

УДК 612.017.1:57.041

Влияние различных эффекторов на бактериолитическую активность интерлейкина-2 человека и лизоцима куриного яйца

П. А. Левашов^{1*}, Д. А. Матолыгина¹, Е. Д. Овчинникова¹, Д. Л. Атрошенко¹, С. С. Савин¹, Н. Г. Белогунова¹, С. А. Смирнов¹, В. И. Тишков^{1,2*}, А. В. Левашов¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

*E-mail: levashov@yahoo.com; vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 14.12.2016

Принята к печати 22.02.2017

РЕФЕРАТ Изучено влияние различных веществ на бактериолитическую активность интерлейкина-2 и лизоцима куриного яйца. Показано, что глицин и лизин не влияют на активность интерлейкина-2. Влияние этих аминокислот на лизоцим характеризуется колоколообразной зависимостью с максимумом при 1.5 и 18 мМ для глицина и лизина соответственно. Аргинин и глутамат активируют и интерлейкин-2, и лизоцим, проявляя концентрационную зависимость, близкую к гиперболической. Ароматические аминокислоты практически не влияют на активность обоих белков. Ароматические амины триптамин и тирамин активируют интерлейкин-2, но ингибируют лизоцим. Пептидные антибиотики действуют на интерлейкин-2 и лизоцим сходным образом с максимумом в области микромолярных концентраций. Таурин практически не влияет на интерлейкин-2 и лизоцим. Милдронат не влияет на лизоцим, но активирует интерлейкин-2, максимальный эффект достигается при концентрации эффектора 3 мМ. EDTA в концентрации 0.15 мМ и выше вызывает активацию как интерлейкина-2, так и лизоцима.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактериолитическая активность, интерлейкин-2, лизоцим куриного яйца.

ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин-2 – цитокин, играющий важную роль в регуляции иммунной системы, используется как лекарственное средство при различных онкологических заболеваниях [1, 2]. Сравнительно недавно было обнаружено, что интерлейкин-2 обладает бактериолитической активностью [3–6], физиологическая роль которой еще не установлена. Показано, что субстратная специфичность интерлейкина-2 отличается от специфичности лизоцима куриного яйца [3–6]. Однако известны микроорганизмы, на которые действуют и интерлейкин-2, и лизоцим. С целью более точного выявления потенциальных эффекторов мы сравнили влияние на активность интерлейкина-2 и лизоцима различных веществ – аминокислот, биогенных аминов, пептидных антибиотиков, EDTA и милдроната. Эти вещества или их аналоги могут присутствовать в биологических системах. В качестве субстрата мы взяли клетки *Escherichia coli*, которые лизируются как интерлейкином-2, так и лизоцимом [3–5]. Изучение характера влияния

различных добавок может в дальнейшем помочь понять механизм бактериолитического действия интерлейкина-2. Понимание особенностей влияния различных веществ на активность интерлейкина-2 и лизоцима может дать ключ к повышению эффективности медицинских препаратов и позволит разработать новые лекарственные средства.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: глицин (Fluka, Германия); EDTA (Panreac, Испания); L-лизин (Serva, Германия); тирамин, триптамин, таурин (Acros Organics, США), Трис, MES (Amresco, США); бацитрацин (MP Biomedicals, Германия); полимиксин В, L-триптофан, L-тирозин, L-фенилаланин, лизоцим куриного яйца (Sigma Aldrich, США); NaOH (Merck, Германия); уксусную кислоту («Химмед», Россия); соляную кислоту («Лаверна», Россия); милдронат (2-(2-карбоксилатоетил)-1,1,1-триметилгидразиний) (Cridex, Латвия); L-глутамат натрия (HongMei, КНР); ронколейкин (раствор очищенного интерлей-

кина-2 для внутривенного и подкожного введения (0.25 мг/мл; «Биотех», Россия).

Штамм *E. coli* M109 предоставлен J. Messing (Waksman Institute, New Jersey, США). Клетки выращивали согласно стандартной методике [7]. Суспензию клеток с концентрацией 10^9 КОЕ/мл в растворе 0.15 М NaCl замораживали порциями по 1 мл в жидком азоте. Препарат клеток хранили при температуре -70°C не более 2–3 недель. Клетки размораживали непосредственно перед экспериментом. Размороженную суспензию клеток центрифугировали при 4500 об/мин в течение 5 мин на центрифуге Minispin (Eppendorf, Германия), затем ресуспендировали в буферном растворе для измерения активности.

Бактериолитическую активность (скорость лизиса клеток) измеряли турбидиметрическим методом по уменьшению поглощения суспензии ($-dA/dt$, мин $^{-1}$) [5, 8] на длине волны 650 нм, в данных условиях прямо пропорциональному скорости изменения числа клеток – $d\text{КОЕ}/dt$. Измерения проводили в кюветах с длиной оптического пути 1 см и объемом 0.5 мл. Поглощение растворов измеряли с использованием двухлучевого спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Япония). Раствор лизоцима в буфере для измерения активности готовили непосредственно перед экспериментом. Готовый раствор интерлейкина-2 использовали без дополнительной обработки, ампулу вскрывали непосредственно перед экспериментом. Измерения проводили при температуре 37°C в буферном растворе 10 мМ MES-Трис-ацетат pH 8.8 для интерлейкина-2 и pH 8.5 для лизоцима. Для удобства сравнения скоростей лизиса клеток во всех экспериментах использовали интерлейкин-2 в конечной концентрации 15 мкг/мл, лизоцим – 0.1 мкг/мл. В спектрофотометрической кювете сначала смешивали буферный раствор и исходную суспензию клеток. При определении скорости лизиса клеток в присутствии фермента подбирали такое количество добавляемой суспензии, чтобы поглощение (A_{650}) в кювете в начальный момент времени было равно 0.43–0.45. В течение 5 мин измеряли изменение фонового поглощения, которое может быть связано с самопроизвольным лизисом клеток без фермента или с их оседанием. Затем в кювету добавляли раствор эффекторов, в течение 5 мин измеряли изменение фонового поглощения, после чего добавляли раствор фермента. В качестве начальной скорости лизиса клеток определяли изменение поглощения в интервале 5–25 с с момента добавления фермента. Значение величины фонового самопроизвольного лизиса (или осаждения) клеток в отсутствие фермента вычитали из значения скорости лизиса в присутствии фермента. Во всех экспериментах фо-

новое изменение поглощения не превышало средней величины погрешности измерения скорости лизиса в присутствии фермента. В условиях данной работы все добавки, кроме ферментов, не изменяли величину фонового лизиса в пределах погрешности эксперимента. Значение pH растворов всех добавляемых веществ доводили при необходимости до 8.8 (8.5) с помощью растворов NaOH или HCl. Эффекты добавок не сводились к влиянию на активность за счет изменения ионной силы при увеличении концентрации эффектора. Не выявлено значимых изменений бактериолитической активности при изменении ионной силы в использованных нами диапазонах [3, 8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На *рис. 1* представлены зависимости активности лизоцима и интерлейкина-2 от концентрации глицина, лизина, аргинина и глутамата. Из *рис. 1А,Б* видно, что активность интерлейкина-2 не изменяется в присутствии глицина, самой простой природной аминокислоты, и положительно заряженного лизина, тогда как активность лизоцима зависит от концентрации как глицина, так и лизина. В присутствии 2 мМ глицина или 15–18 мМ лизина активность лизоцима достигает максимума, при дальнейшем повышении концентрации активность лизоцима снижается и возвращается к исходным значениям. Таким образом, в присутствии этих двух аминокислот лизоцим и интерлейкин-2 ведут себя по-разному, что может указывать на различия в механизме их действия. Эффект повышения активности лизоцима при добавлении глицина ранее не был описан. Однако известно, что глицин может повышать эффективность различных антимикробных агентов, а также обладает бактериостатическим действием [9]. Различия во влиянии глицина на лизоцим и интерлейкин-2 сложно объяснить. Например, можно предположить, что глицин действует на один из бактериальных поринов, облегчая взаимодействие лизоцима с клеточной стенкой, в то время как в случае интерлейкина-2 данный механизм, по-видимому, не реализуется.

На *рис. 1В* представлены кривые, показывающие как аргинин влияет на бактериолитическое действие лизоцима и интерлейкина-2. Видно, что при концентрации эффектора 10 мМ и выше скорость лизиса клеток обоими белками существенно возрастает. Действие аргинина может определяться сложной совокупностью воздействий как на фермент, так и на клетки. Известно, что аргинин повышает эффективность фармацевтических препаратов на основе лизоцима, препятствуя его агрегации [10]. Следует также отметить принципиальные различия в характере влияния аргинина и лизина на бактерио-

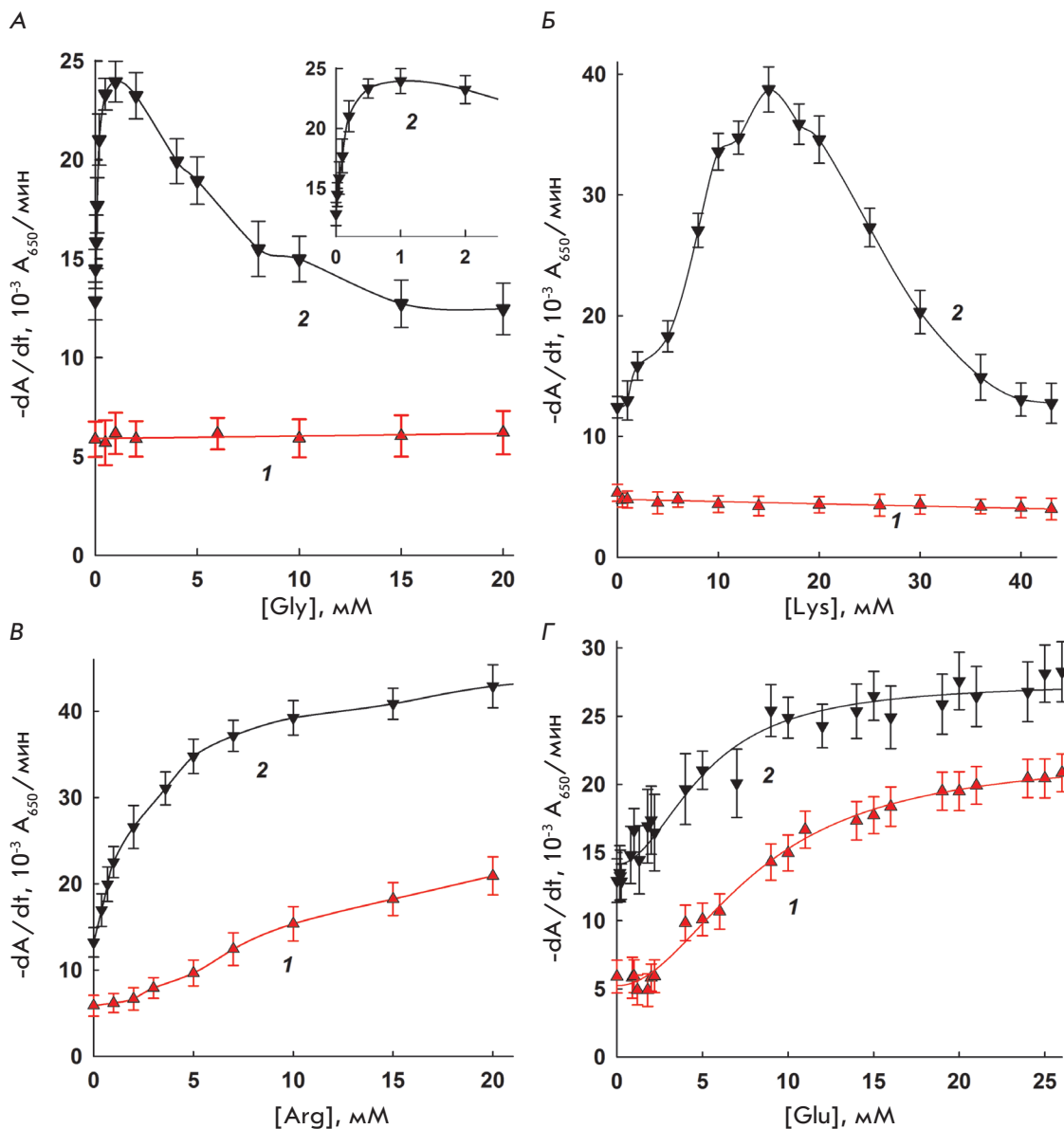


Рис. 1. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок глицина (А), лизина (Б), аргинина (В) и глутамата (Г). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно

литическую активность лизоцима и интерлейкина-2. Вероятно, различий в полярности и геометрии положительно заряженных радикалов этих двух аминокислот достаточно для того, чтобы лизин влиял на лизис клеток лизоцимом и не влиял на лизис клеток интерлейкином-2.

Активность и лизоцима, и интерлейкина-2 изменяется сходным образом в присутствии 15 мМ глутамата, увеличиваясь в 2 и 3 раза соответственно (рис. 1Г). При дальнейшем повышении концентрации глутамата активность меняется незначительно. Сходное действие глутамата на активность лизоцима и интерлейкина-2 можно, по-видимому, объяснить тем, что глутамат образует комплекс с положительно заряженными группами на поверхности белков, предотвращая непродуктивную сорбцию ферментов

на клетках, что может существенно изменять эффективные значения параметров бактериолитической активности [11, 12].

На рис. 2 представлены зависимости активности лизоцима и интерлейкина-2 от концентрации ароматических аминокислот. Тирозин, учитывая его низкую растворимость в воде, использовали только в концентрации менее 0.6 мМ. Видно, что в присутствии фенилаланина и триптофана активность лизоцима немного снижается (незначительно превосходит погрешность измерения). В присутствии тирозина активность лизоцима повышается также практически на уровне средней погрешности измерений. Активность интерлейкина-2 в присутствии фенилаланина и триптофана не изменяется. На кривой зависимости активности интерлейкина-2 от кон-

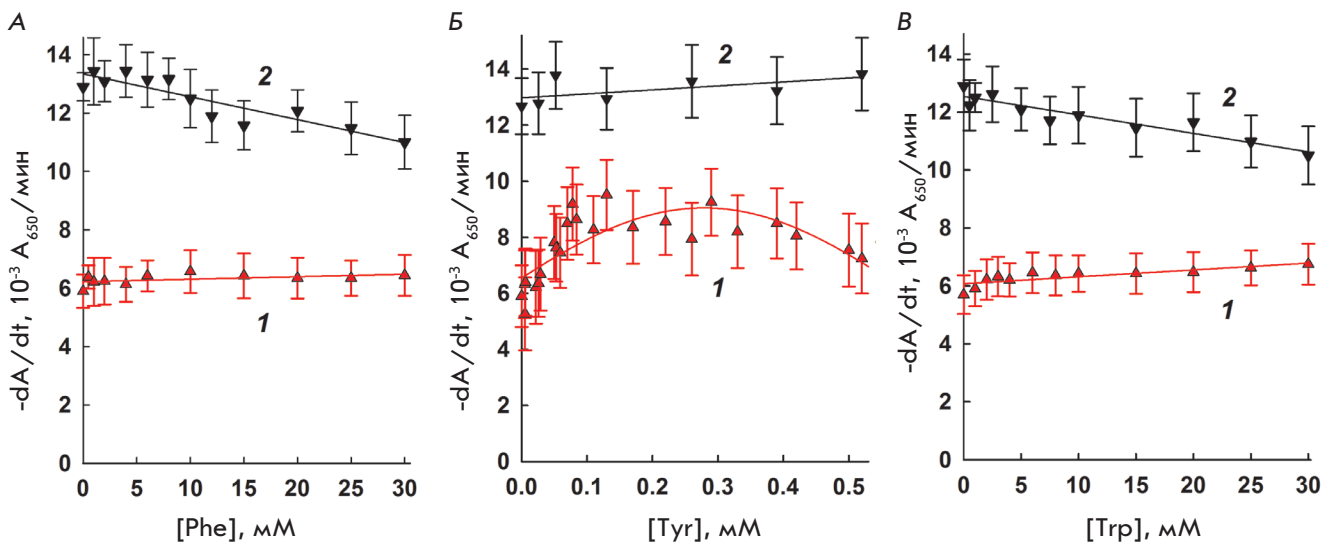


Рис. 2. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок фенилаланина (А), тирозина (Б) и триптофана (В). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно

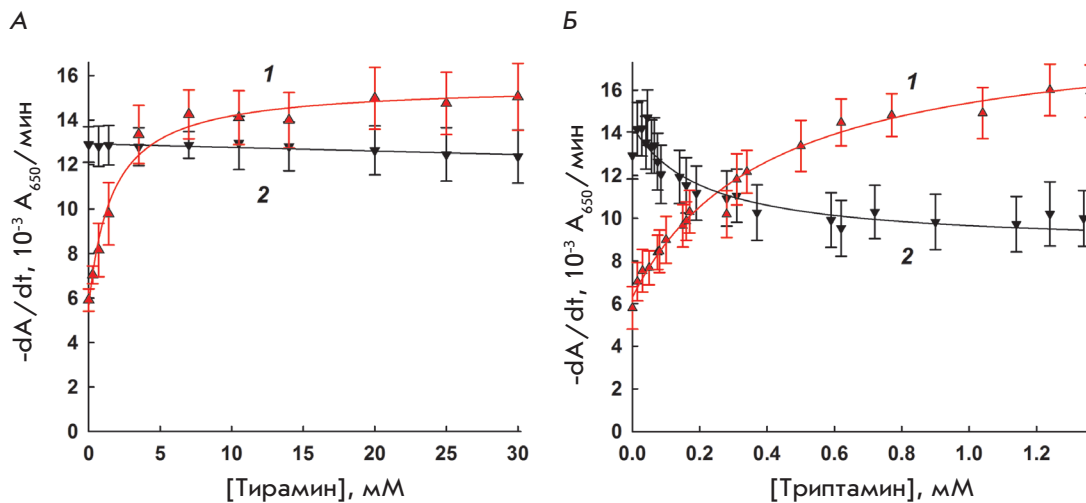
центрации тирозина наблюдается слабо выраженный максимум (увеличение активности на треть от исходной) при концентрации добавки 0.25–0.3 мМ. В целом, можно утверждать, что ароматические аминокислоты незначительно влияют на активность как лизоцима, так и интерлейкина-2. Иная картина, как будет показано далее, прослеживается в действии производных ароматических аминокислот, а именно биогенных ароматических аминов – триптамина и тирамина.

На рис. 3 представлены зависимости активности интерлейкина-2 и лизоцима от концентрации биогенных аминов тирамина и триптамина, которые формально являются производными тирозина и триптофана. Видно, что интерлейкин-2 активируется, а лизоцим ингибируется обоими биогенными аминами. Однако эффект влияния тирамина на ли-

зоцим слабо выражен. Эти результаты также могут свидетельствовать в пользу принципиальных различий в механизмах действия интерлейкина-2 и лизоцима. Для интерлейкина-2 характерно связывание с различными лигандами за счет гидрофобных взаимодействий [13], поэтому возможно, что тирамин и триптамин связываются с какими-то гидрофобными областями на поверхности интерлейкина-2, препятствуя его непродуктивной сорбции на клетках.

На рис. 4 приведены кривые зависимости активности интерлейкина-2 и лизоцима от концентрации пептидных антибиотиков полимиксина В и бацитрацина. Видно, что антибиотики сходным образом действуют на активность обоих бактериолитических факторов с максимумом в области 5–7 мкМ. Впрочем, эти пептидные антибиотики обладают цитотокси-

Рис. 3. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок тирамина (А) и триптамина (Б). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно



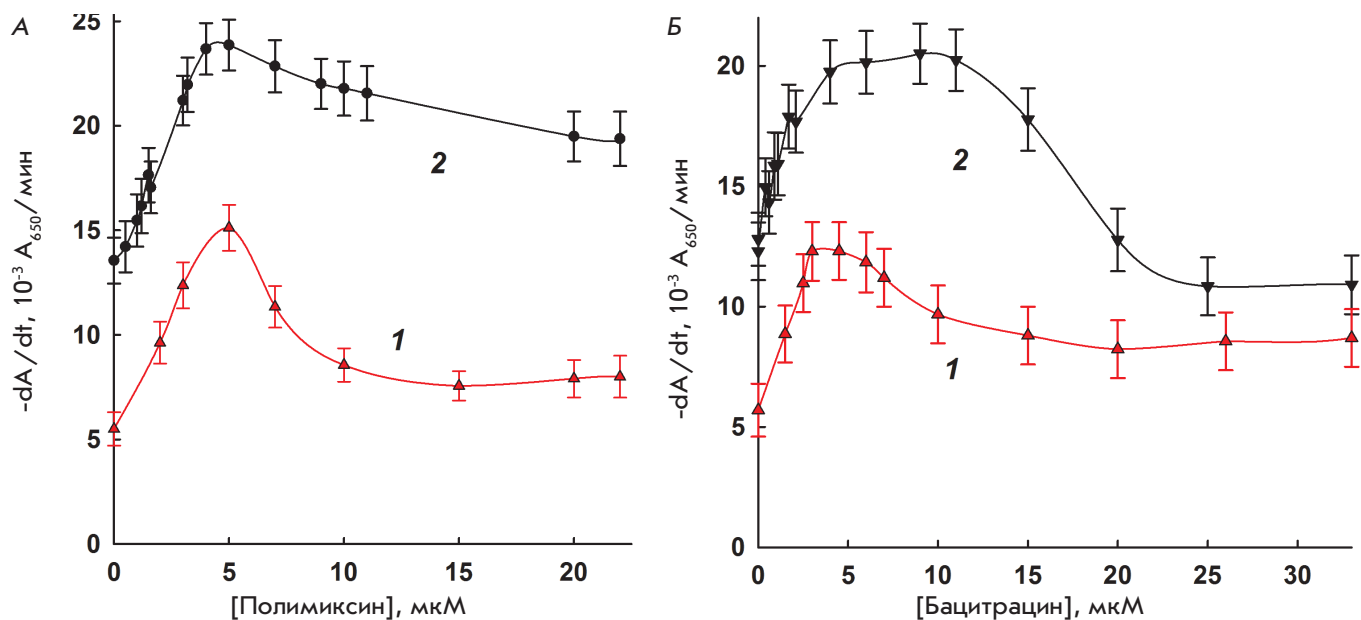


Рис. 4. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок полимиксина В (А) и бацитрацина (Б). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно

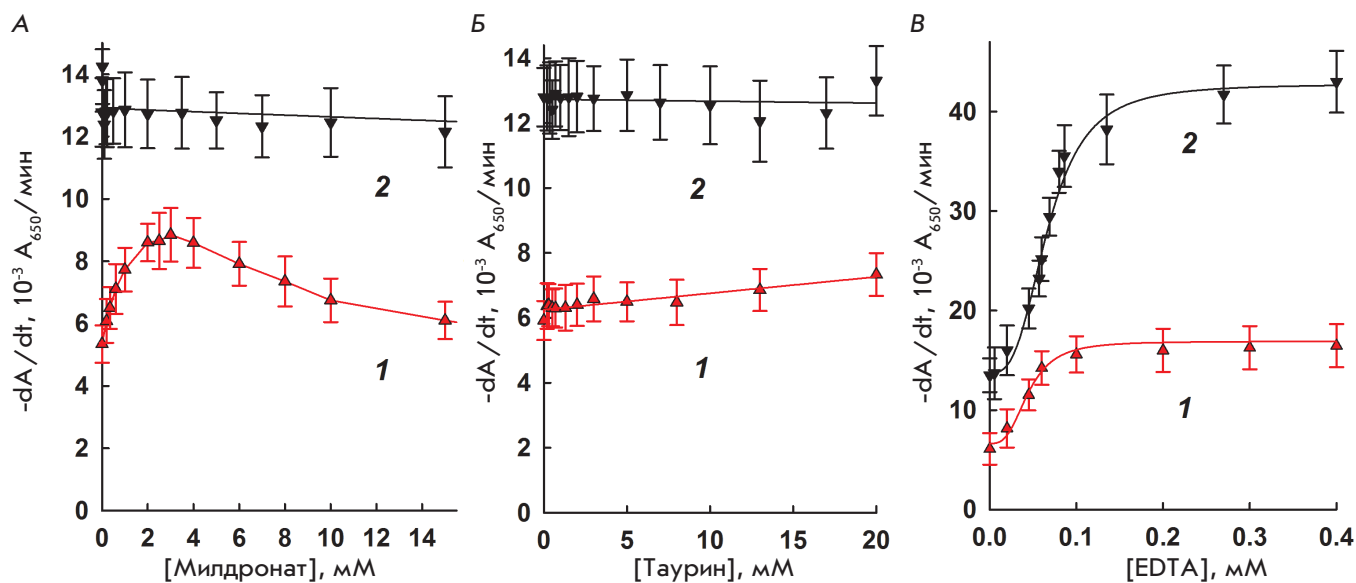


Рис. 5. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок милдроната (А), таурина (Б), EDTA (В). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно

ческим действием на клетки *E. coli* [14, 15], поэтому схожесть эффекта может быть связана с неким воздействием на клетки, а не с влиянием на свойства бактериолитических факторов. Сам антибиотик не вызывает лизис бактерий, но каким-то образом делает их более уязвимыми к действию бактериоли-

тических ферментов, что наблюдали ранее в случае эндолизина из бактериофага SPZ7 [16].

На рис. 5 представлены зависимости активности интерлейкина-2 и лизоцима от концентрации милдроната, таурина и EDTA. Милдронат не изменяет активность лизоцима, но зависимым от concentra-

ции образом увеличивает активность интерлейкина-2 с максимумом при 3 мМ. Физиологическое действие милдроната обычно объясняют структурным сходством с природными биологически активными соединениями, в том числе с γ -бутиробетаином, его предшественником, из которого синтезируется карнитин [17, 18]. Наблюдаемая зависимость активности интерлейкина-2 от концентрации милдроната свидетельствует о прямом образовании комплекса фермента с эффектором. Таурин не влияет на активность ни интерлейкина-2, ни лизоцима. EDTA в концентрации 0.1 мМ и выше усиливает действие обоих бактериолитических факторов, что, как и в случае с пептидными антибиотиками, можно частично объяснить действием на клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как видим, влияние добавок на интерлейкин-2 и лизоцим зависит от химической природы добавки, что, по-видимому, может указывать принципиально разные механизмы действия. Нами выявлены вещества, которые активируют изучаемые бактериолитические факторы, что может иметь практическую значимость. Эффекторы могут использоваться для повышения эффективности уже существующих медицинских препаратов, а также для создания новых лекарственных композиций. Например, впервые показано, что глицин, лизин и глутамат непосредственно усиливают бактериолитическую активность лизоцима. И глицин, и лизин, и лизоцим являются широко

распространенными лекарственными средствами, но их совместное действие не изучено. Влияние глутамата и аргинина на активность лизоцима также ранее не изучали. Интерлейкин-2 в настоящее время используют в качестве регулятора иммунной системы, но не бактериолитического фактора, так как его бактериолитические свойства ранее не были известны. Однако не исключено, что антимикробные свойства также сыграли свою роль в ряде случаев, когда эффективность интерлейкина-2 была подтверждена. Интерлейкин-2 применяют как при сепсисе, где роль бактерий очевидна, так и в терапии опухолей, где роль бактерий менее очевидна, однако могут иметь место сочетанные с основным заболеванием бактериальные поражения тканей. Механизм бактериолитического действия интерлейкина-2 пока не установлен, механизм воздействия эффекторов на его активность также требует дальнейшего изучения. Однако становится понятно, что следует обратить пристальное внимание на активацию интерлейкина-2 в присутствии добавок, например, мельдония, аргинина и глутамата. Сочетанное использование данных препаратов может открыть новые горизонты в лечении тяжелых заболеваний. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 15-14-00012 «Исследование бактериолитической активности интерлейкина-2»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mizui M., Tsokos G.C. // Curr. Rheumatol. Rep. 2016. V. 18(11). P. 68.
- Gill D.M., Stenehjem D.D., Parikh K., Merriman J., Sendilnathan A., Agarwal A.M., Hahn A.W., Gupta S., Tantravahi S.K., Samlowski W.E., Agarwal N. // Ecanermedscience. 2016. V. 10. P. 676.
- Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Семёнова М.В., Гитинов М.М., Левашов А.В., Левашов П.А. // Биоорган. химия. 2012. Т. 38. № 3. С. 315–323.
- Левашов П.А., Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Левашов А.В. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 11. С. 1567–1570.
- Левашов П.А., Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Савин С.С., Захарова Г.С., Гасанова Д.А., Белогурова Н.Г., Овчинникова Е.Д., Смирнов С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 6. С. 359–364.
- Левашов П.А., Овчинникова Е.Д., Морозова О.А., Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Чердынцева Т.А., Савин С.С., Захарова Г.С., Алексеева А.А., Белогурова Н.Г., Смирнов С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. // Acta Naturae. 2016. Т. 8. № 1(28). С. 107–112.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Lab. Press, 1982.
- Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S.V., Belogurova N.G., Levashov A.V. // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 2161–2163.
- Minami M., Ando T., Hashikawa S., Torii K., Hasegawa T., Israel D.A., Ina K., Kusugami K., Goto H., Ohta M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2004. V. 48(10). P. 3782–3788.
- Shah D., Shaikh A.R. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. V. 34(1). P. 104–114.
- Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А., Белогурова Н.Г., Еремеев Н.Л., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 6. С. 365–371.
- Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A.V., Levashov P.A. // Colloids Surf. B. 2011. V. 88. P. 131–133.
- Afonin P.V., Fokin A.V., Tsygannik I.N., Mikhailova I.Yu., Onoprienko L.V., Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Mareeva T.Yu., Nesmeyanov V.A., Li N., Pangborn W.A., Duax W.L., Pletnev V.Z. // Protein Sci. 2001. V. 10(8). P. 1514–1521.
- Zong L., Teng D., Wang X., Mao R., Yang N., Hao Y., Wang J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100(11). P. 5045–5057.
- Yu Zh., Qin W., Lin J., Fang Sh., Qiu J. // Biomed. Res. Int. 2015. P. 679109.
- Левашов П.А., Попов Д.В., Попова В.М., Жиленков Е.Л., Морозова О.А., Белогурова Н.Г., Седов С.А., Дятлов И.А., Клячко Н.Л., Левашов А.В. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 9. С. 1299–1304
- Liepinsh E., Konrade I., Skapare E., Pugovics O., Grinberga S., Kuka J., Kalvinsh I., Dambrova M.J. // Pharm. Pharmacol. 2011. V. 63(9). P. 1195–1201.
- Beitnere U., Dzirkale Z., Isajevs S., Rumaks J., Svirskis S., Klusa V. // Eur. J. Pharmacol. 2014. V. 745. P. 76–83.