

УДК 577.181

Гены антимикробных пептидов для терапии внутриклеточных инфекций

В. Н. Лазарев

Научно-исследовательский институт физико-химической медицины
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию
e-mail: lazar0@mail.ru

Резистентность к антибиотикам имеет огромное социально-экономическое значение и рассматривается как угроза национальной безопасности любой страны и мирового сообщества в целом. Среди бактериальных возбудителей различных инфекций резистентность к отдельным антибиотикам может достигать 98 %. Инфекции, вызванные резистентными штаммами, отличаются длительным течением, чаще требуют госпитализации и увеличивают продолжительность пребывания в стационаре, ухудшают прогноз для пациентов [1]. При неэффективности выбранных препаратов приходится использовать средства второго или третьего ряда, которые зачастую более дороги, менее безопасны и не всегда доступны. Все это увеличивает прямые и косвенные экономические затраты, а также повышает риск распространения резистентных штаммов. Особенно это характерно для возбудителей внутриклеточных инфекций – микоплазм и хламидий. Терапия микоплазмозов и хламидиозов с использованием антибиотиков широкого спектра действия является малоэффективной вследствие быстрого возникновения резистентности к этим препаратам и, как результат, – развития персистенции возбудителя в организме.

В связи с этим поднимается вопрос о создании альтернативных терапевтических средств, резистентность к которым будет развиваться ограниченно или полностью отсутствовать. Такими средствами могут явиться антимикробные пептиды (АМП) – уникальная и чрезвычайно разнообразная группа соединений, являющаяся основным компонентом врожденного иммунитета всех организмов [2]. Несомненными преимуществами антимикробных

пептидов перед антибиотиками являются более широкий спектр антибактериального действия, функциональная активность при микромолярных концентрациях, отсутствие возможности формирования резистентности возбудителей к антимикробным пептидам, возможность синтеза аналогов природных пептидов с измененными биологическими свойствами. Невозможность формирования устойчивости к АМП объясняется уникальным механизмом их действия, заключающимся в формировании каналов и последующей фрагментацией мембраны бактериальной клетки. Однако к настоящему времени во всех исследованиях, посвященных изучению АМП, применяют экзогенные, т.е. искусственно синтезированные пептиды, в то время как механизм действия АМП, которые синтезируются непосредственно в инфицированной клетке, остается пока неясным. В качестве модельного пептида мы выбрали мелитин, амфипатический α -спиральный пептид – основной компонент пчелиного яда [3].

В нашей работе мы впервые показали ингибирование экспериментальной инфекции *Mycoplasma hominis* и *Chlamydia trachomatis* у мышей и *Mycoplasma gallisepticum* у цыплят бройлеров.

В настоящей работе мы использовали плазмидный вектор pBI/mel2/rtTA, содержащий ген мелитина под контролем тетрациклин-зависимого промотора CMV и ген трансактиваторного белка rtTA под контролем конститутивного раннего промотора CMV [4].

При использовании такой плазмидной конструкции возможно точное регулирование уровня экспрессии генов антимикробных пептидов в организме с помощью различ-

Табл. 1. Влияние введения рекомбинантного плазмидного вектора рВ1/mel2/rtTA на динамику выделения *S. trachomatis* из влагалища инфицированных мышей

Сроки наблюдения	Титр <i>S. trachomatis</i> во влагалищных смывах инфицированных мышей (количество включений <i>S. trachomatis</i> /мл)						
	2 дня	6 дней	9 дней	13 дней	16 дней	20 дней	27 дней
Группа 1	12950	8490	4250	5220	2510	1070	1570
Группа 2	12600	9750	3930	4850	2140	980	1470
Группа 3	6850	2710	1920	2090	1080	370	350

Примечание. Отличия между группой 3 и группами 1 и 2 статистически достоверны ($P < 0.05$).

Табл. 2. Выделение *M. gallisepticum* из различных отделов респираторного тракта и внутренних органов

	Орган	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Респираторный тракт	Трахея	0/14 ^a	14/14	14/14	14/14
	Воздушные мешки	0/14	12/14	10/14	14/14
	Легкие	0/14	10/14	6/14	11/14
	Общее количество реизоляций	0	36 ^b	30	39
Внутренние органы	Печень	0/14	4/14	0/14	3/14
	Селезенка	0/14	3/14	0/14	4/14
	Почки	0/14	8/14	6/14	7/14
	Сердце	0/14	3/14	0/14	3/14
	Общее количество реизоляций	0	18	6 ^c	17

^a количество реизоляций микоплазмы/общее число цыплят.
^b Различия статистически не достоверны для группы 2 против групп 3 и 4.
^c Различия статистически достоверны для группы 3 против групп 2 и 4, $P \leq 0.01$.

ных доз индуктора, что является немаловажным в случаях, когда продукты экспрессируемых генов являются токсичными.

В работе использовались самки мышей линии BALB/c 6–8 недельного возраста, вес 18–22 г.

До инфицирования *M. hominis* мышам вводили эстрадиол (Intervet UK, Великобритания) в дозе 0.5 мг на мышь подкожно в объеме 0.1 мл четырехкратно с недельным интервалом. Прогестерон (Dero-Provera, Великобритания) в дозе 2.5 мг на мышь вводили подкожно в объеме 0.1 мл за четыре дня до инфицирования *S. trachomatis*.

Суспензию *M. hominis* (титр 10^9 клеток/мл) вводили мышам интравагинально в объеме 50 мкл с использованием после второй инъекции эстрадиола. Фракцию элементарных телец *S. trachomatis* (титр 10^6 IFU/мл)(IFU-inclusion forming unit, включение-образующие единицы) вводили мышам интравагинально в объеме 50 мкл после инъекции прогестерона. Рекомбинантный плазмидный вектор рВ1/mel2/rtTA вводили интравагинально с использованием Efectene Transfection Reagent (Qiagen GmbH, Германия). Рекомбинантный вектор вводился двукратно: за 24 ч до заражения *M. hominis* или *S. trachomatis* и через 14 дней после заражения в количестве 2 мкг ДНК/мышь в объеме 25 мкл

с добавлением 25 мкл масла какао для повышения вязкости суспензии.

В качестве индуктора транскрипции гена мелитина использовался доксициклин гидрохлорид (ICN Pharmaceuticals, Москва, Россия). Препарат вводили мышам, инфицированным *M. hominis* и *S. trachomatis*, внутримышечно в дозе 2 мкг/мышь и 1 мкг/мышь соответственно в объеме 50 мкл в момент введения вектора.

Животные были разделены на 3 группы (по 6 в каждой группе, 2 независимых эксперимента). Животные в группе № 1 были инфицированы *M. hominis* или *S. trachomatis* без введения плазмидного вектора рВ1/mel2/rtTA и доксициклина. Животным в группе № 2 был введен доксициклин в соответствующей дозе с последующим инфицированием *M. hominis* или *S. trachomatis*. Животным в группе № 3 вводился плазмидный вектор рВ1/mel2/rtTA и доксициклин с последующим инфицированием *M. hominis* или *S. trachomatis*.

Для определения титра *M. hominis* после введения плазмидного вектора рВ1/mel2/rtTA готовили десятикратные разведения смывов из нижних отделов уrogenитального тракта мышей. Для определения титра *S. trachomatis* с использованием реакции прямой флуоресценции, влагалищными смывами инфицировали линию клеток McCoу.

После введения рекомбинантного вектора рВ1/mel2/rtTA и последующего инфицирования мышей мы наблюдали ингибирование инфекции *M. hominis*. Результаты приведены на рис. 1. Титр *M. hominis* во влагалищных смывах мышей в контрольной группе № 1 варьировал, снижаясь от 5.9 до 2.4 \log_{10} ccu/мл (ccu – color change unit, цветоизменяющие единицы) в течение 4 недель. В то же время в третьей группе мышей, которым до инфицирования вводился рекомбинантный вектор рВ1/mel2/rtTA совместно с доксициклином, титр *M. hominis* находился в пределах от 4.1 до 1.8 \log_{10} ccu/мл.

В случае введения плазмидного вектора рВ1/mel2/rtTA и последующего инфицирования мышей *S. trachomatis* уровень ингибирования инфекции составлял от 45 % до 80 % (табл. 1).

Несмотря на то, что мы не обнаружили полного освобождения мышей от микоплазм и хламидий в пределах сроков наблюдения, скорость элиминации возбудителя в группе № 3 была выше, чем в контрольных группах. Так, 3 мыши в группе № 3, инфицированные *M. hominis* были свободны от возбудителя к 21-му дню после инфицирования, в то время как в контрольных группах № 1 и № 2 *M. hominis* выделяли из всех мышей. Что же касается мышей, инфицированных *S. trachomatis*, то к 27-му дню после инфицирования 4 мыши в группе № 3 были свободны от возбудителя.

Необходимо отметить, что мы не получили статистически достоверных отличий в титрах между группами мышей № 1 и № 2, инфицированных *M. hominis* или *S. trachomatis*, что говорит, во-первых, об отсутствии неконтролируемой экспрессии гена мелитина, во-вторых, выбранная нами концентрация индуктора (доксициклина) не влияет на развитие инфекционного процесса.

Для исследования влияния введения рекомбинантно-го вектора на развитие инфекции *Mycoplasma gallisepti-*

сум 60 цыплят-бройлеров Ross в возрасте 21 день были маркированы, взвешены и разделены на четыре группы по 15 птиц, так чтобы средняя масса тела цыплят в каждой группе достоверно не отличалась на основании Student *t*-test.

Первая группа цыплят не была инфицирована *M. gallisepticum*, и рекомбинантный плазмидный вектор pBI/mel2/rtTA не вводился. Цыплята второй группы были инфицированы *M. gallisepticum*, рекомбинантный плазмидный вектор pBI/mel2/rtTA также не вводился. Цыплятам третьей группы был введен плазмидный вектор за 5 ч до инфицирования *M. gallisepticum*, а также за 24 и 5 ч до инфицирования внутримышечно вводился индуктор транскрипции гена мелитина – доксициклин (ICN Pharmaceuticals, Moscow, Russia) в дозе 0.1 мг на цыпленка в объеме 100 мкл. Цыплятам четвертой группы вводился доксициклин (в такой же дозе и с такими же интервалами) с последующим инфицированием *M. gallisepticum*. Цыплятам этой группы рекомбинантный плазмидный вектор pBI/mel2/rtTA не вводился.

Были проведены клинические, патоморфологические, иммунологические и микробиологические исследования цыплят всех групп.

Через 9 дней после инфицирования у цыплят в группах 1 и 3 никаких респираторных симптомов обнаружено не было. В то же время в группах 2 и 4 у 5 цыплят обнаружались респираторные хрипы. В группе 2 мы наблюдали статистически достоверное снижение средней массы тела цыплят. Наиболее интересным представляется выделение *M. gallisepticum* из внутренних органов цыплят (табл. 2).

Хотя мы не получили достоверных различий в частоте реинфекции *M. gallisepticum* из органов респираторного тракта цыплят групп 2 и 3 (табл. 4), *M. gallisepticum* была выделена только в 6 из 56 образцов внутренних органов, причем ни в одном случае из печени, селезенки и сердца цыплят этой группы *M. gallisepticum* не выделялась.

Несомненно, основным механизмом действия мембрано-активных антимикробных пептидов, приводящим к ингибированию микоплазменных и хламидийных инфекций как в культуре клеток, так и *in vivo*, является их прямое цитотоксическое действие на эти бактерии [5]. Кроме того, показано [6], что обработка *in vitro* микоплазм амфипатическими пептидами, такими как цекропин А, мелитин, маганин 2, приводит к деполяризации их плазматических мембран, изменению морфологии и уменьшению подвижности.

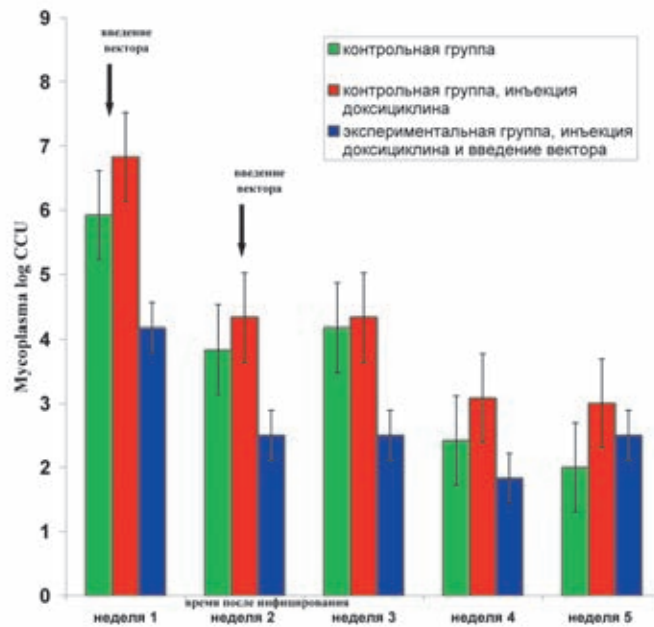


Рис. 1. Влияние введения рекомбинантного плазмидного вектора pBI/mel2/rtTA на динамику выделения *M. hominis* из влагалища инфицированных мышей

Ранее нами было показано, что экспрессия гена мелитина в культуре клеток HeLa приводит к снижению трансмембранного потенциала трансфицированной клетки [7], что, в свою очередь, вероятно, нарушает процесс адгезии микоплазм и хламидий к клетке и, таким образом, нарушает нормальный цикл их развития [8]. Кроме того, возможно, экспрессия мелитина приводит к изменениям в цитоскелете клеток и, как следствие, к нарушению внутриклеточного трафика хламидийных включений.

Несмотря на то, что в наших экспериментах не удалось достичь полной элиминации возбудителей из уrogenитального и респираторного тракта, эти данные позволяют выдвинуть предположение, что рекомбинантные плазмидные векторы, экспрессирующие гены антимикробных пептидов, можно рассматривать в качестве потенциальных агентов для профилактики и лечения микоплазмозов и хламидиозов. ●

Список литературы.

- Hunter P.A., Reeves D.S., The current status of surveillance of resistance to antimicrobial agents: report on a meeting, J. Antimicrob. Chemoth. 49 (2002) 17-23.
- Finlay B.B., Hancock R.E. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? Nature Rev. Microbiol. 2004. 2:497-504.
- Bechinger B. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. J. Membr. Biol. 1997. 156:197-211.4. Лазарев В.Н., Шкарупета М.М., Кострюкова Е.С., Титова Г.А., Акопян Т.А., Говорун В.М. Разработка подходов к генной терапии микоплазмозов и хламидиозов с использованием генов антимикробных пептидов. Молекулярная медицина, 2005. № 1. Стр. 60-64.
- Nir-Paz R., Prevost M.C., Nicolas P., Blanchard A., Wroblewski H. Susceptibilities of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma hyorhinis* to membrane-active peptides and

- enrofloxacin in human tissue cell cultures. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2002. 46. 1218-1225.
- Beven L., Castano S., Dufourcq J., Wieslander A., Wroblewski H. The antibiotic activity of cationic linear amphipathic peptides: lessons from the action of leucine/lysine copolymers on bacteria of the class Mollicutes. European Journal of Biochemistry, 2003. 270. 2207-2217.
- Lazarev V.N., Parfenova T.M., Gularyan S.K., Misyurina O.Y., Akopian T.A., Govorun V.M. (2002). Induced expression of melittin, an antimicrobial peptide, inhibits infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* in a HeLa cell line. International Journal of Antimicrobial Agents, 2002. 19. 133-137.
- Razin S., Jacobs E. (1992). Mycoplasma adhesion. Journal of General Microbiology, 1992. 138. 407-422.