

УДК 547.288.3 / 876 576.382.49; 577.16.086 / 151.042; 579.882.11

# Создание ингибиторов системы секреции типа III *S. trachomatis*, подавляющих развитие острой и хронической хламидийной инфекции

Н. А. Зигангирова, Е. С. Заякин\*, Л. Н. Капотина, Е. А. Кост, Л. В. Диденко, Д. Ю. Давыдова, Ю. П. Румянцева, А. Л. Гинцбург

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи  
Минздравсоцразвития Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

\*E-mail: e.s.zayakin@gmail.com

Поступила в редакцию 17.01.2012 г.

**РЕФЕРАТ** Система секреции типа III (ССТТ) в настоящее время рассматривается как один из основных факторов патогенности грамотрицательных бактерий, осуществляющих различные типы паразитизма. Эта структура абсолютно необходима для развития острого инфекционного процесса, а хронизация инфекции принципиально зависит от ее функционирования, поэтому ССТТ считается одной из наиболее перспективных мишеней для разработки антибактериальных препаратов широкого спектра действия, не вызывающих развития резистентности и эффективных при острой и хронической формах инфекции. Действие разрабатываемых препаратов основано на специфическом ингибировании работы ССТТ, что должно прерывать инфекционный процесс, позволяя иммунной системе элиминировать патоген. В результате скрининга с использованием специфических клеточных и бактериальных тестов, дальнейшей оптимизации структуры и детального изучения биологической активности получен новый класс ингибиторов ССТТ хламидий. Отобранные соединения обладают выраженными преимуществами перед имеющимися на данный момент ингибиторами ССТТ патогенных микроорганизмов, что обусловлено их высокой ингибирующей активностью при минимальном повреждении эукариотической клетки. Выбранные ингибиторы перешли на стадию проведения доклинических испытаний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** тиогидразоны, тиогидразиды, тиadiaзины, система секреции типа III, цитотоксичность, хламидии, ингибиторы, микроскопия, электронная микроскопия, морфология.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ССТТ – система секреции типа III; МОИ – множественность инфекции; МОМР – белок наружной мембраны хламидий; ЛПС – липополисахарид; ВОЕ – включениеобразующие единицы.

## ВВЕДЕНИЕ

Хламидии – грамотрицательные бактерии с внутриклеточным типом паразитирования. Два вида хламидий являются широко распространенными возбудителями заболеваний человека. В общей структуре заболеваний, передаваемых половым путем, хламидийная инфекция, вызываемая *Chlamydia trachomatis*, занимает первое место, ежегодно вызывая более 100 млн новых случаев заболевания [1]. По данным ВОЗ, число инфицированных хламидиями на земном шаре по самым скромным подсчетам достигает одного миллиарда и сохраняет стабильную тенденцию к увеличению даже в развитых странах. Респираторный хламидиоз, обусловленный *S. pneumoniae*, составляет до 20% в общей структуре пневмоний, а каждые 4–7 лет в европейских странах наблюдаются

эпидемические вспышки этой инфекции (по данным ВОЗ). В результате до 80% населения земного шара в течение своей жизни переболевает респираторным хламидиозом. Наибольшую проблему представляют хронические хламидиозы, которые, как доказано, служат механизмом, запускающим такие тяжелые хронические заболевания, как астма, атеросклероз, артрит, женское и мужское бесплодие, патологии беременности [2, 3].

Отсутствие эффективных средств борьбы с хроническими бактериальными инфекциями и быстрые темпы развития резистентности патогенов к антибактериальным препаратам, применяемым при острых инфекционных процессах, определяет медицинскую и социально-экономическую значимость поиска препаратов нового поколения с использованием мишень-

специфических технологий [4–6]. В случае антибактериальных препаратов эта технология включает выбор в качестве мишеней белков, ответственных за проявление патогенных свойств микроба; последующий поиск специфических ингибиторов с применением компьютерных программ, методов органического синтеза и экспериментального тестирования; подтверждение предсказанной биологической активности на модельных системах инфекционного процесса.

Секреция в клетку макроорганизма факторов патогенности – белков, ответственных за проявление бактериями патогенных свойств, является важнейшим механизмом развития инфекционного процесса. Всего к настоящему времени описано семь систем секреции, характеризующихся различной специфичностью в отношении секретлируемых молекул и различиями в структуре секреторного аппарата. Одна из этих систем, получившая название система секреции типа III (ССТТ), переносит белковые факторы патогенности из бактериальной клетки непосредственно в цитоплазму эукариотической клетки. Такой «молекулярный шприц» найден только у патогенных бактерий, так как именно благодаря его функционированию бактерии с различным типом паразитирования, экзо- и эндопаразиты реализуют свои патогенные свойства [7]. Ввиду консервативности этой структуры у таксономически удаленных микроорганизмов – возбудителей социально значимых инфекций, таких, как *Chlamydia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Brucella* и др., можно рассчитывать, что антибактериальные препараты на основе специфических ингибиторов ССТТ будут обладать широким спектром действия.

У внутриклеточных патогенов, к типичным представителям которых относятся хламидии, транспортная система отвечает за возможность использования регуляторных путей хозяйской эукариотической клетки, фактически подавляя клеточный ответ. ССТТ необходима на всех стадиях жизненного цикла хламидий, она обеспечивает возможность внутриклеточного размножения возбудителя как при острой, так и при хронической инфекции. Блокирование работы ССТТ приводит к подавлению размножения хламидий в условиях *in vitro* [8].

В настоящее время известно несколько ингибиторов ССТТ – низкомолекулярных соединений различных классов, отобранных при помощи высокопроизводительного скрининга библиотек химических соединений [9–13]. Существенным недостатком этих соединений является их плохая растворимость в органических растворителях и воде. Более того, эти ингибиторы обладают значительной токсичностью для клеток млекопитающих, вызывая гибель до 60%

клеток в присутствии специфической ингибирующей концентрации (50 мкМ), что затрудняет их разработку для дальнейшего использования в качестве антибактериальных препаратов.

Цель данной работы состояла в создании фармакологически перспективных соединений для подавления острой и хронической инфекции, которые ингибируют секрецию факторов патогенности хламидий, но лишены указанных недостатков.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Бактериальные штаммы и клеточные линии

В работе использовали лабораторный штамм *S. trachomatis* BU-434 серовара L2 (ATCC VR 902B), *S. muridarum* штамм Nigg (ATCC VR-123), штамм *S. pneumoniae* K-6, любезно предоставленный P. Saikkii (Финляндия), и клеточную линию McCoy В (гибридная линия синовиальных клеток человека и мышечных фибробластов).

### Оценка токсичности для эукариотических клеток

Работу проводили с использованием 96- и 24-луночных планшетов и односуточного монослоя клеток. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии различных доз ингибиторов. Цитотоксическое действие препаратов оценивали при помощи трех стандартных методов: окрашивания клеток метиленовым синим; МТТ-теста («Sigma»); и кальцеинового теста (LIVE/DEAD Viability/ Cytotoxicity Kit for mammalian cells, «Invitrogen», США).

### Заражение клеток штаммами хламидий

Клетки McCoyВ заражали хламидиями с множественностью инфекции 1 (МОИ 1) согласно стандартной методике [3].

### Иммунофлуоресцентная детекция накопления хламидий

Внутриклеточные хламидийные включения детектировали методом прямой иммунофлуоресценции (ПИФ) с применением моноклональных видоспецифических антител к белку МOMP наружной мембраны *S. trachomatis* и родоспецифических антител к ЛПС хламидий, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) (ООО «Ниармедик Плюс», Москва).

### Оценка жизнеспособности хламидий

Жизнеспособность хламидий оценивали полуколичественным методом, основанным на иммунофлуоресценции. Лизаты инфицированных клеток высевали на новый монослой клеток. С этой целью 48-часовой монослой инфицированных клеток снимали сахарозофосфатно-глутаминовым буфером (SPG) и лизирова-

ли замораживанием. Готовили необходимые разведения лизатов, которые высевали на новый монослой. Клетки инкубировали в течение 48 ч, фиксировали и окрашивали мечеными ФИТЦ моноклональными антителами для последующей оценки результатов с помощью люминесцентной микроскопии. Количество инфицированных клеток определяли в 10 произвольных полях зрения и подсчитывали среднее число включениеобразующих единиц (ВОЕ) в 1 мл образца (использовали результаты трех независимых экспериментов).

#### Детекция эффекторного белка IncA *C. trachomatis*

Суточный монослой клеток McCoу заражали *C. trachomatis* с МОИ, равной пяти. Через 8 ч после заражения (время начала транслокации эффекторного белка в мембрану включения) добавляли исследуемые соединения в разных дозах. Через 24 ч клетки окрашивали первичными анти-IncA-антителами («Innovagen», Швеция) и вторичными, мечеными ФИТЦ. Параллельно клетки окрашивали моноклональными антителами к белку МОМР *C. trachomatis*.

#### Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

Клетки культивировали и заражали в 6-луночных планшетах. Осадок клеток, полученный центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин (Rotanta 460R, Hettich), фиксировали по методу Ito-Karnovsky. Для этого использовали постфиксацию OsO<sub>4</sub> и контрастирование в водном растворе уранилацетата. Далее проводили дегидратацию образцов в серии спиртов восходящей концентрации, инфльтрацию в смеси смолы LR White и 100% этанола (1 : 1) в течение 1 ч, затем в чистой смоле в течение 12 ч при +4°C. Полимеризацию смолы проводили при +56°C в течение 24 ч. После этого получали ультратонкие срезы, которые контрастировали раствором свинца по Рейнольдсу и анализировали с помощью ТЭМ Jeol 100В.

#### Выделение РНК и анализ экспрессии генов

РНК выделяли из культуры клеток через 24 ч после заражения с использованием реагента Trizol («Invitrogen»). Концентрацию РНК, предварительно обработанной ДНКазой I (DNA-free™, «Ambion»), определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-100 («ThermoFisher Scientific», США). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием набора «Reverse Transcription System» («Promega», США).

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с полученной кДНК проводили с праймерами к следующим генам: 16S рРНК (primer forward 5'-GGCGTATTTGGGCATCCGAGTAACG, primer reverse 5'-ТCAAATССА-

GCGGGTATTAACCGCCT, Pb 5'-R6G-TGG CGG CCA ATC TCT CAA TCC GCC TAG A-BHQ2), *trpA* (primer forward 5'-CGG GAA TAA ATG GTG TGT GCG T, primer reverse 5'-TAAAGACATCCGTTCCG-GCGTT, Pb 5'-ROX-ATC TTC CAG CAC STT TAT CAC ACG GAG A-BHQ2), *incA* (primer forward 5'-СТА CAG AAG AAA TGC GCA AAC TTT, primer reverse 5'-AAT GAT TGC TGG TTA TGC GCT AAT, Pb 5'-FAM-CGG CGA ACT TCT TCT GCT AAT GGG GTT-BHQ1), *lcrE* (primer forward 5'-GAG GCT GTG TTG AGG TAG GT, primer reverse 5'-CGA TAA ATG CGG ATA ATG AGG AT, Pb 5'-FAM-AGG TAC TGG AGC ATG AGG AGG CGT A-RTQ1). ПЦР-РВ проводили на амплификаторе CFX 96 («Bio-Rad Lab.», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Анализ структурного сходства известных ингибиторов ССТТ

Среди известных ингибиторов ССТТ [9–13] наиболее хорошо изучены соединения класса гидразонов на основе гидразидов ароматических карбоновых кислот и различных салициловых альдегидов (IV). На рис. 1 приведены структуры веществ, подавляющих ССТТ.

Эти молекулы обладают некоторым сходством – все они содержат остаток салициловой, 4-гидроксибензойной кислот и их производных (эти остатки выделены зеленым). Кроме того, можно отметить структурное сходство сочленения производных салициловых кислот с остальной частью молекулы (от-

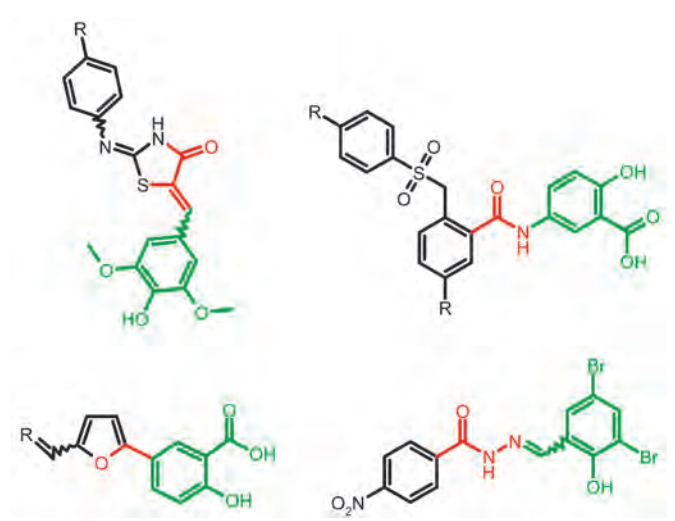


Рис. 1. Структуры различных классов соединений – известных ингибиторов ССТТ.

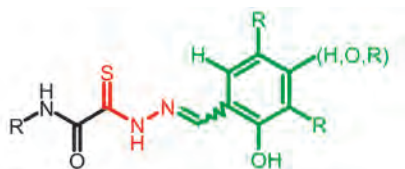


Рис. 2. Общая формула тиогидразонов тиогидразидов оксаминовых кислот.

мечено красным). Исходя из теории биоизостерических замен [14, 15], согласно которой карбонильная и тиокарбонильная группы функционально взаимозаменяемы в биологических системах, можно предположить, что действие тиогидразонов оксаминовых кислот и различных салициловых альдегидов должно быть аналогичным действию гидразонов. Данный класс соединений относительно новый, и его биологические свойства до настоящего времени оставались практически неизученными.

С использованием тиогидразонов тиогидразидов оксаминовых кислот в качестве возможных ингибиторов ССТТ предполагалось решить следующие задачи.

Получить вещества с низкой токсичностью в отношении эукариотических клеток.

Получить вещества с высокой селективной активностью в отношении ССТТ.

Получить вещества с хорошими фармакокинетическими свойствами.

Разработать простую схему синтеза нужных веществ.

### Получение тиогидразонов и тестирование их способности ингибировать ССТТ, токсичности и активности *in vitro*

Тиогидразоны оксаминовых кислот (рис 2.) синтезировали согласно довольно простой схеме [16], представленной на рис. 3.

Видно, что, используя различные коммерчески доступные амины и альдегиды, путем несложных химических превращений можно получить большое количество соединений. Всего синтезировано около 300 веществ, из которых для дальнейшего тестирования

отобран ряд соединений, обладающих хорошей растворимостью. Всего таких соединений оказалось 120, так как, несмотря на лучшую, чем у гидразонов, растворимость, тиогидразоны в целом являются мало растворимыми.

В первую очередь оценивали токсичность отобранных таким образом соединений. Сначала применяли метод окрашивания клеток метиленовым синим. Соединения, которые имели удовлетворительные показатели токсичности, далее тестировали с помощью кальцеинового и МТТ-тестов. В результате было отобрано 15 соединений (табл. 1), показавших приемлемую токсичность при концентрации 50 мкМ (гибель менее 30% клеток). Все эти соединения содержали остатки различных фторпроизводных анилина и производных салицилового и 4-гидроксibenзальдегида.

Известно, что ингибиторы ССТТ хламидий подавляют внутриклеточное размножение возбудителя в условиях *in vitro*. Проверка способности отобранных соединений подавлять хламидийную инфекцию, выполненная на клеточных культурах, показала, что все они обладали ингибирующей активностью (табл. 2).

Методом иммунофлуоресценции определили способность этих соединений подавлять транслокацию эффекторного белка IncA *S. trachomatis*. Оказалось, что все проверенные соединения ингибировали эффекторную функцию ССТТ хламидий.

Таким образом были отобраны новые ингибиторы ССТТ *S. trachomatis*, принадлежащие к классу тиогидразонов тиогидразидов оксаминовых кислот, все они подавляли размножение хламидий в клеточных культурах. Присутствие атома фтора повышало, вероятно, липофильность отобранных молекул, что позволяло им легко проходить через биологические мембраны и, предположительно, повышало стабильность к действию различных ферментов [17]. Кроме того, включение производных салицилового и 4-гидроксibenзальдегидов позволило получить соединения с лучшей растворимостью и активностью.

### Изучение стабильности и природы токсичности тиогидразонов

Из 15 ингибиторов ССТТ, отобранных по совокупности проведенных тестов, для детального изучения стабильности при хранении в различных условиях

Рис. 3. Получение тиогидразонов на основе тиогидразидов оксаминовых кислот: а – хлорацетилхлорид, ДМФА, б – 1) ТЭА, сера элементарная, морфолин, ДМФА; 2) ДМФА, гидразингидрат, в – метанол, соответствующий альдегид R<sup>1</sup>.

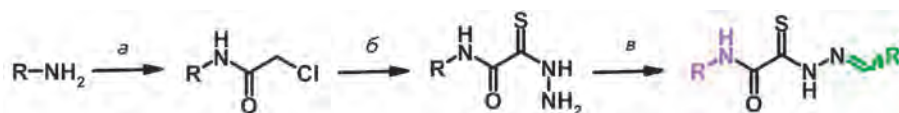




Таблица 1. Показатели токсичности отобранных соединений – тиогидразонов тиогидразидов оксаминовых кислот

№ соединения	Структура	Окрашивание метиленовым синим, % погибших клеток			Кальцеиновый тест, % погибших клеток			МТТ-тест, % метаболически неактивных клеток		
		12.5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ	12.5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ	12.5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ
1		0±2	12±2	23±2	0±2	11±2	20±2	3±1	12±3	29±3
2		2±2	13±1	24±3	3±2	12±1	21±3	3±2	15±1	31±5
3		6±4	20±2	27±2	5±4	16±2	23±2	2±2	15±5	30±4
4		5±1	15±2	28±2	6±1	12±2	23±2	3±3	13±4	28±2
5		2±1	14±2	26±3	3±1	16±2	22±3	4±3	20±4	29±6
6		2±1	15±2	26±2	5±1	12±2	24±2	2±4	17±5	27±8
7		2±2	15±4	29±5	4±2	16±4	22±5	4±5	18±3	29±9
8		2±1	14±1	24±4	6±1	12±1	24±4	3±3	15±3	28±4
9		2±1	12±1	24±4	4±1	15±1	25±4	4±5	20±4	30±4
10		2±1	12±2	24±2	5±1	14±2	22±2	3±3	19±3	31±7
11		1±1	12±1	21±4	4±1	13±1	25±4	5±1	16±2	30±5
12		0±1	11±1	22±3	3±1	10±1	24±3	5±5	15±4	29±6
13		2±1	15±2	26±3	2±1	11±2	25±3	5±4	14±3	29±7
14		4±1	15±1	25±4	3±1	12±1	22±4	3±5	17±3	28±6
15		0±1	11±2	22±3	0±1	10±2	21±3	4±1	13±3	29±5

были выбраны три. Оказалось, что в сухом виде эти соединения длительное время оставались стабильными (по данным ТСХ), тогда как в растворах их активность быстро падала.

При анализе опубликованных данных [18, 19] было установлено, что для тиогидразонов характерно наличие кольчато-цепной таутомерии. Циклические тау-

томеры (тиадиазолины **II**) легко окисляются под действием кислорода воздуха, в результате образуются неактивные и токсичные тиадиазолы **III** (рис. 4).

Данные предположения были подтверждены экспериментально путем синтеза предполагаемых тиадиазолов и ЯМР-исследованиями растворов тиогидразонов оксаминовых кислот. Установлено,

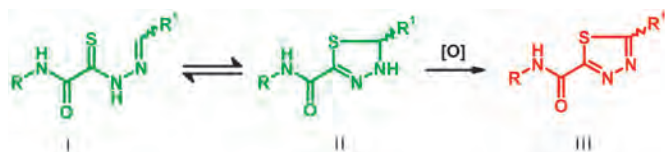


Рис. 4. Кольчато-цепная таутомерия тиогидразонов и продукт окисления – триадиазол.

что в растворах тиогидразонов действительно присутствует и циклическая, и линейная формы, а продукты окисления в растворах идентичны направленно синтезированным триадиазолам.

Внимание обращали не только на стабильность, но и на результаты МТТ-теста, которые указывали на довольно высокую токсичность данных соединений, обусловленную подавлением дыхательной активности клетки, а также нарушением ее окислительно-восстановительного потенциала. Анализ опубликованных данных позволил предположить, что на токсичность влияет открытая и довольно активная тиокарбонильная группа, которая связывается с восстановленным глутатионом и приводит к развитию окислительного стресса. Эта гипотеза была подтверждена в опытах с добавлением глутатиона к культуральной среде, в которых наблюдали снижение токсичности на 30–40%.

Таким образом, необходимо было повысить стабильность и понизить токсичность полученных соединений так, чтобы это не отразилось на их активности и специфичности воздействия.

**Модификация тиогидразонов с целью повышения стабильности и снижения токсичности**

Для повышения стабильности и снижения токсичности тиогидразонов нужно было модифицировать

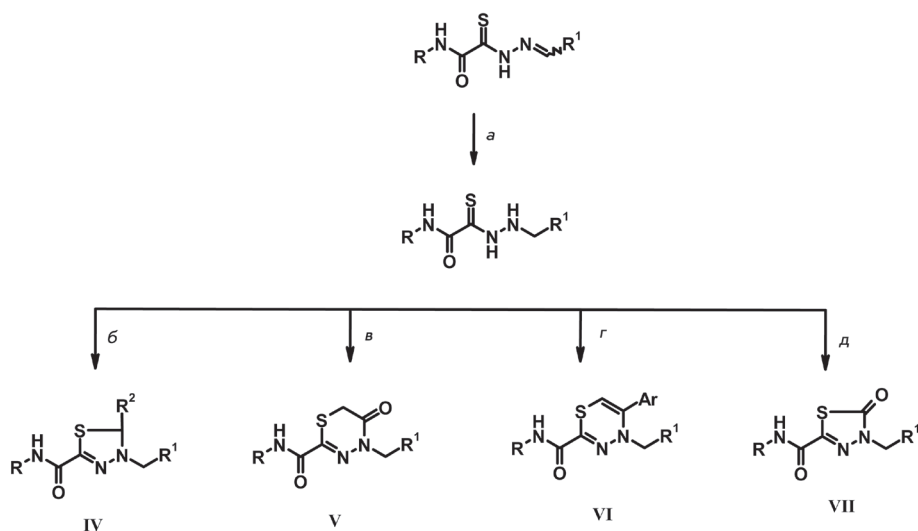


Рис. 5. Получение различных гетероциклических соединений, исключая наличие таутомерии и содержащих закрытую тиокарбонильную группу: а – боргидрид натрия, метанол, б – альдегид R<sup>2</sup>, изо-пропанол, соляная кислота, в – хлоруксусная кислота, изо-пропанол, ацетат аммония, г – этанол, α-бромкетон, ацетат натрия, д – карбонилдиимидазол, тетрагидрофуран.

Таблица 2. Ингибирование внутриклеточного развития *C. trachomatis* под действием тестируемых соединений

№ соединения	Ингибирование развития <i>C. trachomatis</i> (% подавления инфекции) при различных концентрациях ингибитора, мкМ		
	12.5	25	50
1	30±4	99±7	100±1
2	70±5	98±3	100±1
3	1±1	30±6	60±5
4	5±2	10±5	60±11
5	0±1	10±3	75±6
6	20±4	40±5	90±12
7	15±3	85±8	100±2
8	5±3	10±5	90±13
9	30±8	40±7	90±10
10	0±2	10±7	98±3
11	10±2	90±7	100±1
12	0±1	70±15	100±3
13	15±5	70±14	100±15
14	15±4	45±7	100±3
15	40±3	85±8	100±2

их структуру таким образом, чтобы исключить образование таутомерных форм и открытой реакционноспособной тиокарбонильной группы.

Данная задача была решена путем синтеза нескольких гетероциклических соединений на основе восстановленных тиогидразонов согласно схеме, приведенной на рис. 5.

Синтезированные гетероциклические производные тиогидразонов оксаминовых кислот обладали

Таблица 3. Показатели токсичности триазинов

№ соединения	Структура	Окрашивание метиленовым синим, % погибших клеток			Кальцеиновый тест, % погибших клеток			МТТ-тест, % метаболически неактивных клеток		
		12.5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ	12.5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ	12.5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ
16		0±2	5±2	10±2	0±1	6±2	12±3	1±2	8±3	13±3
17		0±2	6±1	11±3	0±3	7±2	10±3	0±2	9±3	14±4
18		0±1	4±2	9±2	0±2	8±1	12±3	0±1	9±2	15±3
19		0±1	6±2	11±2	0±1	5±1	13±4	0±1	8±3	13±3
20		0±1	5±2	12±3	0±2	6±2	14±2	0±1	8±3	14±4
21		0±1	6±2	9±2	0±1	7±2	12±3	0±1	9±3	14±3
22		0±2	5±4	10±5	0±3	6±3	12±4	1±2	8±3	15±4
23		0±2	7±1	12±4	0±1	6±2	13±3	0±2	9±3	14±5
24		0±1	4±1	10±4	0±1	6±1	14±3	0±1	10±3	17±4
25		0±3	6±2	11±2	0±2	7±2	12±3	1±3	9±2	14±3
26		0±1	7±1	12±4	0±2	6±3	13±3	0±1	8±3	14±2
27		0±2	5±1	10±3	0±3	7±2	11±3	1±2	8±3	13±3

большей растворимостью, чем исходные продукты, поэтому оценили их токсичность и способность ингибировать ССТТ. Соединения, относящиеся к группам IV и V, проявили низкую токсичность и показали специфическую активность в отношении ССТТ,

в то время как соединения групп VI и VII подобной активностью не обладали.

Соединения группы IV оказались нестабильными в растворах (по данным ТСХ при хранении растворов при +20°C продукты распада обнаруживались через

Таблица 4. Ингибирование развития *C. trachomatis* в культуре клеток

№ соединения	Ингибирование развития <i>C. trachomatis</i> (% подавления инфекции) при различных концентрациях ингибитора, мкМ		
	12.5	25	50
16	15±5	40±8	87±6
17	24±3	69±6	100±5
18	7±2	26±7	63±6
19	12±3	37±6	65±8
20	9±3	26±7	59±7
21	15±7	42±7	86±10
22	2±4	23±6	52±4
23	34±6	78±8	100±2
24	30±8	69±6	98±4
25	25±5	59±6	95±5
26	24±3	82±9	100±2
27	27±4	65±10	100±2

24 ч). Соединения группы V имели приемлемые показатели. На основе фторсодержащих тиогидразонов оксаминовых кислот было синтезировано 12 соединений группы V.

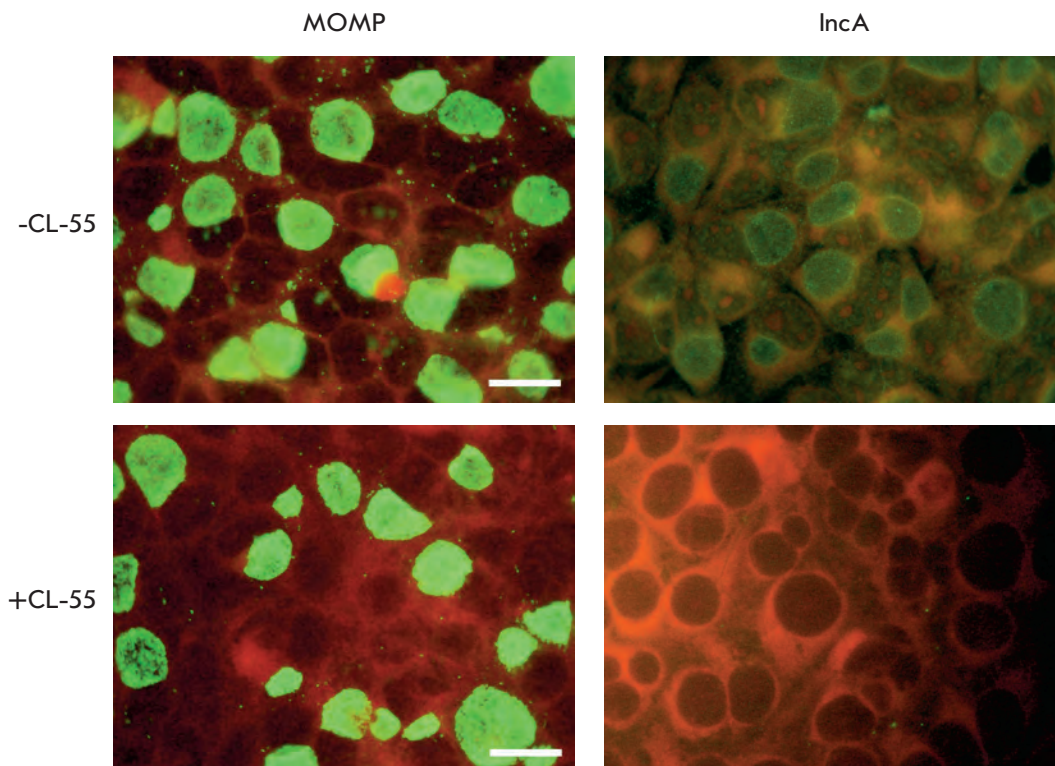
Все эти соединения были значительно менее токсичными в отношении эукариотических клеток, чем известные и полученные нами ранее ингибиторы ССТТ (табл. 3).

Показано, что синтезированные нами тиадиазины дозозависимо подавляют развитие внутриклеточной инфекции. Четыре соединения в концентрации 50 мкМ полностью подавляли инфекционный процесс в культуре клеток (табл. 4). Сравнение результатов определения токсичности и активности позволило выбрать одно наиболее эффективное соединение. Это соединение, названное CL-55, использовали для дальнейшего более детального изучения биологических свойств.

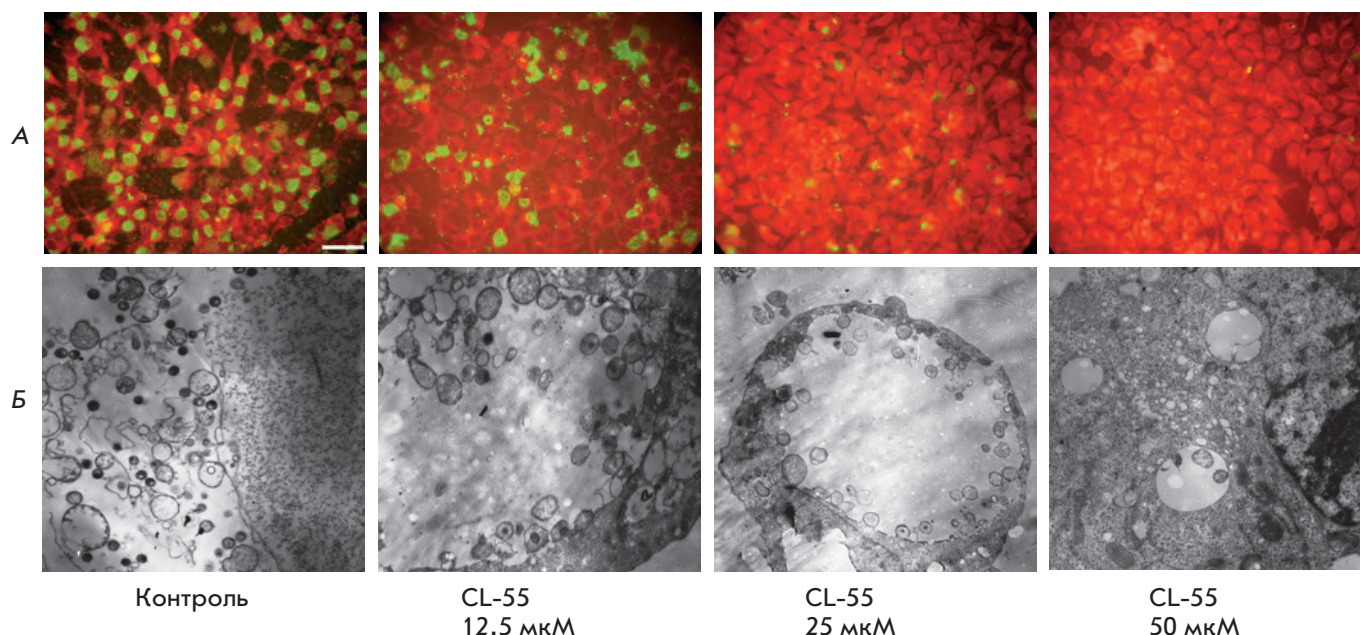
#### Подавление эффекторной функции ССТТ синтезированным ингибитором

Специфическую активность химических соединений, т.е. их способность ингибировать функции третьей транспортной системы (ССТТ), изучали с использованием метода, основанного на детекции эффекторного белка *C. trachomatis*. Одним из эффекторных белков этого патогена является белок IncA, который синтезируется в бактериальной клетке, а затем секре-

Рис. 6. Подавление транслокации эффекторного белка *C. trachomatis* IncA в мембрану внутриклеточного включения при действии ингибитора ССТТ CL-55. Клетки McCoу инфицировали *C. trachomatis*, через 8 ч в культуральную среду вносили CL-55 в концентрации 50 мкМ и культивировали в течение еще 24 ч. Хламидийные включения окрашивали антителами к белку наружной мембраны *C. trachomatis* МOMP или к белку IncA и просматривали в люминесцентном микроскопе (зеленое свечение). Масштабная линейка – 20 мкм.







**Рис. 7.** Дозозависимое ингибирование внутриклеточного цикла развития *C. trachomatis* при действии CL-55. А – Люминесцентная микроскопия после окрашивания антителами к белку МОМР *C. trachomatis*. Масштабная линейка – 10 мкм. Б – Трансмиссионная электронная микроскопия. Увеличение: контроль  $\times 4000$ , CL-55 (12.5 мкМ)  $\times 10000$ , CL-55 (25 мкМ)  $\times 4000$ , CL-55 (50 мкМ)  $\times 10000$ .

тируется и встраивается в мембрану хламидийного включения. Известно, что этот белок синтезируется через 6 ч после начала инфекции, а через 8 ч появляется на поверхности включения. В составе мембраны включения белок IncA можно обнаружить с помощью специфических антител. На рис. 6 показано подавление транслокации эффекторного белка IncA ССТТ *C. trachomatis* выбранным ингибитором. Окрашивание клеток антителами к белку наружной мембраны хламидий (МОМР) выявляет мелкие включения, размер которых коррелирует со сроками инфекции.

Другой тест, позволяющий оценить специфичность соединений в отношении ССТТ, основан на том, что транслоцируемый с помощью ССТТ хламидийный белок IncA участвует в процессе слияния отдельных включений, развивающихся внутри клетки. Окрашивание инфицированных клеток антителами к белку МОМР показало, что при внесении через 8 ч после заражения соединения, действующего на ССТТ, в цитоплазме образуются несколько мелких, не слившихся включений, тогда как в контрольных клетках наблюдали крупные включения, по одному в каждой клетке (рис. 6).

#### **Влияние ингибитора ССТТ на морфологию внутриклеточных включений *C. trachomatis***

Влияние ингибитора ССТТ, CL-55, на внутриклеточное развитие возбудителя изучали с помощью люми-

несцентной и электронной микроскопии. Культуру клеток McCoу инфицировали *C. trachomatis*, одновременно в среду культивирования вносили ингибитор в разных концентрациях (12.5, 25 и 50 мкМ). Через 48 ч клеточные культуры анализировали иммунофлуоресцентными методами и с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

Действие соединения CL-55 на внутриклеточное развитие хламидий выражалось в снижении количества инфицированных клеток, а также размера включений. Уже в дозе 12.5 мкМ число включений составляло 80% от контроля, при этом сами включения были мельче. Концентрация CL-55, равная 25 мкМ, приводила к подавлению накопления хламидий на 50%. Средний размер включений был в несколько раз меньше, чем в контроле. При использовании CL-55 в дозе 50 мкМ полноценные включения практически отсутствовали (рис. 7).

Электронно-микроскопическое исследование клеток выявило снижение размера включений, а также значительное уменьшение количества бактерий, находящихся внутри одного включения. Кроме того, следует отметить, что в контроле наблюдалась характерная картина завершения жизненного цикла хламидий: подавляющее большинство хламидий внутри включений были представлены внеклеточными формами – элементарными тельцами, часть включений была разрушена. При действии ингиби-

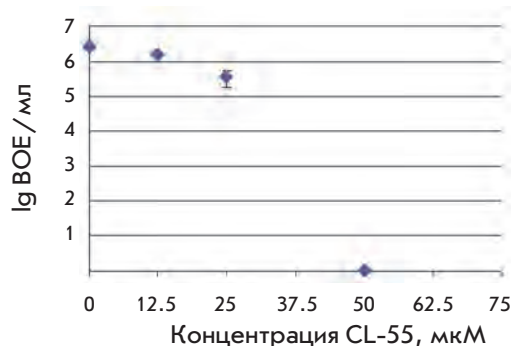


Рис. 8. Подавление жизнеспособности *C. trachomatis* после воздействия CL-55 в разных концентрациях.

тора ССТТ внутриклеточные хламидии находились в состоянии ретикулярных телец. При концентрации 50 мкМ в клетках наблюдались единичные очень мелкие включения, содержащие аномальные бактериальные клетки. Тем самым было показано, что выбранный ингибитор ССТТ дозозависимо подавлял внутриклеточное размножение *C. trachomatis*.

#### Влияние соединения CL-55 на жизнеспособность *C. trachomatis*

Влияние ингибитора ССТТ на развитие хламидий оценивали также полуколичественным методом определения инфекционных свойств патогена в условиях *in vitro*. Подсчет числа инфекционных частиц *C. trachomatis* после действия разных концентраций ингибитора показал дозозависимое снижение (рис. 8) и полное подавление жизнеспособности в присутствии 50 мкМ CL-55. При этом при меньших концентрациях соединения значительная часть формирующихся включений имела атипичную морфологию. При дальнейшем пассировании не наблюдали образование внутриклеточных включений.

#### Действие соединения CL-55 на экспрессию генов *C. trachomatis*

На данном этапе изучали влияние ингибитора ССТТ на активность конститутивных генов, 16S рРНК и *trpA*, гена триптофанового оперона, а также на экспрессию гена *incA*, кодирующего синтез эффекторного белка, и гена *lcrE* регуляторного белка ССТТ *C. trachomatis*. Ингибитор вносили в момент заражения клеток, а через 24 ч выделяли РНК и анализировали экспрессию генов с помощью количественного варианта ПЦР в реальном времени.

Активность гена 16S рРНК снижалась в 4 раза при использовании соединения в концентрации 25 мкМ и в 29 раз – в концентрации 50 мкМ. В даль-

нейшем все пробы нормировали по кДНК гена 16S рРНК. Активность генов *trpA* и *incA* при действии 25 и 50 мкМ CL-55 не изменялась по сравнению с контролем. Эти данные свидетельствуют, во-первых, об отсутствии выраженного действия ингибитора на метаболизм патогена, а во-вторых, о том, что ингибитор не влиял на экспрессию гена эффекторного белка IncA на уровне транскрипции. В присутствии 50 мкМ ингибитора экспрессия гена *lcrE*, кодирующего белок-регулятор ССТТ, снижалась на 90%. В настоящее время продолжается изучение влияния соединения CL-55 на экспрессию ССТТ-специфичных генов хламидий, с целью понимания механизма действия выбранного ингибитора.

#### Действие ингибитора CL-55 на внутриклеточное развитие других видов хламидий

С помощью описанных выше методов мы оценили влияние выбранного ингибитора ССТТ на внутриклеточное размножение представителей двух других видов семейства Chlamydiaceae: *C. pneumoniae* и *C. muridarum*. Установили универсальность действия ингибитора в отношении других хламидий, так как CL-55 в концентрации 50 мкМ полностью подавлял как внутриклеточное накопление, так и жизнеспособность этих видов хламидий.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Для поиска новых антибактериальных препаратов, эффективных в отношении как острых, так и хронических инфекций, в качестве мишени была выбрана система секреции типа III, найденная только у патогенных бактерий. Этот секреторный аппарат, так называемый «молекулярный шприц», начинает формироваться после контакта с эукариотической клеткой, образует пору в мембране клетки-мишени, после чего факторы патогенности поступают непосредственно в цитоплазму хозяйской клетки [20]. ССТТ функционирует и при внутриклеточной локализации патогена. Транспорт факторов патогенности приводит к реорганизации цитоскелета, блокированию апоптоза, модификации аппарата транскрипции и трансляции эукариотической клетки, модуляции продукции цитокинов и других процессов хозяйской клетки, что способствует инвазии патогена, блокированию защиты хозяина и установлению длительной персистенции [21]. ССТТ абсолютно необходима для развития острого инфекционного процесса, а хронизация инфекции принципиально зависит от ее функционирования. Таким образом, специфическое ингибирование работы ССТТ должно прерывать инфекционный процесс как на ранних стадиях, так и при его хроническом течении, позволяя иммунной системе элиминировать патоген.

Поиск новых эффективных ингибиторов ССТТ мы проводили по следующей схеме. В результате структурного анализа известных ингибиторов ССТТ в молекулах органических соединений разных классов были найдены сходные участки. Это позволило сконструировать новый класс соединений, обладающих антибактериальной активностью, специфичной в отношении ССТТ. Синтезировано значительное число таких соединений, что позволило провести экспериментальный скрининг на клеточных тестах и отобрать из них 15, специфично подавляющих ССТТ хламидий в условиях *in vitro*, с целью изучения соотношения структура–свойство. В дальнейшем проводили химическую модификацию отобранных соединений с целью улучшения их растворимости, стабильности и биологической активности, снижения токсичности для эукариотических клеток, повышения специфической эффективности.

Это позволило получить новый ингибитор ССТТ, относящийся к классу гетероциклических соединений. Это низкомолекулярное соединение блокировало эффекторную функцию ССТТ *C. trachomatis*. Так, после действия CL-55 на мембране хламидийного включения не выявлялся IncA – один из ранних эффекторных белков ССТТ, а также нарушался процесс гомотипичного слияния фагосом, опосредованный данным белком. Анализ экспрессии гена *incA* показал, что при действии ингибитора транскрипция этого гена не снижается. Тем самым можно заключить, что выбранное соединение специфически блокирует процесс транслокации эффекторного белка хламидий.

Соединение CL-55 не оказывало выраженного ингибирующего эффекта на уровень экспрессии конститутивных генов *C. trachomatis*, что соответствует известному механизму действия ингибиторов ССТТ, согласно которому ингибитор действует на функционирование секреторного аппарата, а не на метаболизм бактериальной клетки. При этом наблюдали существенное снижение активности гена одного из ключевых регуляторов ССТТ хламидий – белка CopN. В норме этот ген экспрессируется на всех стадиях внутриклеточного жизненного цикла хламидий. Выполняя функции белка-шаперона, он участвует в контроле секреции белков семейства Inc на ранних этапах внутриклеточного развития, а также регулирует опосредованный ССТТ процесс дифференцировки ретикулярных телец хламидий в элементарные тельца на этапе завершения жизненного цикла. Важно отметить, что сам процесс пролиферации ретикулярных телец зависит от непосредственного контакта с мембраной включения и взаимодей-

ствия с транслоцированными в нее эффекторными белками. Белок CopN, как негативный регулятор, снижает экспрессию основных эффекторов на мембране включения (в том числе IncA) и закрывает канал, препятствуя транслокации других эффекторов ССТТ [22]. Наблюдаемое снижение экспрессии гена, кодирующего этот регуляторный белок, может свидетельствовать о специфическом действии выбранного ингибитора на процесс контроля работы ССТТ хламидий. В настоящее время продолжается изучение влияния ингибитора CL-55 на активность целого ряда генов, контролирующих активность ССТТ *C. trachomatis*.

В связи с тем, что функционирование ССТТ хламидий определяет возможность внутриклеточного развития патогена, специфический ингибитор ССТТ должен нарушать жизненный цикл, блокируя инфекционный процесс как при острой, так и персистентной форме инфекции. Созданный нами ингибитор подавлял размножение трех видов хламидий – *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. muridarum*, на моделях клеточных культур. Это выражалось в изменении морфологии хламидийных включений, нарушении процесса преобразования ретикулярных телец в элементарные тельца, ингибировании инфекционных свойств патогена. Кроме того, нами показано (результаты не представлены), что выбранный ингибитор блокировал секрецию эффекторных белков ССТТ сальмонелл, представителя таксономически неродственной группы патогенных бактерий, что может свидетельствовать об универсальности полученного ингибитора ССТТ. Данное соединение при этом не оказывало бактерицидного эффекта на целый ряд грамотрицательных и грамположительных бактерий, представителей нормальной микрофлоры.

Таким образом, в результате направленного химического синтеза, экспериментального скрининга и химической оптимизации получен новый ингибитор ССТТ, относящийся к классу гетероциклических соединений. Это соединение находится в настоящее время на стадии изучения терапевтической активности на экспериментальных животных и фармакокинетических свойств с целью дальнейшей разработки на его основе антибактериального лекарственного средства, эффективного в отношении острых и хронических форм инфекции. ●

*Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 16.512.11.2248 по заказу Департамента приоритетных направлений науки и технологий Министерства образования и науки Российской Федерации.*



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шинский Г.Э., Мерзляков В.А., Тимофеева С.Б. // Вестн. дерматологии и венерологии. 1999. № 1. С. 11–13.
2. Dean D. // *Drugs Today (Barc.)*. 2009. V. 45. P. 25–31.
3. Bashmakov Y.K., Zigangirova N.A., Pashko Y.P., Kapotina L.N., Petyaev I.M. // *Comp. Hepatol.* 2010. V. 28. P. 3–9.
4. Зигангирова Н.А. 150 лет со дня рождения Н.Ф. Гама-леи: Сб. научных трудов. М.: ООО «Дизайн-студия А4», 2009. С. 49–61.
5. Зигангирова Н.А., Федина Е.Д., Зорина В.В., Борцов П.А., Токарская Е.А., Карягина А.С., Алексеевский А.В., Кра-юшкин М.М., Заякин Е.С., Гинцбург А.Л. // *Журн. микро-биологии, эпидемиологии и инфектологии*. 2009. № 4. С. 71–77.
6. Гинцбург А.Л., Зигангирова Н.А., Зорина В.В. // *Вестник РАМН*. 2008. № 10. С. 34–39.
7. Erhardt M., Namba K., Hughes K.T. // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010. doi: 10.1101/cshperspect.a000299
8. Карягина А.С., Алексеевский А.В., Спирин С.А., Зигангирова Н.А., Гинцбург А.Л. // *Молекуляр. биология*. 2009. Т. 43. № 6. С. 963–983.
9. Felise H.B., Nguyen H.V., Pfuetzner R.A., Barry K.C., Jackson S.R., Blanc M.P., Bronstein P.A., Kline T., Miller S.I. // *Cell Host & Microbe*. 2008. V. 4. P. 325–336.
10. Bailey L., Gylfe A., Sundin C., Muschiol S., Elofsson M., Nordström P., Henriques-Normark B., Lugert R., Waldenström A., Wolf-Watz H., et al. // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. P. 587–595.
11. Tautz L., Bruckner S., Sareth S., Alonso A., Becattini B., Salvesen G.S., Mustelin T. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 10. P. 9400–9408.
12. Kauppi A.M., Andersson C.D., Norberg H.A., Sundin C., Linusson A., Elofsson M. // *Bioorg. Med. Chem.* 2007. V. 15. № 22. P. 6994–7011.
13. Kauppi A.M., Nordfelth R., Uvell H., Wolf-Watz H., Elofsson M. // *Chem. Biol.* 2003. V. 10. P. 241–249.
14. Patani G.A., LaVoie E.J. // *Chem Rev.* 1996. V. 96. № 8. P. 3147–3176.
15. Yang H., Hendricks R.T., Arora N., Nitzan D., Yee C., Lucas M.C., Yang Y., Fung A., Rajyaguru S., Harris S.F., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. № 15. P. 4614–4619.
16. Гинцбург А.Л., Зигангирова Н.А., Токарская Е.А., Зорина В.В. // Патент № 2400471 от 27.09.2010 г. РФ. С07D 213/75, С07D 338/38, С07C 327/56, С07C/225/16.
17. Hagmann W.K. // *J. Med. Chem.* 2008. V. 51. № 15. P. 4359–4369.
18. Зеленин К.Н., Хрусталева В.А., Алексеев В.В., Шарбатян П.А., Лебедев А.Т. // *Химия гетероцикл. соед.* 1982. № 7. С. 904–910.
19. Lempert-Sreter M., Lempert K., Möller J. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1983. V. 1. № 9. P. 2011–2020.
20. Cornelis G.R. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. P. 811–825.
21. Hoare A., Timms P., Bavoil P.M., Wilson D.P. // *BMC Microbiol.* 2008. V. 8. P. 5–16.
22. Delphine S., Beeckman A., Daisy C., Vanrompay G. // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2010. V. 12. P. 17–42.