

## РАЗРУШЕНИЕ БИОПЛЕНОК КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ СТАФИЛОКОККОВ КАТИОННЫМ ПЕПТИДОМ ВАРНЕРИНОМ

© 2011 В.П. Коробов, Л.М. Лемкина, Л.Б. Филатова, Т.В. Полюдова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

Поступила 23.06.2011

Показано, что низкомолекулярный катионный пептид варнерин обладает способностью подавлять формирование биопленок *S.epidermidis* 33, при этом его действующие концентрации совпадают с таковыми для бактериальной планктонной культуры. При более высоких концентрациях пептид способен разрушать и сформировавшиеся в течение 24 ч биопленки.

**Ключевые слова:** низкомолекулярный пептид варнерин, биопленка, стафилококки.

Одним из важных биологических свойств коагулозонегативных стафилококков является их выраженная способность к образованию на поверхностях раздела фаз биопленок – фиксированных сообществ микроорганизмов, внедренных в синтезированный ими сложноорганизованный внеклеточный матрикс [9, 19]. Формирование бактериальных пленок на различных медицинских устройствах привело к появлению новых нозологических форм заболеваний – так называемых катетерассоциированных инфекций [4, 8, 14], борьба с которыми осложнена тем, что клеточные компоненты биопленок обладают повышенной устойчивостью к действию антибиотических соединений и факторов специфической и неспецифической противoinфекционной защиты организма человека [10, 16, 18]. Быстрое развитие и диссеминация бактериальных пленок в оккупируемых госпитальных пространствах определяют необходимость поиска эффективных способов подавления пленкообразующих свойств микроорганизмов и разрушения уже образовавшихся биопленок.

Цель настоящей работы – изучение чувствительности биопленок бактерий *S.epidermidis* 33 к низкомолекулярному катионному пептиду варнерину [1], обладающему выраженным литическим действием на планктонные бактерии этого штамма, во многом благодаря активации аутолитических систем атакуемых клеток [2, 20].

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали штамм бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33, полученный из ГНИИСКМБП им. Тарасевича (Москва).

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) варнерина для клеток планктонной культуры *S.epidermidis* 33 определяли в 96-луночных планшетах для иммунологических реакций [3].

В лунки планшета вносили по 100 мкл исследуемого стерильного препарата низкомолекулярного пептида варнерина и готовили ряд последовательных двукратных разведений, после чего в каждую лунку добавляли по 10 мкл суспензии клеток *S.epidermidis* 33, содержащей в 1 мл  $1.5-2.0 \times 10^6$  колониеобразующих единиц (КОЕ/мл). Планшеты инкубировали в течение 16-18 ч при 37°C. МПК варнерина определяли путем сравнения со значением МПК референс-образца с известным количеством пептида.

Для исследования влияния пептида варнерина на формирование биопленок в планшеты для ИФА вносили одновременно суспензию клеток индикаторной культуры ( $10^7$  КОЕ/мл) и варнерин в концентрациях от 0.25 до 256 мкг/мл. После инкубирования при 37°C в течение 24 ч планктонные клетки из лунок удаляли осторожным пипетированием, планшеты трижды промывали 10 мМ фосфатным буфером (рН 7.2) и окрашивали тетразолием MTS [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий, внутренняя соль] для определения количества живых клеток с использованием системы Cell Proliferation Assay (Promega, США) в соответствии с инструкцией фирмы. Детекцию интенсивности окраски проводили на микропланшетном спектрофотометре Benchmark Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 490 нм.

Общую биомассу сформировавшихся биопленок определяли окрашиванием 0.1% раствором генцианвиолета в течение 20 мин, после однократной отмывки не связавшегося красителя 10 мМ фосфатным буфером планшеты высушивали. Экстракцию связавшегося с биопленками красителя проводили этанолом. Количественную оценку этанольных экстрактов осуществляли на микропланшетном спектрофотометре при длине волны 570 нм.

Для получения больших количеств биопленок применяли полистироловые вентилируемые чашки Петри (Meus, Piove di Sacco, Италия). Использовали среду LB, содержащую  $10^7$  КОЕ/мл бактерий *S.epidermidis* 33 с логарифмической фазы роста в качестве инокулума. Чашки выдерживали в термостате при 37°C в течение 24 ч.

Коробов Владимир Павлович, канд. мед. наук, e-mail: korobov@iegm.ru; Лемкина Лариса Марковна, канд. мед. наук, e-mail: l.lemkina@iegm.ru; Филатова Любовь Борисовна, e-mail: filatova@iegm.ru; Полюдова Татьяна Вячеславовна, канд. биол. наук, e-mail: poludova@iegm.ru

Для изучения действия низкомолекулярного катионного пептида варнерина на сформированные в течение 24 ч биопленки в контрольные чашки вносили 10 мМ Трис-НСI (рН 7.2), в опытные – препарат варнерина в указанном выше буфере и инкубировали в течение 4 ч и 24 ч. После окончания инкубации среду удаляли и весь объем ее подвергали центрифугированию при 3000g в течение 15 мин. Супернатант использовали для анализа спектра аутолизингов в ренатурируемом ПААГе [17].

Оставшиеся после инкубации с варнерином и буфером (контроль) биопленки для оценки их биомассы окрашивали генцианвиолетом, а для определения количества живых клеток использовали Cell Proliferation Assay, как указано выше.

Для сравнения действия низкомолекулярного пептида варнерина на биопленки и клетки планктонной культуры *S.epidermidis* 33 последние выращивали на среде LB при 37°C на шейкере Certomat (Sartorius, Германия) до середины логарифмической фазы роста. Бактерии осаждали (10000 g, 10 мин) на центрифуге 3К30 (“Sigma”, Германия), дважды отмывали в том же режиме 0.01 М Трис-НСI буфером (рН 7.2) и ресуспендировали в буфере до плотности  $OD_{600} = 0.5$ , используя для измерений кюветы с длиной оптического пути 1 см. Для активации неспецифических аутолитических процессов к препаратам бактерий добавляли низкомолекулярный пептид варнерин. Инкубацию проб проводили на шейкере Sertomat (“Sartorius”, Германия) при 150 об/мин и 37°C в течение 4 ч с измерением оптической плотности ежечасно на спектрофотометре PD-303 (APEL, Япония) при 600 нм. Для получения растворимой части бактериальных препаратов аликвоты сред культивирования центрифугировали, как указано выше.

Полученные супернатанты опытных и контрольных проб планктонных клеток и биопленок концентрировали на центрифужном концентраторе (Eppendorf, США) в 20 раз для биопленок и в 5 раз для планктонной культуры. В концентратах определяли содержание белка [4] и анализировали содержание в них бактериолитических компонентов, используя ренатурируемый электрофорез в 9% ПААГе, содержащем убитые автоклавированием (0.5 атм, 30 мин) и отмывые дистиллированной водой бактерии *S.epidermidis* 33 (1.6 мг сухого веса/мл геля).

После окончания процедуры разделения гели отмывали дистиллированной водой в течение 30 мин, помещали в ренатурирующий буфер (50 мМ MES-NaOH, рН 6.0 и тритон X-100 0.1%) и инкубировали в течение 16 ч при 37°C. После ренатурации гели промывали водой, окрашивали 0.1% метиленовым синим в 0.01% КОН в течение 1 ч и отмывали от красителя водой до проявления прозрачных зон лизиса импрегнированных в гель бактериальных клеток на синем фоне связавших краситель не лизированных бактерий.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В предварительных экспериментах было проведено сравнение антибактериального действия низкомолекулярного катионного пептида варнерина на клетки планктонной культуры *S.epidermidis* 33 и образованную ими в течение 24 ч биопленку.

Как видно из рис. 1, варнерин в концентрации 4 мкг/мл проявляет выраженное бактериолитическое действие в отношении планктонных клеток индикаторной культуры уже через 2 ч и лишь через 24 ч снижает количество биомассы и живых клеток в биопленках при одновременном внесении пептида и инокулула на 38 и 36.5% соответственно (рис. 2А,Б).

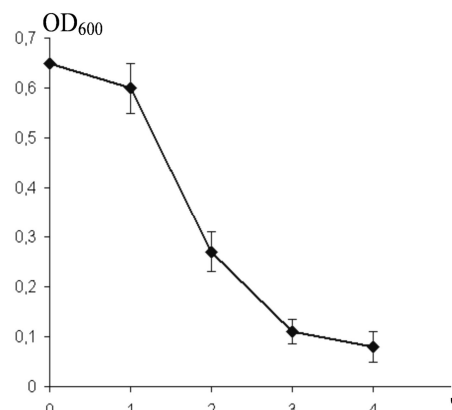


Рис. 1. Лизис планктонной культуры *S.epidermidis* 33 низкомолекулярным пептидом варнерином (4 мкг/мл).

Действия низкомолекулярного пептида варнерина при концентрации 4 мкг/мл на сформированную в течение 24 ч биопленку не обнаружено. Однако при увеличении концентрации пептида от 16 до 128 мкг/мл отмечается снижение уровня биомассы и количества живых клеток в образованных в течение суток биопленках (рис. 3).

Полученные нами результаты согласуются с многочисленными литературными данными о значительной резистентности клеток в биопленках к антибактериальным агентам по сравнению с планктонными формами аналогичных бактерий.[5, 7, 11-13, 15].

В дальнейших экспериментах на биопленках низкомолекулярный пептид варнерин использовали в концентрации 128 мкг/мл.

При сравнении лизирующего действия пептида на планктонные клетки и биопленку отмечено, что через 4 ч контакта с варнерином (4 мкг/мл) количество жизнеспособных клеток в планктонной культуре падает практически до нуля (рис. 4А), тогда как в биопленке в три раза. Причем, число живых клеток в биопленке остается достаточно высоким даже при 24 ч воздействии варнерина (рис. 5Б).

Сравнение энзимограмм после воздействия варнерина на планктонные клетки и биопленки (рис. 4Б и рис. 5В) позволяет обнаружить значительные различия.

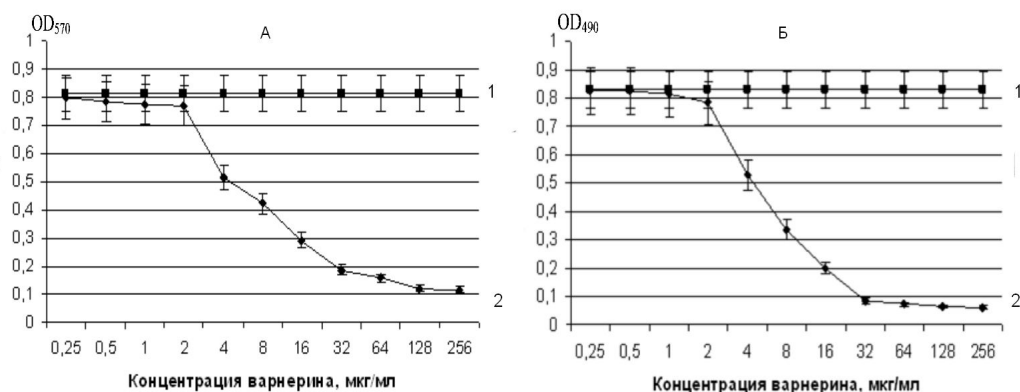


Рис. 2. Действие варнерина на накопление биомассы (А) и жизнеспособность клеточных компонентов (Б) при формировании биопленок *S.epidermidis* 33 (1 – контроль, 2 – варнерин).

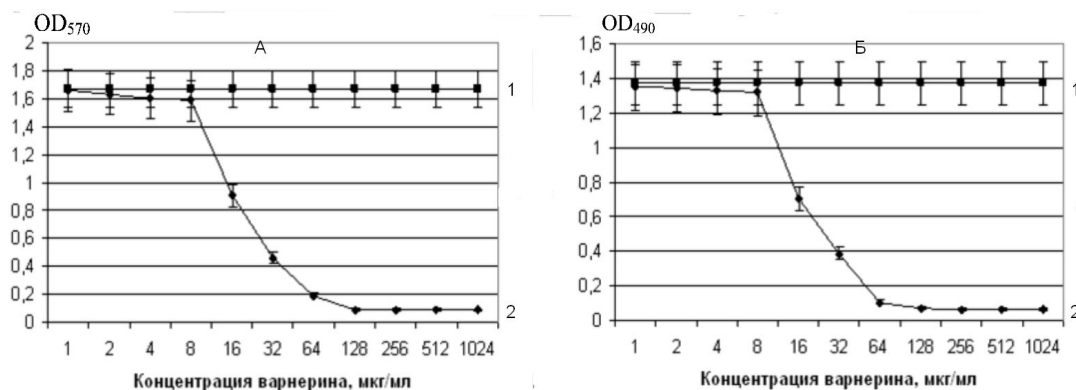


Рис. 3. Действие варнерина на сформированную пленку *S.epidermidis* 33. А – накопление биомассы, Б – жизнеспособность клеточных компонентов (1 – контроль, 2 – варнерин).

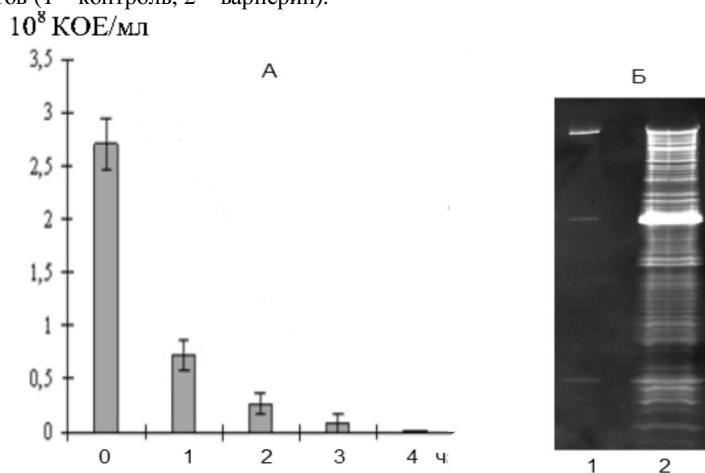


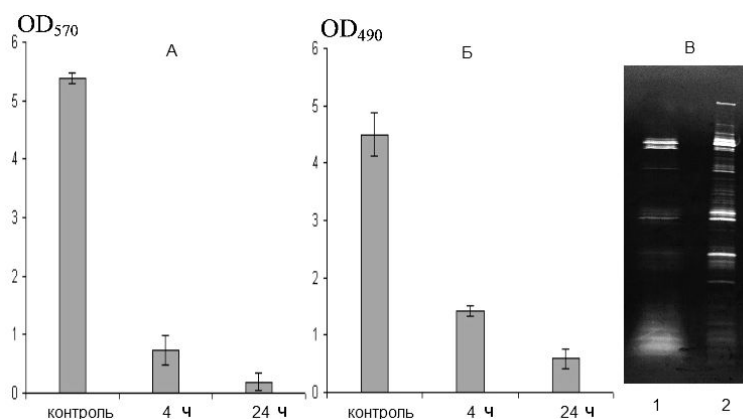
Рис. 4. Действие низкомолекулярного пептида варнерина (4 мкг/мл) на планктонную культуру *S. epidermidis* 33. А – КОЕ/мл, Б – энзимограмма аутолитических ферментов после 4 ч действия пептида варнерина

Важно отметить, что сам варнерин не обладает какой-либо ферментативной активностью, и это позволяет предположить опосредованность его действия за счет проявления им детергентных свойств и активации аутолитических систем бактериальных клеток [2].

Действительно, как показал энзимографический анализ, супернатанты препаратов планктонных клеток и биопленок *S.epidermidis* 33, обработанных варнерином, характеризуются гетерогенными спектрами аутолизингов, в составе которых обнаружи-

ваются общие группы расщепляющих бактериальные стенки ферментов.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что низкомолекулярный катионный пептид варнерин обладает выраженным активирующим действием на аутолитические системы как планктонных клеток, так и биопленок бактерий *S.epidermidis* 33. Это является подтверждением перспектив использования пептида для разработки новых антибактериальных препаратов против стафилококковых инфекций, в том числе, обусловленных образованием биопленок.



**Рис. 5.** Действие низкомолекулярного пептида варнерина (128 мкг/мл) на биопленки *S.epidermidis* 33, сформировавшиеся в течение 24 ч: А – биомасса, Б – жизнеспособные клетки, В – выход аутолизинов (1 – 10 мМ Трис-НС1, 2 – варнерин).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В. Продукция антибактериального фактора широкого спектра действия клетками *Staphylococcus warneri* // Доклады РАН. 2003. Т. 390. № 5. С. 703-705.
2. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В., Акименко В.К. Выделение и характеристика нового низкомолекулярного антибактериального пептида семейства лантибиотиков // Микробиология. 2010. Т. 79. № 2. С. 228-238.
3. Коробов В.П., Полюдова Т.В., Филатова Л.Б. и др. Активация аутолитической активности бактерий *S.epidermidis* 33 низкомолекулярным катионным пептидом варнерином // Микробиология. 2010. Т. 79. № 1. С. 133-135.
4. Сидоренко С.В. Роль бактериальных биопленок в патологии человека // Инфекции в хирургии. 2004. Т. 2. № 3. С. 16-20.
5. Anwar H., Strap J.L., Costerton J.W. Eradication of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with tobramycin and cephalixin. // Can. J. Microbiol. 1992. V. 38. P. 618-625.
6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248-254.
7. Ceri H., Olson M.E., Stremick C. et al. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms // J. Clin. Microbiol. 1999. V. 37. P. 1771-1776.
8. Cho B.G., Kim C.H., Lee B.K., Cho. S.H. Comparison of antibiotic resistance of blood culture strains and saprophytic isolates in the presence of biofilms, formed by intercellular adhesion (*ica*) gene cluster in *Staphylococcus epidermidis* // J. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 15. P. 728-733.
9. Davey M.E., O'toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. V. 64 (4). P. 847-867.
10. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // Clin. Microbiol. Rev. 2002. V. 15. P. 167-193.
11. Dunne W.M. Evaluating adherent bacteria and biofilm using biochemical and immunochemical methods // Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications. N.Y., 2000. P. 273-284.
12. Dunne W.M., Mason E.O., Kaplan S.L. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm // Antimicrob. Agents. Chemother. 1993. V. 37. P. 2522-2526.
13. Gilbert P., Brown M.R.W. Mechanisms of the protection of bacterial biofilms from antimicrobial agents // Microbial biofilms. N.Y., 1993. P. 118-130.
14. Kiem S., Oh W.S., Peck K.R. et al. Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. // J. Kor. Med. Sci. 2004. V. 19. P. 779-782.
15. Konga K.-F., Vuonga C., Ottoa M. *Staphylococcus quorum* sensing in biofilm formation and infection // J. Med. Microbiol. 2006. V. 296. P. 133-139.
16. Lewis K. Riddle of Biofilm // Resistance Antimicrobial agents and Chemotherapy. 2001. V. 45/ N. 4. P. 999-1007
17. Mani N., Tobin P., Jayaswal R.K. Isolation and characterization of autolysis-defective mutants of *Staphylococcus aureus* created by Tn917-lacZ mutagenesis // J. Bacteriol. 1993. V. 75. № 5. P. 1493-1499.
18. Stewart P.S., McFeters G.A., Huang C.T. Biofilm control by antimicrobial agents. // Biofilms II: Process Analysis and Applications. N. Y., 2000. P. 373-405.
19. Vuong C., Gerke C., Somerville G.A. et al. Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis* // J. Infect. Dis. 2003. V. 188. P. 706-718.
20. Xavier J.B., Picioreanu C., Rani S.A. et al. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix – a modelling study // Microbiology. 2005. V. 151. P. 3817-3832.

### DESTRUCTION OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCAL BIOFILMS BY CATIONIC PEPTIDE WARNERIN

© 2011 V.P. Korobov, L.M. Lemkina, L.B. Filatova, T.V. Poludova

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of RAS, Perm

It is demonstrated that low-molecular weight cationic peptide warnerin possesses the ability to suppress the *S. epidermidis* 33 biofilm formation, while its concentrations applied are coincident with those for planktonic culture bacteria. Using higher peptide concentrations it is possible to destruct already formed biofilms (within 24 h).

**Key words:** low-molecular weight peptide warnerin, biofilm, staphylococci.

Korobov Vladimir Pavlovich, Candidate of Medicine, e-mail: korobov@iegm.ru; Lemkina Larisa Markovna, Candidate of Medicine, e-mail: l.lemkina@iegm.ru; Filatova Ljubov Borisovna, e-mail: filatova@iegm.ru; Poludova Tatiana Vyacheslavovna, Candidate of Biology, e-mail: poludova@iegm.ru.