛ в концентрациях 50, 335, 500 и 669 мкМ. Указанные концентрации ФЛ были выбраны с учетом того, что определенная нами минимальная ингибирующая концентрация (МИК) КЛ в отношении МБТ *in vitro* равна 335 мкМ [1].

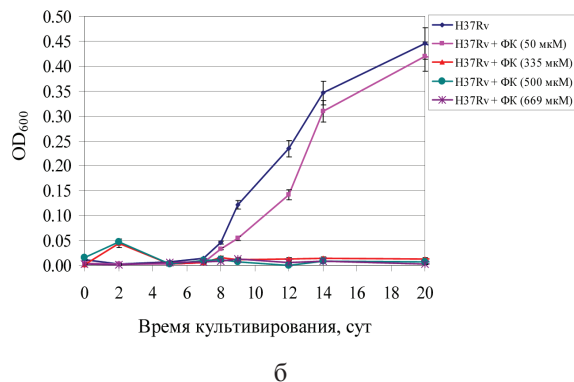
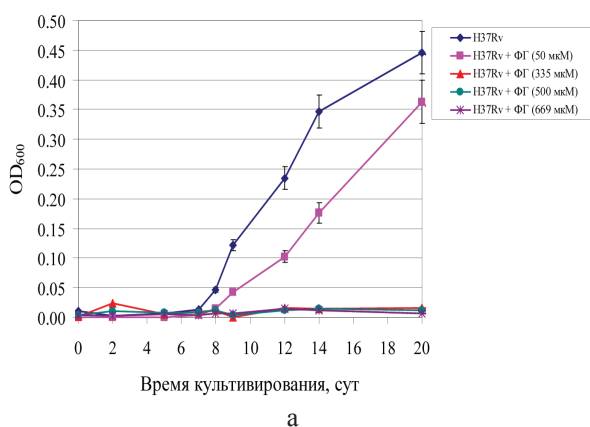


Рис. 2. Кривые роста *M. tuberculosis* H37Rv (исходно 10^5 КОЕ) в присутствии 50, 335, 500 и 669 мкМ ФГ (а) и ФК (б) при 37°C в течение 20 сут. Результаты представлены в виде среднего значения трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение (СО).

Культура клеток МБТ без препаратов (контроль) активно росла в течение 20 сут, культивирование МБТ с 50 мкМ ФГ приводило к незначительному подавлению роста микобактерий, что выразалось в снижении OD_{600} культуры в среднем на 0.1 ед. по сравнению с контролем. ФГ в концентрациях 335, 500 и 669 мкМ ингибировал рост клеток полностью, при этом OD_{600} культуры на протяжении 20 суток не отличалась от начального значения. Инкубация микобактерий туберкулеза с ФК в концентрации 50 мкМ не влияла на рост клеток, о чем свидетельствует кривая роста клеток, аналогичная кривой роста контрольной культуры МБТ, а ФК в концентрациях 355, 500 и 669 мкМ полностью ингибировала рост клеток.

Таким образом, мы установили, что анионные фосфолипиды ФГ и ФК проявляют ингибирующую активность в отношении МБТ, наряду с КЛ, причем в тех же

концентрациях, что и КЛ. Полученные нами данные об антимикобактериальном действии ФК не противоречат литературным, согласно которым экзогенная ФК подавляет размножение МБТ внутри инфицированных макрофагов [19]. Важно, что цвиттерионный ФХ и гликофинголипиды, как нами было обнаружено ранее [20], не влияли на рост МБТ. Это позволяет предположить, что для бактерицидного действия ФЛ на микобактерии важную роль играет отрицательный заряд липида.

Влияние анионных ФЛ на рост *Escherichia coli* BL21(DE3). Нами было изучено действие тех же анионных липидов ФГ, ФК и КЛ на рост быстрорастущих грамотрицательных бактерий *E. coli*, который оценивали по оптической плотности культуры при 600 нм. *E. coli* (исходно 3×10^8 КОЕ) культивировали с липидами в концентрациях 100, 200, 335 и 500 мкМ при 37°C в течение 5 ч (рис. 3).

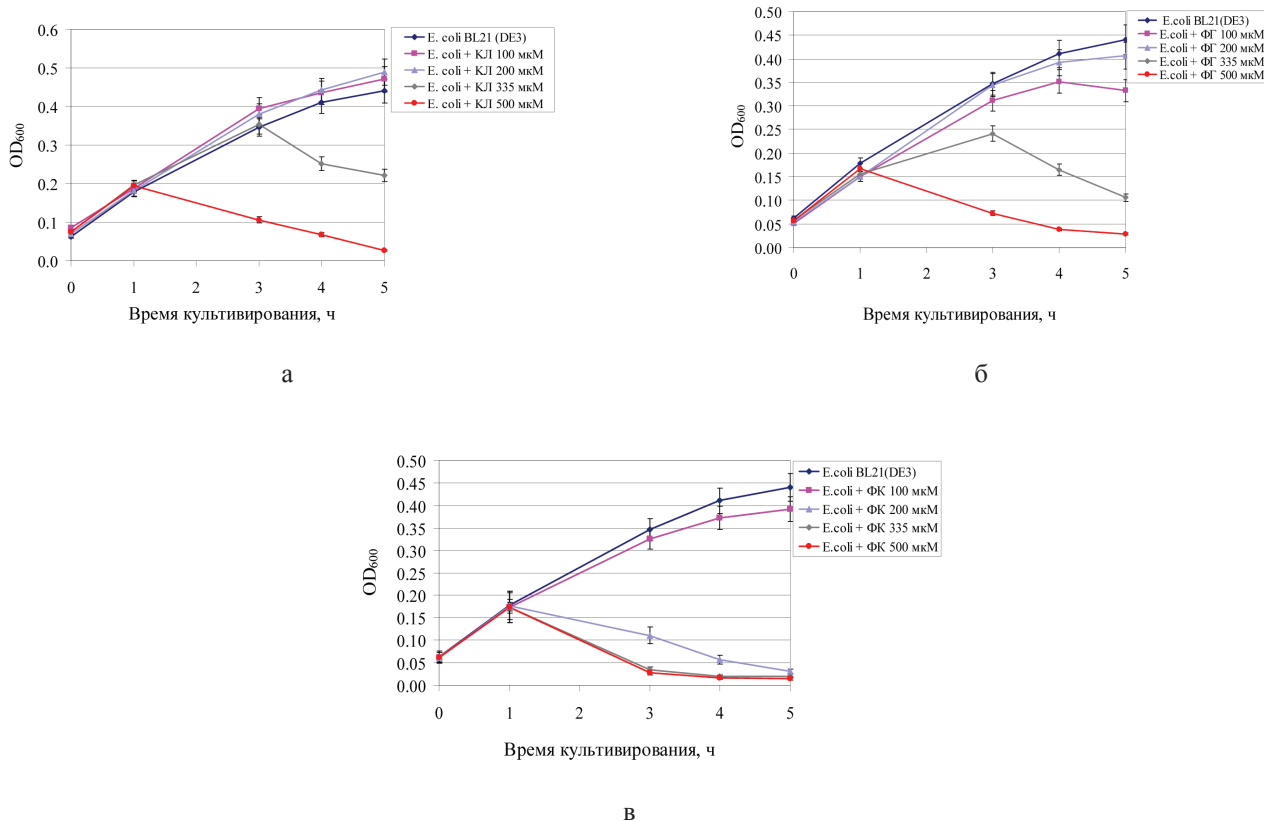


Рис. 3. Кривые роста *Escherichia coli* BL21(DE3) (исходно 3×10^8 КОЕ) в присутствии 100, 200, 335 и 500 мкМ КЛ (а), ФГ (б) и ФК (в) при 37°C в течение 5 ч. Результаты представлены в виде среднего значения трех независимых экспериментов \pm CO.

Контрольная культура *E. coli* (в отсутствие препаратов) росла довольно активно, а культивирование клеток с КЛ выявило дозозависимое действие липида: 100 и 200 мкМ КЛ не влиял на рост клеток, а КЛ в концентрации 335 и 500 мкМ ингибировал рост (рис. 3А). Обращает на себя внимание интересный характер кривых роста клеток *E. coli* в присутствии ингибирующих концентраций КЛ. При инкубации

с 335 мкМ КЛ рост клеток в течение первых 3 ч происходил с той же скоростью, что и контрольной культуры, однако к 4-ому часу клетки погибали. КЛ в концентрации 500 мкМ не влиял на рост клеток в течение первого часа, однако к 3-ему часу уже происходила гибель клеток, и к 5-ому часу культивирования их лизис, так как OD_{600} культуры снизилась до 0.027 ± 0.019 , тогда как в начале эксперимента (в 0 ч)

OD_{600} была равна 0.075 ± 0.004 . Вероятно, что к концу эксперимента клетки погибли и лизировались. В пользу этого утверждения свидетельствует снижение КОЕ через 5 ч культивирования клеток с липидами в 10^3 - 10^5 раз по сравнению с исходным количеством клеток (рис. 4).

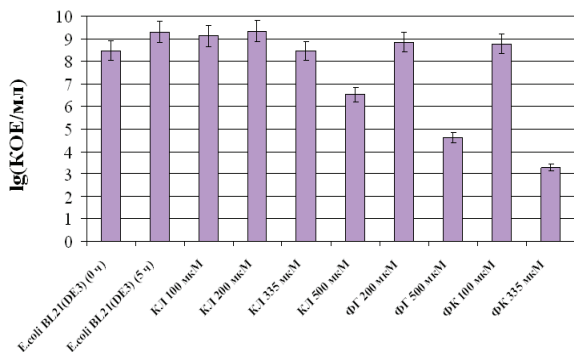


Рис. 4. Изменение количества КОЕ/мл *E. coli*, подсчитанного после посева клеток на 1.5% агар LB, через 5 ч культивирования бактерий с ФЛ при 37°C и перемешивании 200 об/мин. Результаты представлены в виде среднего значения трех независимых экспериментов \pm СО.

Тот факт, что с летальными дозами липида клетки нормально росли в течение первых нескольких часов, по-видимому, можно объяснить, во-первых, большой концентрацией исходно взятых клеток (10^8 КОЕ), тогда как, если взять 10^5 КОЕ, рост клеток в присутствии токсичных концентраций липида не наблюдается на протяжении всего времени эксперимента (данные не приведены), во-вторых, вероятно, клетки на начальном этапе эксперимента пытаются адаптироваться к стрессовым условиям (к экзогенному КЛ).

Действие других отрицательно заряженных липидов, ФГ и ФК, на рост *E. coli*, как нами установлено, носит также дозозависимый характер (рис. 3б, в). Так, ФГ в концентрациях 100 и 200 мкМ не оказывал существенного влияния на рост клеток, а в концентрациях 335 и 500 мкМ ингибировал рост клеток (рис. 3б). При этом форма кривых роста *E. coli* в присутствии ФГ напоминала ту форму, которая наблюдалась при культивировании клеток с КЛ: к 5-ому часу происходила гибель клеток, что выражалось в снижении OD_{600} и КОЕ (рис. 4). При этом 500 мкМ ФГ вызывал лизис даже тех клеток, которые были взяты исходно для эксперимента, поскольку OD_{600} в 0 ч была равна 0.057 ± 0.005 , а к 5-ому часу снизилась до 0.029 ± 0.004 .

ФК, в отличие от ФГ, подавляла размножение *E. coli* уже в концентрации 200 мкМ, то есть оказалась более эффективным антибактериальным агентом (рис. 3в). При этом в течение первого часа рост кле-

ток в присутствии ФК по-прежнему не отличался от роста контрольной культуры клеток, а к 5-ому часу происходил полный лизис клеток.

Итак, мы показали, что исследуемые нами анионные ФЛ – КЛ, ФГ и ФК – обладают антибактериальной активностью в отношении как грамположительных *M. tuberculosis*, так и грамотрицательных *E. coli*.

Следующим этапом нашей работы было установление механизма бактерицидного действия анионных фосфолипидов на *E. coli*. Для этого изучали действие ФЛ на ДНК бактерии: ДНК-репарационный SOS-ответ клетки – процесс, включающийся у бактерий, в ответ на повреждения ДНК, произошедшие в клеточном цикле [21].

Индукция ДНК-репарационного SOS-ответа в клетках *E. coli* под действием ФЛ.

Влияние анионных ФЛ на целостность ДНК определяли с помощью тест-системы, в основе которой лежит регистрация уровня экспрессии репортерного гена β -галактозидазы (*LacZ*). Следствием повреждения ДНК в клетках является индукция ДНК-репарационного SOS-ответа с последующей транскрипцией генов, в норме репрессированных регулятором транскрипции LexA. В работе был использован штамм *E. coli* CSH50 *sfiA::lacZ*, содержащий репортерный ген *lacZ* под контролем LexA-зависимого промотора *sfiA*, в геноме которого имеется делеция хромосомного *lac*-оперона [18]. В качестве положительных контролей использовали ципрофлоксацин (CFX) и микроцин В (McB), которые ингибируют рост клеток за счет блокирования ДНК-гиразы и индуцируют SOS-ответ, в качестве отрицательного контроля – микроцин С (McC), ингибирующий рост клеток за счет инактивации аминоксил-тРНК-синтетаз, но не индуцирующий SOS-ответ. Индукцию SOS-ответа устанавливали по появлению ободков ярко-красного цвета вокруг зон ингибирования роста клеток [18].

КЛ, ФК, ФГ по-разному подавляли рост клеток (рис. 5) и индуцировали ДНК-репарационный SOS-ответ, о чем свидетельствовало наличие зон ингибирования роста клеток разного диаметра и ярко-красного ореола вокруг этих зон. Наиболее эффективным антибактериальным агентом был ФГ, судя по большему диаметру зоны ингибирования роста клеток. При этом самым эффективным антибиотиком, индуцировавшим SOS-ответ, был контрольный препарат CFX.

Влияние анионных ФЛ на активность топоизомеразы I и ДНК-гиразы из *E. coli* in vitro. Причиной индукции ДНК-репарационного SOS-ответа в клетках является накопление двухцепочечных разрывов ДНК, которые могут образовываться за счет, например, ингибирования ДНК-топоизомераз – ферментов репликативного аппарата, отвечающих

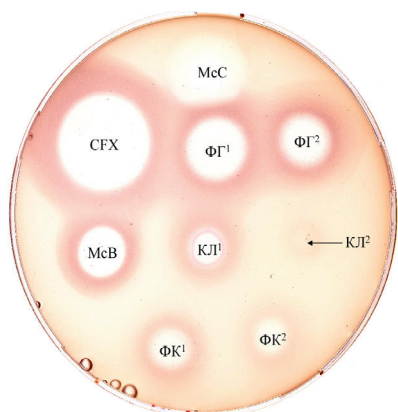


Рис. 5. Влияние ФЛ на индукцию

ДНК-репарационного SOS-ответа в клетках *E. coli*.

Фотография чашки Петри с нанесенным на нее газонем клеток штамма-репортера *E. coli* CSH50 *sfiA::lacZ*. ФГ¹ – 1.5 мМ, ФГ² – 1 мМ, КЛ¹ – 1.5 мМ, КЛ² – 1 мМ, ФК¹ – 1.5 мМ, ФК² – 1 мМ.

Положительные контроли: CFX – ципрофлоксацин (12 мкМ), McB – микроцин В (30 мкМ); отрицательный контроль: McC – микроцин С (20 мкМ).

за сверхспирализацию ДНК и вносящих в нее временные разрывы [22]; или взаимодействия ДНК с активными формами кислорода, в частности, очень токсичным гидроксил-радикалом [23]. Так, фторхинолоны ингибируют ДНК-гиразу (топоизомераза II типа – АТФ-зависимая и катализирует расщепление двух цепей ДНК), стабилизируя переходные комплексы с расщепленной этим ферментом ДНК. Вследствие этого ДНК-гираза блокируется и не можетшить временно расщепленную ДНК, что, в конечном счете, приводит к накоплению двухцепочечных разрывов. Аналогично действие камптотецина на топоизомеразу I (не зависит от АТФ, вносит разрыв в одну цепь ДНК). В данном случае накопление одноцепочечных разрывов является предпосылкой для возникновения двухцепочечных разрывов ДНК, которые и индуцируют ДНК-репарационный SOS-ответ. Кроме того, из литературы известно, что КЛ ингибирует ДНК-топоизомеразу I *E. coli in vitro* [16]. Мы ранее показали, что ингибирующее действие КЛ распространяется и на активность ДНК-гиразы [24]. Таким образом, бактерицидное действие анионных ФЛ в отношении *E. coli* может быть следствием ингибирования липидами ДНК-топоизомераз за счет стабилизации переходных комплексов фермента с временно расщепленной им ДНК, как это происходит в случае фторхинолонов. Для доказательства или опровержения этого предположения нами было изучено влияние ФК и ФГ на реакцию релаксации ДНК, катализируемую ДНК-топоизомеразой I (рис. 6), а также сверхспирализацию ДНК, катализируемую ДНК-гиразой в присутствии АТФ (рис. 7). Вывод об ингибировании липидами активности фермента делали после проведения электрофореза продуктов ре-

акции в 0.9% агарозном геле на основании наличия на электрофореграмме полосы, соответствующей исходной форме ДНК, или полос, соответствующих топоизомерам ДНК, близким по расположению к исходной форме ДНК. В качестве положительного контроля в реакциях с ДНК-гиразой использовали антибиотик CFX. ФГ и ФК не влияли на активность обоих ферментов даже в своих максимальных концентрациях 335 и 500 мкМ (рис. 6 и 7).

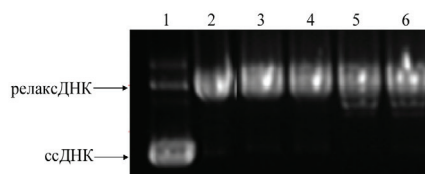


Рис. 6. Влияние анионных ФЛ на активность ДНК-топоизомеразы I (топо I) из *E. coli in vitro*.

Дорожка № 1 – суперскрученная плазмидная ДНК рUC19 (ссДНК), № 2 – ссДНК + топо I, № 3 – ссДНК + топо I в присутствии ФК 335 мкМ, № 4 – ФК 500 мкМ, № 5 – ФГ 335 мкМ, № 6 – ФГ 500 мкМ

(Здесь и далее: релаксДНК – релаксированная форма ДНК, ссДНК – суперскрученная форма ДНК).

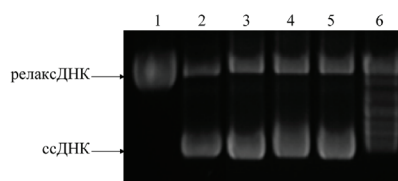


Рис. 7. Влияние анионных ФЛ на активность ДНК-гиразы из *E. coli* в присутствии АТФ *in vitro*.

Дорожка № 1 – релаксированная плазмидная ДНК рUC19 (релаксДНК), № 2 – релаксДНК + гиразы, № 3 – релаксДНК + гиразы в присутствии ФК 500 мкМ, № 4 – ФГ 335 мкМ, № 5 – ФГ 500 мкМ, № 6 – CFX 4 мкМ (положительный контроль).

В то же время КЛ, как мы показали ранее, ингибирует активности обеих ДНК-топоизомераз [24]. Для того чтобы проверить, является ли этот факт причиной повреждения ДНК, мы исследовали способность КЛ стабилизировать переходный комплекс фермент – расщепленная ДНК, что сопровождается накоплением ДНК с одно- и двухцепочечными разрывами.

Исследование накопления открытой кольцевой, а также линейной ДНК под действием КЛ. Было изучено накопление открытой кольцевой ДНК (с одноцепочечным разрывом) в реакции с топоизомеразой I и линейной ДНК (с двухцепочечным разрывом) в реакции с ДНК-гиразой в присутствии анионных ФЛ. В качестве положительного контроля

в реакциях с гиразой использовали CFX, который вызывает накопление линейной ДНК вследствие стабилизации переходного комплекса с ДНК-гиразой.

Продукты реакций анализировали после проведения электрофореза в 0.9% агарозном геле, содержащем 0.5 мкг/мл бромистого этидия. Последний интеркалирует в ДНК, в результате чего релаксированная форма ДНК, содержащая этидий бромид, приобретает положительную сверхспирализацию, и на электрофореграмме ее положение сливается с

положением отрицательно суперскрученной ДНК. Открытая кольцевая и линейная формы ДНК, связавшись с бромистым этидием, не могут приобретать положительную сверхспирализацию, поэтому их положение в геле четко различимо. При этом полоса, соответствующая линейной ДНК, располагается ниже той, которая соответствует открытой кольцевой ДНК, но обе находятся значительно выше полос, соответствующих суперскрученной и релаксированной формам ДНК (рис. 8).



Рис. 8. Исследование накопления ДНК с одно- и двухцепочечными разрывами при действии анионных ФЛ на ДНК-топоизомеразу I (А) и ДНК-гиразу (Б).

А. Дорожка № 1 – ссДНК (pUC19), № 2 – ссДНК + топо I, дорожки № 3, 4, 5 – ссДНК + топо I в присутствии 500 мкМ и 1 мМ КЛ, 1 мМ ФХ (отрицательный контроль) соответственно.
Б. Дорожка № 1 – релаксДНК (pUC19), № 2 – релаксДНК + гираза, дорожки № 3 и 4 – релаксДНК + гираза в присутствии 500 мкМ КЛ и 10 мкМ CFX (положительный контроль) соответственно.

Электрофорез проводили в течение 2 ч в 0.9% агарозном геле, содержащем 0.5 мкг/мл бромистого этидия.

(окДНК – открытая кольцевая ДНК (с одноцепочечным разрывом),

линДНК – линейная ДНК (с двухцепочечным разрывом)).

Во всех реакциях, катализируемых как топоизомеразой I, так и ДНК-гиразой, действие КЛ приводило к образованию соответственно открытой кольцевой и линейной ДНК в количестве, сопоставимом с базовым уровнем, наблюдавшемся в реакции в отсутствие препаратов (рис. 8). А CFX в реакциях с участием ДНК-гиразы исходную ДНК полностью превращал в линейную форму, то есть стабилизировал комплекс гиразы с расщепленной ДНК.

Таким образом, наличие КЛ в реакционной смеси как с топоизомеразой I, так и с гиразой не приводило к явному накоплению открытой кольцевой и линейной ДНК соответственно. Это свидетельствовало о том, что КЛ не стабилизировал комплекс фермент – расщепленная ДНК, и механизм бактерицидного действия КЛ отличается от механизма действия фторхинолонов (на ДНК-гиразу) или камптотетина (на топоизомеразу I).

Итак, мы показали, что ФГ и ФК не влияют на активность ДНК-топоиomerаз, тогда как КЛ, хотя и ингибирует оба фермента [24], не вызывает накопление одно- и двухцепочечных разрывов ДНК. Такое различие в ингибирующей активности ФЛ можно объяснить, по-видимому, их разной структурой. Так, КЛ, в отличие от ФК и ФГ, содержит две фосфатные группы и четыре остатка линолевой кислоты. Исходя из литературных данных [16] и наших эксперимен-

тальных результатов, наиболее вероятно, что КЛ взаимодействует с самим ферментом. Благодаря своей структуре, имеющей распределенный отрицательный заряд [25], кардиолипин, возможно, конкурирует с ДНК за места связывания с ДНК-топоизомеразой, активный центр которых богат положительно заряженными аминокислотными остатками, обеспечивающими фиксацию субстрата (ДНК или КЛ) за счет электростатического взаимодействия [26].

Заключение

В данной работе было изучено влияние анионных фосфолипидов ФГ и ФК на рост грамположительных патогенных бактерий *M. tuberculosis*, являющихся возбудителем туберкулеза, а также КЛ, ФК и ФГ на рост грамотрицательных бактерий *E. coli*. Установлено, что перечисленные выше отрицательно заряженные ФЛ обладают антибактериальным действием в отношении обоих микроорганизмов. В случае с *E. coli* такая активность КЛ, ФГ и ФК обусловлена повреждением ДНК клеток (появление разрывов), точная причина которого пока не установлена. Одной из причин повреждения ДНК могло быть ингибирование липидами ферментов репликативного аппарата ДНК-топоиomerаз путем стабилизации переходных комплексов фермента с расщепленной

ДНК, как это наблюдается в случае с фторхинолонами. Однако проведенные нами исследования показали, что ФК и ФГ не влияли на активность топоизомераз, а КЛ, ингибирующий оба фермента, не стабилизировал переходные комплексы. Следовательно, механизм бактерицидного действия анионных ФЛ отличается от механизма действия фторхинолонов. Очевидно также и то, что ДНК не является первичной мишенью ФК, ФГ и КЛ, поскольку, обладая отрицательно заряженными фосфатными группами, ФЛ и ДНК вряд ли взаимодействуют между собой. Другой предположительной причиной повреждения ДНК под действием анионных ФЛ является действие активных форм кислорода, именно её исследованию будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Проявление бактерицидной активности липосомальных форм данных анионных липидов, добавленных экзогенно к культурам разных бактерий (микобактерии туберкулеза и кишечной палочке),

открывает реальные возможности создания на их основе новых, эффективных и менее токсичных антибактериальных препаратов особенно для лечения туберкулеза. Важно отметить, что липосомальные препараты возможно вводить ингаляционно, таким образом ускоряя процесс попадания препарата в очаг развития патологии – инфицированный *M. tuberculosis* альвеолярный макрофаг.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института биологии гена РАН: д.б.н. К.В. Северинову и к.б.н. Д.А. Гилярову – за предоставленные штаммы *E. coli*, а также сотрудникам ЦНИИ туберкулеза РАМН: д.б.н. Л.Н. Черноусовой, к.м.н. Т.Г. Смирновой и к.м.н. С.Н. Андреевской – за помощь в проведении экспериментов с *Mycobacterium tuberculosis*.

Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ (регистрационный номер НШ-7946.2016.11)

Список литературы:

1. Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Жогина Ю.А., Смирнова Д.И., Микулович Ю.Л., Сорокоумова Г.М., Черноусова Л.Н., Селищева А.А., Швеиц В.И. // Докл. АН. 2010. Т. 434. С. 705–708.
2. Смирнова Т.Г., Микулович Ю.Л., Андреевская С.Н., Сорокоумова Г.М., Черноусова Л.Н., Селищева А.А., Швеиц В.И. // Биофарм. журн. 2011. Т. 3. № 2. С. 19–27.
3. Silhavy T.J., Kahne D., Walker S. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010. V. 2. № 5. P. a000414.
4. Guenin-Macé L., Siméone R., Demangel C. // Transboundary and Emerging Diseases. 2009. V. 56. № 6-7. P. 255–268.
5. Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N. // Bioch. Biophys. Acta. 2009. V. 1788. № 10. P. 2069–2079.
6. Sekimizu K.J. // Chem. and Phys. of Lipids. 1994. V. 73. № 1-2. P. 223–230.
7. Mileykovskaya E., Fishov I., Fu X., Corbin B.D., Margolin W. Dowhan W. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 22193–22198.
8. Arias-Cartin R., Grimaldi S., Pommier J., Lanciano P., Schaefer C., Arnoux P., Giordano G., Guigliarelli B., Magalon A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 7781–7786.
9. Gold V.A.M., Robson A., Bao H., Romantsov T., Duong F., Collinson I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 10044–10049.
10. Charalambous K., Miller D., Curnow P., Booth P.J. // BMC Biochem. 2008. V. 25. P. 9–31.
11. Haines T.H., Dencher N.A. // FEBS Letters. 2002. V. 528. № 1. P. 35–39.
12. Alvis S.J., Williamson I.M., East J.M., Lee A.G. // Biophys. J. 2003. V. 85. P. 3828–3838.
13. Kawai F., Hara H., Takamatsu H., Watabe K.,

References:

1. Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Zhogina Ya.A., Smirnova D.I., Mikulovich Ya.L., Sorokooumova G.M., Chernousova L.N., Selishcheva A.A., Shvets V.I. // Dokl. Akad. Nauk. 2010. V. 434. P. 705–708.
2. Smirnova T.G., Mikulovich Ya.L., Andreevskaya S.N., Sorokooumova G.M., Chernousova L.N., Selishcheva A.A., Shvets V.I. // Russian Journal of Biopharmaceuticals. 2011. V. 3. № 2. P. 19–27.
3. Silhavy T.J., Kahne D., Walker S. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010. V. 2. № 5. P. a000414.
4. Guenin-Macé L., Siméone R., Demangel C. // Transboundary and Emerging Diseases. 2009. V. 56. № 6-7. P. 255–268.
5. Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N. // Bioch. Biophys. Acta. 2009. V. 1788. № 10. P. 2069–2079.
6. Sekimizu K. J. // Chem. and Phys. of Lipids. 1994. V. 73. № 1-2. P. 223-230.
7. Mileykovskaya E., Fishov I., Fu X., Corbin B.D., Margolin W. and Dowhan W. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 22193–22198.
8. Arias-Cartin R., Grimaldi S., Pommier J., Lanciano P., Schaefer C., Arnoux P., Giordano G., Guigliarelli B., Magalon A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 7781–7786.
9. Gold V.A.M., Robson A., Bao H., Romantsov T., Duong F., Collinson I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 10044–10049.
10. Charalambous K., Miller D., Curnow P., Booth P.J. // BMC Biochem. 2008. V. 25. P. 9-31.
11. Haines T.H., Dencher N.A. // FEBS Letters. 2002. V. 528 № 1. P. 35–39.
12. Alvis S.J., Williamson I.M., East J.M., Lee A.G. // Biophys. J. 2003. V. 85. P. 3828–3838.
13. Kawai F., Hara H., Takamatsu H., Watabe K.,

- Matsumoto K. // *Genes Genet. Syst.* 2006. V. 81. № 2. P. 69–76.
14. Minami N., Yasuda T., Ishii Y., Fujimori K., Amano F. // *J. Biochem.* 2011. V. 149. № 5. P. 519–527.
15. Wang X., Devaiah S.P., Zhang W., Welti R. // *Prog. Lipid Res.* 2006. V. 45. № 3. P. 250–278.
16. Mizushima T., Natori S., Sekimizu K. // *Biochem. J.* 1992. V. 285. P. 503–506.
17. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В., Молотковский Ю.Г., Батраков С.Г., Барсуков Л.И., Проказова Н.В. *Препаративная биохимия липидов*. М.: Наука, 1981. 256 с.
18. Ghilarov D., Serebryakova M., Shkundina I., Severinov K. J. // *Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 26308–26318.
19. Garg S.K. Valente E., Greco E., Santucci M.B., De Spirito M., Papi M., Bocchino M., Saltini C., Fraziano M. // *Clin. Immunol.* 2006. V. 121. № 1. P. 23–28.
20. Сорокоумова Г.М., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Петрова Е.Е., Жогина Ю.А., Калашникова Т.Ю., Черноусова Л.Н., Селищева А.А., Швец В.И. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2009. Т. 147. С. 550–553.
21. Ушаков В.Ю. // *Вестник Пермского университета*. 2010. № 2. С. 19–30.
22. Chen C.R., Malik M., Snyder M., Drlica K. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 258. № 4. P. 627–637.
23. Wiseman H., Halliwell B. // *Biochem. J.* 1996. V. 313. P. 17–29.
24. Микулович Ю.Л., Сорокоумова Г.М., Селищева А.А., Швец В.И. // *Вестник МИТХТ*. 2012. Т. 7. № 4. С. 58–63.
25. Schlame M. // *J. Lipid Res.* 2008. V. 49. P. 1607–1620.
26. Бугреев Д.В., Невинский Г.А. // *Успехи биол. химии*. 2009. Т. 49. С. 129–158.
- Matsumoto K. // *Genes Genet. Syst.* 2006. V. 81. № 2. P. 69–76.
14. Minami N., Yasuda T., Ishii Y., Fujimori K., Amano F. // *J. Biochem.* 2011. V. 149. № 5. P. 519–527.
15. Wang X., Devaiah S.P., Zhang W., Welti R. // *Prog. Lipid Res.* 2006. V. 45. № 3. P. 250–278.
16. Mizushima T., Natori S., Sekimizu K. // *Biochem. J.* 1992. V. 285. P. 503–506.
17. Bergelson L.D., Daytlovitskaya E.V., Molotkovskiy Ya. G., Batrakov S.G., Barsukov L.I., Prokazova N.V. *Preparative biochemistry of lipids (Preparative biochemistry of lipids)* М.: Nauka, 1981. 256 p.
18. Ghilarov D., Serebryakova M., Shkundina I., Severinov K. J. // *Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 26308–26318.
19. Garg S.K. Valente E., Greco E., Santucci M.B., De Spirito M., Papi M., Bocchino M., Saltini C., Fraziano M. // *Clin. Immunol.* 2006. V. 121. № 1. P. 23–28.
20. Sorokoumova G.M., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Petrova E.E., Zhogina Yu.A., Kalashnikova T.Yu., Chernousova L.N., Selishcheva A.A., Shvets V.I. // *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2009. V. 11, P. 550–553.
21. Ushakov V.Ya. // *Vestnik of Perm University* 2010. № 2. P. 19–30.
22. Chen C.R., Malik M., Snyder M., Drlica K. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 258. № 4. P. 627–637.
23. Wiseman H., Halliwell B. // *Biochem. J.* 1996. V. 313. P. 17–29.
24. Mikulovich Ya.L., Sorokooumova G.M., Selishcheva A.A., Shvets V.I. // *Vestnik MITHT (Fine chem. Tech.)*. 2012. V. 7. №4. P. 58–63.
25. Schlame M. // *J. Lipid Res.* 2008. V. 49. P. 1607–1620.
26. Bugreev D.V., Nevinskiy G.A. // *Special issue. Biological chemistry reviews*. 2009. V. 49. P. 129–158.