

## Ингибирование гемолитической активности экзотоксинов *V. Cereus*

<sup>1</sup>Андреева-Ковалевская Ж.И., <sup>2</sup>Чулин А.Н., <sup>1</sup>Нагель А.С., <sup>1</sup>Сиунов А.В., <sup>1</sup>Солонин А.С.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пушкино;  
hemolysin6@gmail.com;

<sup>2</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
РАН, г. Пушкино; pepsylib@bibch.ru

Цитолитические пороформирующие токсины, продуцируемые микроорганизмами внутри организма хозяина, являются основными факторами патогенности и играют главенствующую роль в развитие заболеваний. *V. cereus* продуцирует целый ряд гемолизинов: сфингомиелиназу и цереолизин АВ, цереолизин или гемолизин I, гемолизин BL, гемолизин III, токсин CytK (гемолизин IV), гемолизина II и цереолизинподобный гемолизин. Один из цитолитических порообразующих токсинов *Bacillus cereus* – гемолизин II (HlyII) представляет особый интерес, так как он широко распространен среди бацилл цереусной группы. Ген гемолизина II обнаружен не только в *V. cereus*, который может вызывать диаррейный и эметический синдромы, а также заболевания глаз, маститы и другие болезни, но и в клетках *B. thuringiensis*, являющимся патогенным для насекомых и использующимся для производства инсектицидных препаратов, и в клетках *B. anthracis*, чьи отёчный и летальный токсины участвуют в развитие инфекционного процесса сибирской язвы. Гемолизин II продуцируется бактерией в окружающую среду в форме мономера и, взаимодействуя с клеточными мембранами, олигомеризуется с образованием открытых трансмембранных структур – нанопор, что приводит в итоге к лизису клетки. При заражении макроорганизма бактерией, продуцирующей гемолизин II, может происходить лизис множества клеток, что приводит к нарушению функционирования атакуемых органов и гибели организма хозяина. Таким образом, цитолитическое патогенное действие HlyII на разные клетки и макроорганизмы обусловлено образованием ионпроводящих каналов в клеточных мембранах. В настоящее время отсутствуют эффективные пути защиты организма от действия гемолизинов *Bacillus cereus*. Мы провели поиск веществ-ингибиторов (блокаторов) действия уже секретированного токсина в организм хозяина, чтобы нейтрализовать действие гемолизина II и других токсинов. Нами были отобраны вещества, с разной эффективностью нейтрализующие действие пороформирующего токсина гемолизина II и подобных ему токсинов, оказываемое на эритроциты человека, - это циклодекстрины и низкомолекулярные вещества. В последние годы пристальное внимание исследователей направлено на поиск и использование низкомолекулярных соединений в качестве антимикробных препаратов. Показано, что некоторые производные 1,2,3-триазола проявляют антимикробную и противовирусную активность. Нами было установлено, что 1,2,3-бензотриазол и его производные подавляют действие порообразующих токсинов. Производные 1,2,3-бензотриазола ингибируют гемолиз эритроцитов, вызванный действием гемолизина II, с разной эффективностью. Максимально ингибирует гемолиз 1-гидрокси-7-азобензотриазол до 100% при выраженном концентрационном эффекте. При малых концентрациях HlyII происходит полное подавление гемолиза, а при высоких концентрациях - в 10 раз. 1,2,3-Бензотриазол и 1-гидрокси-бензотриазол хуже ингибировали гемолиз. 1-гидрокси-7-азобензотриазол в основном действует на белок. По-видимому, триазольный фрагмент молекулы 1,2,3-бензотриазола взаимодействует с мембранами эритроцитарных клеток и с самой молекулой токсина, образуя относительно устойчивые комплексы, которые предотвращают пороформирование. Сходный по структуре бензимидазол так же, как и 8-гидроксихинолин не проявляют антигемолитического эффекта. Кроме того, было установлено, что 1,2,3-бензотриазол гораздо слабее блокирует действие гемолизина II на эритроцитарные клетки, чем 1-гидрокси-бензотриазол и 1-гидрокси-7-азобензотриазол, что, по-видимому, объясняется

более высокой устойчивостью образующихся комплексов этих соединений с белками. 1-Гидрокси-7-азобензотриазол проявляет высокий антигемолитический эффект, по сравнению с 1-гидрокси-бензотриазолом, что, по-видимому, объясняется способностью данного соединения взаимодействовать с аминокруппами белков [1] и образовывать более устойчивые комплексы. 1-Гидрокси-7-азобензотриазол оказывает ингибирующее действие на токсины продуцируемые *B.cereus* в культуральную среду, что может указывать на его неспецифическое воздействие на белки. Ингибирующий эффект был подтвержден в экспериментах *in vivo*. Диаметр гептамерной поры гемолизина II составляет около 2 нм при входе в пору и от 1 нм до 1.6 нм вдоль остального стебля. Известно, что ряд низкомолекулярных соединений, также как и производные циклодекстрина, блокируют поры образованные токсинами, вызывая ингибирование гемолиза эритроцитов за счет заполнения внутреннего пространства пор [2]. Можно предположить, что подобными свойствами обладают исследуемые производные 1,2,3-бензотриазола. В ходе этой работы подобраны вещества способные с разной эффективностью нейтрализовать действие пороформирующего токсина гемолизина II и подобных ему токсинов.

#### Литература

1. Carpino, L. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *JACS*. 1993, 115(10): 4397. doi: 10.1021/ja00063a082
2. Nestorovich E.M and Bezrukov S.M. Obstructing Toxin Pathways by Targeted Pore Blockage. *Chem. Rev.* 2012, 112, 6388. dx.doi.org/10.1021/cr300141q