



УДК 577.151.03: 578.81: 579.234: 579.862.1

ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ: СТАБИЛЬНОСТЬ И СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТА, ЛИЗИРУЮЩЕГО КЛЕТКИ

Streptococcus pyogenes

© 2008 г. Н. Л. Клячко^{**}, Н. Ф. Дмитриева^{**}, А. С. Ещина^{*}, О. В. Игнатенко^{*}, Л. Ю. Филатова^{*}, Е. И. Райнина^{*,***}, А. К. Казаров^{*}, А. В. Левашов^{*}

^{*}Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы горы;

^{**}Факультет профилактической медицины, Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва;

^{***}Национальная Северо-Западная Тихоокеанская лаборатория, Ричланд, шт. Вашингтон, США

Поступила в редакцию 17.09.2007 г. Принята к печати 09.10.2007 г.

Изучено влияние различных соединений на активность и стабильность фаг-ассоциированного фермента, лизирующего клетки стрептококков групп А и С (PlyC). Обнаружено существенное подавление активности фермента при повышении ионной силы (в присутствии NaCl), а также при добавлении углеводов (моно-, ди- и полисахаридов), то есть агентов, являющихся стабилизирующими для многих ферментов. Установлено, что активность фермента существенно снижалась в присутствии положительно заряженных полиэлектролитов и поверхностно-активных веществ (ПАВ), но инкубация с мицеллообразующими веществами и отрицательно заряженными полиэлектролитами приводила к активации и стабилизации PlyC. Показано, что в мицеллярно-полиэлектролитной композиции M16 фермент сохранял активность в течение 2 месяцев, в то время как в буферном растворе в тех же условиях (рН 6.3, комнатная температура) практически полностью терял свою активность в течение 2 сут. Найдены характеристики температурной инактивации фермента, в частности, время его полуинактивации при различных температурах, позволяющие оценить его поведение при любой температуре и дать практические рекомендации для условий его хранения и использования.

Ключевые слова: ферменты бактериофагов; бактериальные инфекции; стрептококковые инфекции; фаг-ассоциированный фермент, лизирующий клетки стрептококков; стабильность и стабилизация.

ВВЕДЕНИЕ

Патогенные бактерии, являющиеся источниками инфекций различных типов, могут вызывать серьезные заболевания. Так, например, патогенные стрептококки являются источником большинства широко распространенных инфекций бактериальной природы [1–4]. Среди них стрептококки группы А (*Streptococcus pyogenes*) могут поражать верхние дыхательные пути (тонзиллит, фарингит, скарлатина и др.), кожные покровы (импетиго) и другие органы [1–4]. В качестве альтернативы антибиотикам при лечении этих заболеваний предлагаются различные лекарственные средства, такие, как, например, природные цитокины [5] или рекомбинантные полипептиды [6]. Несмотря на многолетние усилия,

эффективная вакцина против таких бактерий не найдена. Бактериофаги – вирусы бактерий, содержат литические ферменты, которые способны разрушать бактериальные клетки и могут рассматриваться в качестве серьезной альтернативы терапии антибиотиками [7–10]. При этом использование ферментов бактериофагов в качестве литических агентов представляется более удобным и предпочтительным по сравнению с применением живых фагов [11–13].

Изучаемый в данной работе фаг-ассоциированный фермент (PlyC) способен эффективно лизировать стрептококки групп А, С и Е [14]. Фермент относят по типу действия к амидазам, а именно к *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланин-амидазам; он катализирует гидролиз амидной связи между углеводной и пептидной составляющими пептидогликана клеточной стенки бактерий [15]. PlyC имеет перспективы для применения в составе средств гигиены полости рта, а также в качестве профилактических и лечебных препаратов, по-

Сокращения: PlyC – фаг-ассоциированный фермент, лизирующий клетки стрептококков групп А и С; СРС – цетилпиридиний хлористый; РАА – полиакриловая кислота.

[#]Автор для связи (тел.: (495) 939-3476; факс: (495) 939-5417; klyachko@enzyme.chem.msu.ru).

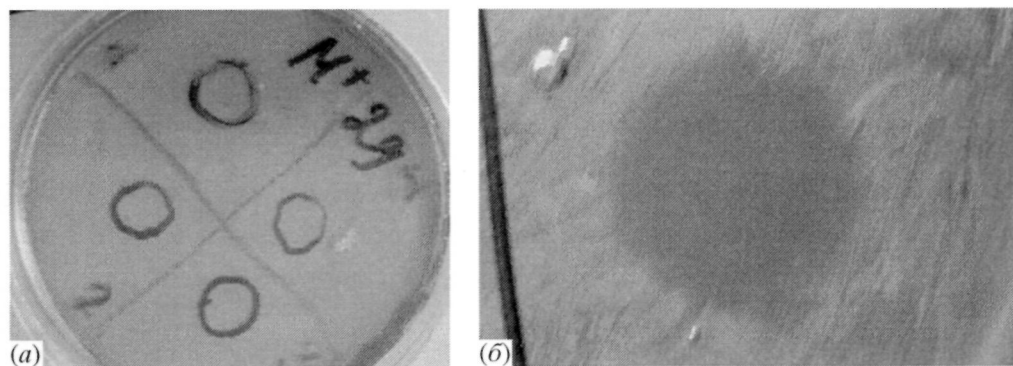


Рис. 1. Действие коммерческих препаратов средств гигиены полости рта (а) (1 – бальзам для полости рта “Весна+”, 2 – детское полоскание “TANA FTOR”, 3 – полоскание полости рта “Thera Breath”, 4 – полоскание полости рта “Biothere”) и PlyC-фермента (б) на лизис *S. pyogenes* группы А (клетки М29). Чашки с газоном культуры стрептококков после добавления проб выдерживали в течение 30 мин при 37°C, лизис фиксировали по зоне просветления (лизиса) на мутном фоне. Условия эксперимента: 20 мМ фосфатный буфер, рН 6,3, разведение фермента 1/120000.

давяющих стрептококковые инфекции. Основной проблемой, ограничивающей использование в медицине бактериолитических ферментов, в частности фермента, лизирующего клетки стрептококков, является их низкая стабильность при повышенных температурах (даже при комнатной температуре). Данная работа посвящена изучению действия на PlyC, специфичного к клеткам стрептококков, соединений различной природы, способных оказывать влияние на активность и стабильность фермента, и разработке подходов к его стабилизации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность PlyC в лизисе бактерий *S. pyogenes* изучали в сравнительном эксперименте с несколькими коммерческими средствами гигиены полости рта, для которых декларируется антибактериальный эффект. Для этого на чашки Петри с газоном 24-часовой культуры *S. pyogenes* наносили аликвоты растворов коммерческих средств гигиены полости рта (рис. 1а) и PlyC (рис. 1б). Как видно на рис. 1а, ни один из четырех использованных в опыте коммерческих препаратов не давал сколько-нибудь заметной зоны лизиса стрептококков. Аналогичное явление наблюдали при добавлении буферного раствора, использованного в качестве контроля. В то же время, как видно на рис. 1б, при действии PlyC обнаруживается заметная зона просветления (лизиса). Эти данные позволяют заключить, что только фермент эффективно лизировал клетки стрептококков.

Как следует из эксперимента, представленного на рис. 1, PlyC может представлять весьма эффективное средство борьбы с инфекциями, вызываемыми стрептококком группы А (*S. pyogenes*). Однако практическое использование фермента тормозится вследствие его быстрой инактивации

даже при комнатной температуре. Следующие разделы работы посвящены изучению действия на фермент повышенной температуры, различных соединений и разработке подходов к его стабилизации.

Температурная инактивация PlyC

Для ускорения процедуры инактивации и удобства слежения за изменением активности фермента была выбрана температура инкубации 45°C, при которой процесс инактивации протекал за короткое время, но достаточное, чтобы отобрать пробы. Как видно из рис. 2, фермент практически

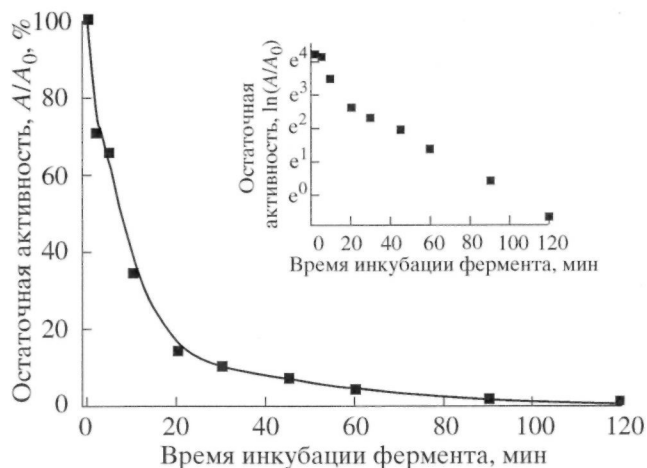


Рис. 2. Зависимость остаточной активности PlyC от времени инкубации фермента при 45°C. На вставке та же зависимость представлена в полулогарифмических координатах. Условия эксперимента: 20 мМ фосфатный буфер, рН 6,3, разведение фермента 1/40000, активность фермента после инкубации определяли при 25°C.

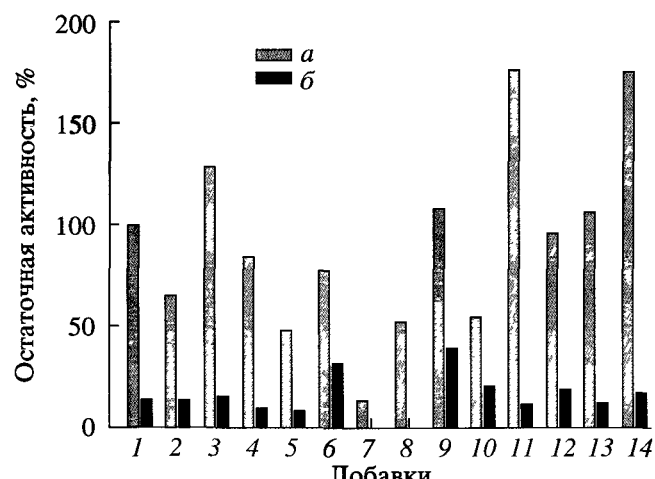


Рис. 3. Влияние различных соединений на активность PLYC без прединкубации (а) и после 1 ч инкубации при 45°C (б). Условия эксперимента: 20 мМ фосфатный буфер, рН 6.3, остаточная активность фермента после инкубации измерена при 25°C, разведение фермента 1/40000. В качестве соединений были использованы 1%-ные растворы, если не оговорено особо (в скобках): 1 – контроль (буфер), 2 – NaCl, 3 – глицерин (10%), 4 – лактоза (10%), 5 – сорбит, 6 – хитозан (0.2%), 7 – СРС, 8 – полилизин, 9 – РАА, 10 – Бридж-35, 11 – Бридж-30, 12 – Твин-20, 13 – плуроник P85, 14 – плуроник F127.

полностью терял свою литическую активность при инкубации в течение 2 ч. Следует отметить, что процесс инактивации фермента подчиняется кинетике 1-го порядка, о чем свидетельствует полученная прямолинейная зависимость при представлении исходной в полулогарифмических координатах (см. вставку на рис. 2).

Влияние соединений различной природы на активность и стабильность PLYC

Для экспериментов по сравнительному изучению влияния различных соединений на активность и стабильность фермента определяли остаточную активность сразу после внесения препарата фермента, содержащего испытуемое вещество (рис. 3а) и через 1 ч инкубации тех же препаратов при 45°C (рис. 3б). Выбор времени продиктован тем, что через 1 ч инкубации фермента его активность еще может быть зафиксирована, и относительно этой малой величины удобно следить за изменениями.

Как видно на рис. 3, PLYC характеризуется некоторыми особенностями. Так, добавление солевого раствора, приводящего для многих ферментов к их стабилизации (прием, описанный во многих классических обзорах, см., например, [16, 17]), не оказывало стабилизирующего действия на PLYC, а, более того, приводило к снижению его активности, как это видно при сравнении столбиков

(1а) и (2а). В отличие от стабилизирующего действия сахаров на многие другие ферменты [16, 17], углеводы и полиолы инактивировали PLYC (рис. 3, 4–6). На рис. 3 представлены данные для лактозы (4), сорбита (5), хитозана (6), также действовали глюкоза, сахароза, целлобиоза (данные не приведены). Как видно, только глицерин (3) оказывал и активирующее, и небольшое стабилизирующее действие на PLYC. Следует отметить, что хотя в присутствии хитозана наблюдалась стабилизация фермента (столбик 6б), но при этом уровень исходной активности снижался существенно (столбик а). Вероятно, это связано с тем, что, с одной стороны, хитозан, имея низкую растворимость в воде, при значениях рН выше 4 начинает выпадать в осадок, а с другой – с тем, что оптимальная активность PLYC наблюдается в области рН 6.3 и существенно падает при понижении рН [15, 18].

В данной работе был также использован известный для других ферментов прием защиты фермента от инактивации с помощью полимеров и поверхностно-активных веществ различной природы (см., например, [18–20]). Как видно на рис. 3, в присутствии положительно заряженных ПАВ и полиэлектролитов, хлорида цетилпиридия (СРС) (7) и полилизина (8) существенно снижались активность и стабильность фермента. Этот результат важно учитывать при адаптации фермента к функционированию в составе выпускаемых коммерческих средств защиты полости рта (полоскания), одним из компонентов которых часто используется СРС, который, как показано выше, отрицательно влияет на активность фермента. Отрицательно заряженный полиэлектролит, РАА (9), вызывал существенный стабилизирующий эффект в отношении PLYC. Возможно, это связано с тем, что определенная нами изоэлектрическая точка (рI) данного фермента находится в области рН 7.7–7.8 и, следовательно, при рН 6.3, при котором измерялась активность, поверхность белка имеет некоторый избыточный положительный заряд и отрицательно заряженная РАА “обволакивает” молекулу белка, защищая ее от разворачивания. Следует отметить, что, в соответствии с представленными на рис. 2 данными о прямолинейной зависимости в полулогарифмических координатах остаточной активности фермента от температуры, именно разворачивание белка может являться основной причиной инактивации.

Из использованных неионогенных ПАВ (10–14) наиболее сильное активирующее действие оказывали Бридж-30 (11) и плуроник F127 (14), а стабилизирующее – Бридж-35 (10), Твин-20 (12) и F127 (14). Вероятно, объяснение данным эффектам может быть получено из сопоставления значений гидрофильно-липофильного баланса и/или размера и природы гидрофобной части молекулы

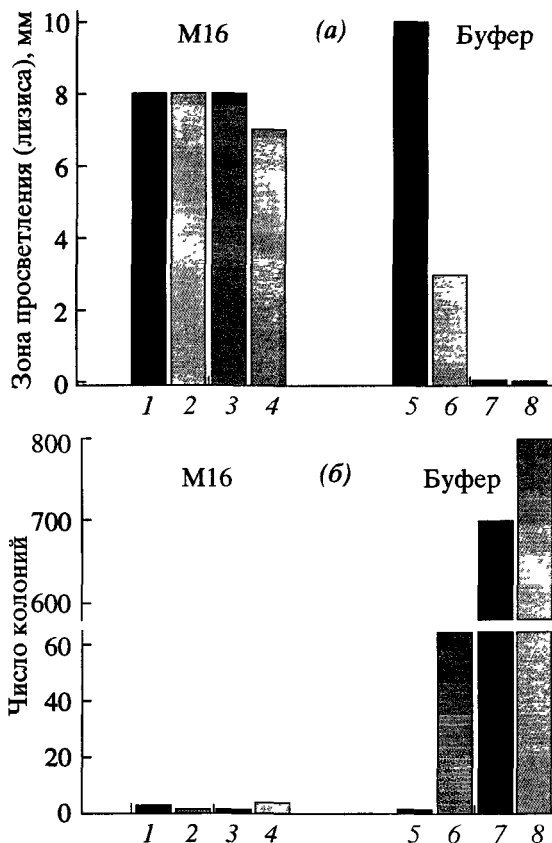


Рис. 4. Влияние PlyC-фермента в композиции M16 на культуру стрептококков группы А (M29) (а) и количество колоний в культуре, отобранной из зоны лизиса (б). Измеряли зону просветления на газоне культуры (мм), образующуюся через 30 мин после добавления фермента (а) и количество колоний в пробе, отобранной из зоны лизиса, пересеянной и инкубированной при 37°C в течение 24 ч (б). Фермент с M16 свежеприготовленный (1) и через 2 сут (2), 2 недели (3) и 2 мес (4) инкубации при комнатной температуре. 5–8 – контроли: фермент в буферном растворе свежеприготовленный (5) и через 2 сут (6), 2 недели (7) и 2 мес (8) инкубации. Условия эксперимента: 20 мМ фосфатный буфер, рН 6.3, разведение фермента 1/120000.

ПАВ, хотя данных для строгих заключений явно недостаточно. Кроме того, дополнительная стабилизация, возможно, обусловлена “обворачиванием” молекулы фермента полимерными цепями.

Стабильность PlyC при длительном выдерживании при комнатной температуре оценивалась для препаратов фермента в композиции M16 (состав является “know-how” авторов и составляет предмет патентования) и буферном растворе по эффективности действия препарата на культуру стрептококков. Фермент инкубировали в мицеллярно-полиэлектrolитной системе M16 и через определенные промежутки времени наносили на газон растущей культуры бактерий. Лизис клеток фиксировали по величине зоны просветления на

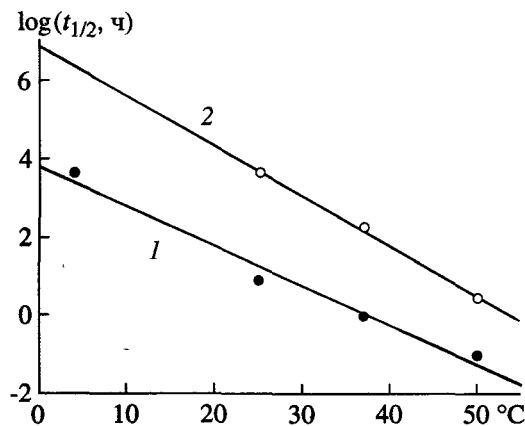


Рис. 5. Зависимость логарифма времени полуинактивации PlyC от температуры его инкубации в буферном растворе (1) и мицеллярно-полимерной композиции L2 (2). Условия эксперимента: 20 мМ фосфатный буфер, рН 6.3, разведение фермента 1/40000, активность фермента после инкубации определяли при 25°C.

газоне (зоны лизиса) через 30 мин (рис. 4а). Кроме того, из зоны лизиса отбирали пробу, которую пересевали и через 24 ч проводили подсчет количества новых выросших бактерий (рис. 4б). Такой двойной контролём давал возможность определить полноту уничтожения клеток в зоне лизиса, что важно для понимания эффективности работы фермента в качестве потенциального лечебного средства. Сравнительным контролём служил фермент, выдерживаемый в буферном растворе (рис. 4, 5–8). На рис. 4 представлены данные по изменению активности фермента через 2 сут, 2 нед и 2 мес. Как видно, активность фермента в буфере существенно падала уже через первые 2-е сут, а количество обнаруживаемых колоний, соответственно, росло. В отличие от контроля, фермент, инкубируемый в мицеллярно-полиэлектrolитной системе, продолжал эффективно лизировать бактериальные клетки даже через 2 мес. Следует отметить, что практическая неизменность зоны лизиса и отсутствие новых бактерий в пробе, взятой из зоны лизиса через 30 мин, свидетельствовали о том, что эффективность действия фермента не снижалась ни в процессе хранения, ни в процессе функционирования.

Зависимость времени полуинактивации PlyC от температуры изучалась в сравнительном эксперименте для фермента в буферном растворе и в мицеллярно-полиэлектrolитной композиции L2 (состав является “know-how” авторов и составляет предмет патентования) (рис. 5). Показано, что в диапазоне от 4 до 50°C температурные зависимости в обеих средах представляют собой прямые линии. Обращает на себя внимание высокое значение энергии активации (большой наклон прямой), – это означает, что температурный ре-

жим весьма существен для стабильности данного фермента. Сохранение вида зависимости для PlyC в композиции (при существенном увеличении времени полуинактивации фермента) позволяет оценить поведение фермента при любой температуре и, таким образом, дать рекомендации для условий его хранения и использования.

Таким образом, в работе изучены факторы, влияющие на стабильность PlyC-фермента, лизирующего клетки стрептококка группы А, подобраны мицеллярно-полиэлектrolитные композиции, защищающие фермент от инактивации при его инкубировании при комнатной температуре в течение нескольких месяцев.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. PlyC-фермент (Lot O (O81303H)) любезно предоставлен компанией New Horizons Diagnostics Co. (США) в рамках совместного проекта. Препараты хранили в 20 мМ фосфатном буфере, рН 7.0, при 4°C, концентрация белка составляла 12.76 мг/мл. В работе использован штамм бактерий *S. pyogenes* D-28/11 N62/59 (Пражская коллекция) (клетки M29).

Компоненты буферных растворов и мицеллярно-полиэлектrolитных композиций (Sigma, США) были реагентами марки "ос. ч."

Методы

Приготовление суспензии клеток *S. pyogenes*. Клетки M29 выращивали при 37°C с использованием Todd-Hewitt Broth (Difco, США) и хранили при -20°C. Перед использованием ампульную культуру адаптировали к жидкой среде. Для инокуляции (посева) использовали 1% ночной культуры. Клеточную культуру центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин, дважды промывали стерильным 20 мМ фосфатным буфером, рН 6.3, и использовали в качестве субстрата для измерения активности PlyC-фермента.

Турбидиметрический контроль активности PlyC осуществляли по изменению (уменьшению) мутности суспензии клеток по мере действия фермента. Измерения проводили на спектрофотометре (Shimadzu-1601PC, Япония) при 600 нм при 25°C. В качестве контроля использовали суспензию клеток в отсутствие фермента. В типичном эксперименте к 1 мл суспензии клеток с A_{600} , равном 0.3, добавляли 5–20 мкл фермента с разведением 10000–80000 и измеряли уменьшение поглощения при 600 нм в непрерывном режиме. Следует отметить, что суспензия клеток *S. pyogenes* была стабильной, ее мутность практически не менялась в контроле в течение всего времени эксперимента. Активность фермента выражали как изменение поглощения при 600 нм за 1 мин.

Микробиологический тест активности PlyC по зоне просветления (лизиса) на газоне клеток *S. pyogenes*. Растущую культуру клеток M29 готовили на поверхности агара следующим образом: 0.1 мл ночной бульонной культуры клеток M29 2-го пассажа, выращенной на кровяном агаре, помещали на чашку Петри с агаром, распределяли по его поверхности и оставляли при 37°C на 18–20 ч. Далее чашки с газоном культуры клеток использовали для определения литической активности PlyC в различных композициях. Для этого 5–10 мкл фермента с разведением 10000–300000 добавляли на газон, и зону просветления (лизиса) на мутном фоне фиксировали через 1, 5, 10 и 30 мин инкубации при 37°C. Через 30 мин из зоны лизиса отбирали пробу, переносили ее "через бульон" на кровяной агар и инкубировали 24 ч при 37°C, затем проводили подсчет выросших колоний.

Точность спектрофотометрических измерений составляла 95% (ошибка измерения – 5%), точность микробиологических тестов составляла 85% (ошибка – 15%). Все микробиологические эксперименты были сделаны в трех повторах.

Влияние различных соединений на активность и стабильность PlyC. К раствору фермента в концентрации 0.32 мкг/мл добавляли 1%-ный (если это не оговорено особо) раствор соединения и инкубировали при 45°C. Через 1 ч отбирали пробу и определяли активность фермента по изменению мутности клеток стрептококка при 25°C (стандартные условия). Остаточную активность определяли как отношение величины активности фермента после 1 ч инкубирования при 45°C к его исходной активности в присутствии "добавки".

Для определения времени полуинактивации PlyC при различных температурах фермент в концентрации 0.32 мкг/мл в буферном растворе или композиции L2 инкубировали при температурах 4–50°C. Через определенные промежутки времени отбирали пробы и определяли активность фермента по изменению мутности клеток стрептококка при 25°C.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства энергетики США в рамках программы IPP (контракт 405911-A-K5, PNNL-T2-0207-RU).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брико Н.И., Мальшиев Н.А., Покровский В.И. // Терапевтический архив. 2001. Т. 77. В. 11. С. 10–14.
2. Брико Н.И. // Вестн. РАМН. 2001. Т. 2. С. 3–6.
3. Currie B.J. // Curr. Opin. Infect. Dis. 2006. V. 19. P. 132–138.
4. Тимченко В.Н., Павлова Е.Б., Павлова Н.В. // Детские инфекции. 2005. Т. 4. С. 72–75.

5. Брико Н.И., Дмитриева Н.Ф., Ещина А.С., Тимофеев Ю.М., Кириллов М.Ю., Будилов А.В., Сидоренко С.В., Ряпис Л.А. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2005. Т. 2. С. 31–34.
6. Леонтьева Г.Ф., Суворов А.Н., Меризгова Л.Ф., Грабовская К.Б., Устинович И.А., Тоголян А.А. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2005. Т. 2. С. 35–40.
7. Мирошников К.А., Чертков О.В., Назаров П.А., Месляжинов В.В. // Успехи биол. химии. 2006. Т. 46. С. 65–98.
8. Matsuzaki S., Rashei M., Uchiyama J., Sakurai S., Ujihara T., Kuroda M., Ikeuchi M., Tani T., Fujieda M., Wakiguchi H., Imai S. // J. Infect. Chemother. 2005. V. 11. P. 211–219.
9. Carlton R.M. // Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. 1999. V. 47. P. 267–274.
10. Alisky J., Iczkowski K., Rapoport A., Troitsky N. // J. Infection. 1998. V. 36. P. 5–15.
11. Fischetti V.A. // Trends in Microbiol. 2005. V. 13. P. 491–496.
12. Loessner M.J. // Curr. Opin. Microbiol. 2005. V. 8. P. 480–487.
13. Lopez R., Garcia E., Garcia P. // Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies. 2004. V. 1. P. 469–474.
14. Nelson D., Loomis L., Fischetti V.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 4107–4112.
15. Nelson D., Schuch R., Chahales P., Zhu S., Fischetti V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 10765–10770.
16. Mozhaev V.V. // Trends in Biotechnol. 1993. V. 3. P. 88–95.
17. O'Fagain C. // Enzyme Microb. Technol. 2003. V. 33. P. 137–149.
18. Klyachko N.L., Ignatenko O.V., Dmitrieva N.F., Eshchina A.S., Rainina E.I., Kazarov A.K., Kuptsova O.S., Levashov A.V. // J. Drug Del. Sci. Tech. 2006. V. 16. P. 293–299.
19. Kim J., Grate J.W., Wang P. // Chem. Eng. Sci. 2006. V. 61. P. 1017–1026.
20. Klyachko N.L., Levashov A.V. // Curr. Opin. Colloid Int. Sci. 2003. V. 8. P. 176–186.

Bacteriophage Enzymes for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections: Stability and Stabilization of the Enzyme Lysing *Streptococcus pyogenes* Cells

N. L. Klyachko^{a,1}, N. F. Dmitrieva^b, A. S. Eshchina^a, O. V. Ignatenko^a, L. Yu. Filatova^a, E. I. Rainina^{a,c}, A. K. Kazarov^a, and A. V. Levashov^a

Phone: +7 (495) 939-3476; fax: +7 (495) 939-5417; e-mail: klyachko@enzyme.chem.msu.ru

^a Faculty of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

^b Faculty of Preventive Medicine, Sechenov Moscow Medical Academy, Trubetskaya ul. 8-2, Moscow, 119992 Russia

^c Pacific Northwest National Laboratory, P.O. Box 999 Richland, WA 99352, USA

The effect of various compounds on the activity and stability of a phage-associated enzyme lysing cells of streptococci of groups A and C (PlyC) was investigated. Substantial inhibition of the enzyme activity was revealed at an increased ionic strength (in the presence of NaCl) and upon the addition of carbohydrates (mono-, di-, and polysaccharides), i.e., agents stabilizing many enzymes. It was established that the enzyme activity was substantially reduced in the presence of positively charged polyelectrolytes and surfactants, whereas incubation with micelle-forming substances and negatively charged polyelectrolytes led to PlyC activation and stabilization. It was shown that, in the mycelial polyelectrolyte composition M16, the enzyme retained its activity for 2 months; while in a buffer solution under the same conditions (pH 6.3, room temperature), it practically completely lost its activity in 2 days. Characteristics of the enzyme thermal inactivation were found, in particular, its semiinactivation time at various temperatures; these allowed us to estimate its behavior at any temperature and to recommend conditions for its storage and use. The English version of the paper: Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2008, vol. 34, no. 3; see also <http://www.maik.ru>

Key words: a phage-associated enzyme lysing streptococcal cells, bacterial infections, phage enzyme stability and stabilization, phage enzymes, streptococcal infections