

УДК 615.281.9

ДЕЗОРГАНИЗАЦИЯ РИБОСОМ И ДРУГИЕ ЭФФЕКТЫ ИСКУССТВЕННОЙ РНКазы DL₄12 В КЛЕТКАХ *Salmonella enterica*

© 2025 г. А. Е. Григорьева¹, А. В. Тупицына¹, Е. С. Рябова¹, А. В. Бардашева¹,
Д. А. Задворных¹, Л. С. Королева¹, В. Н. Сильников¹, Е. И. Рябчикова^{1,*}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: lenryab@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.07.2024 г.

После доработки 24.10.2024 г.

Принята к публикации 10.11.09.2024 г.

Синтезирован катионный амфифил DL₄12, обладающий рибонуклеазной активностью (D — DABCO (1,4-диазабисцикло[2.2.2]октан); L₄ — тетраметиленовый линкер; 12 — додецильный остаток) и выраженными антибактериальными свойствами. Суспензию клеток *Salmonella enterica* ATCC 14028 инкубировали в 5 мкМ растворе DL₄12 в течение 15 и 30 мин или 5 мкМ растворе ципрофлоксацина (препарат сравнения), интактные клетки служили контролем. Образцы фиксировали 4%-ным формальдегидом и 1%-ным OsO₄ или по методу Райтера-Келленберга 1%-ным OsO₄ с постфиксацией 0.5%-ным ацетатом уранила, после чего обезвоживали и заключали в смесь эпоксидных смол. Полученные ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе Jem 1400. После 15 мин инкубации с соединением DL₄12 в клетках *S. enterica* исчезли видимые рибосомы по всей площади цитоплазмы. В периплазматическом пространстве появилось гомогенное вещество средней электронной плотности, способное проникать в цитоплазму, в которой появлялись полиморфные включения. Выраженные изменения ультраструктуры наблюдались в нуклеоидах бактерии: они округлялись, нити ДНК “слипались” в пучки. При этом структура внешней мембраны не изменялась. Выявленные изменения структуры *S. enterica* не различались при разных способах фиксации и были обусловлены сочетанием рибонуклеазной активности и амфифильных свойств DL₄12. Такие изменения не описаны в научной литературе. В работе впервые визуализированы эффекты воздействия рибонуклеазы и амфифильного компонента DL₄12.

Ключевые слова: искусственная РНКаз, катионный амфифил, *Salmonella enterica*, дезорганизация рибосом, структура нуклеоида

DOI: 10.31857/S0555109925020025 **EDN:** ENLWCL

Антибактериальные соединения (АБС), основной мишенью которых являются рибосомальная РНК, хорошо известны в течение нескольких десятилетий. Первыми представителями этого класса антибиотиков были аминогликозиды, состоящие из положительно заряженных амино-олигосахаридов, которые, взаимодействуя с отрицательно заряженным остовом прокариотической рибосомальной РНК, блокируют синтез белка [1]. Впоследствии были обнаружены и другие антибиотики, механизм действия которых основан на связывании с рибосомальной РНК, что приводит к нарушению “работы” рибосом [2].

Ранее был предложен принципиально новый класс соединений, обладающих антибактери-

альной активностью, одной из молекулярных мишеней которых является РНК [3]. Данные соединения представляют собой катионные амфифилы, обладающие рибонуклеазной активностью. Соединение DL₄12 (рис. 1) в экспериментах *in vitro* показало высокую противовирусную и антибактериальную активность [4, 5] и послужило объектом дальнейших исследований [6].

Механизмы антибактериального действия катионных амфифилов были детально описаны ранее [7, 8], тогда как воздействие на микроорганизмы соединений, обладающих рибонуклеазной активностью, не изучено.

Были исследованы ультраструктурные особенности повреждающего действия соединения

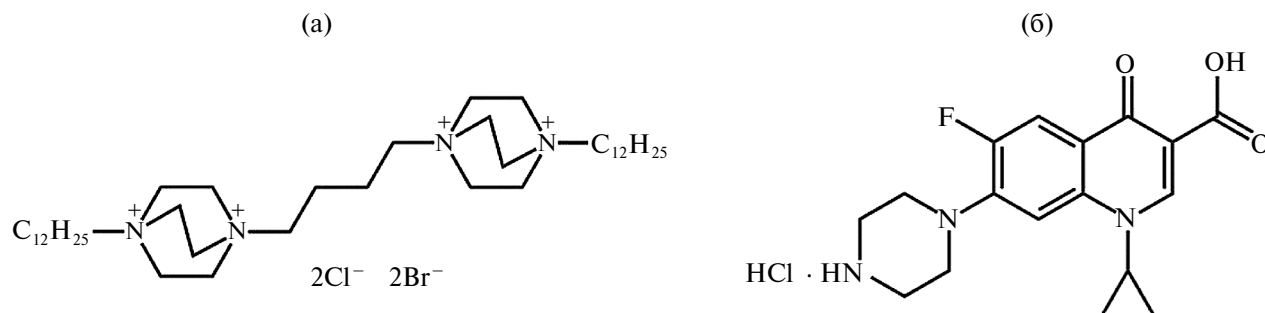


Рис. 1. Химическая структура катионного амфифила DL₄12 (а, D — DABCO (1,4-диазабицикло[2.2.2]октан), L₄ — тетраметиленовый линкер, 12 — додецильный остаток) и ципрофлоксацина (б).

DL₄12 на клетки грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) ультратонких срезов [6]. Первой мишенью соединения DL₄12 являлась клеточная стенка *S. aureus*, которая разрыхлялась, ее толщина увеличивалась вдвое. Очевидно, что эти изменения обусловлены амфифильными свойствами DL₄12, поскольку стенка не содержит молекул РНК. Далее нарушалась морфология цитоплазмы *S. aureus*, которая становилась бесструктурной, рибосомы не выявлялись; формировались полиморфные включения. Развитие комплекса изменений, по-видимому, связано с сочетанным действием амфифильной и рибонуклеазной составляющих соединения DL₄12. Для подтверждения специфичности морфологических изменений клеток *S. aureus*, вызванных DL₄12, был использован препарат сравнения — ципрофлоксацин, при инкубации с которым в клетках *S. aureus* развивались принципиально иные морфологические изменения [6]. Мишенью ципрофлоксацина, как известно, является ДНК-гираза [9], однако, помимо очевидного снижения интенсивности деления, в клетках не наблюдалась перегорodka деления, препарат вызывал также значительное повреждение мембраны клеток *S. aureus*.

Цель настоящего исследования — изучение ультраструктурных характеристик воздействия соединения DL₄12 на клетки грамотрицательной бактерии *Salmonella enterica*.

МЕТОДИКА

Антибактериальные соединения (АБС). Катионный амфифил DL₄12, где D — DABCO (1,4-диазабицикло[2.2.2]октан), L₄ — тетраметиленовый линкер, 12 — додецильный остаток (рис. 1) его синтез, химические свойства, антибактериальные и противовирусные свойства были описаны ранее [4, 5, 10]. Ципрофлоксацина гидрохлорид (“Zhejiang Guobang Pharmaceutical”, Китай) использовали в качестве препарата сравнения.

Стоковые растворы АБС готовили в концентрации 20 мМ в диметилсульфоксиде (ДМСО, “Serva”, Германия). Для инкубации с бактериями стоковые растворы разводили катион-сбалансированным бульоном Мюллера-Хинтона (МХБ, “Thermo Fisher Scientific”, Великобритания) в соотношениях, указанных в соответствующих разделах работы.

Штамм *S. enterica* ATCC 14028 получен из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Россия).

В соответствии с целью работы было изучено изменение жизнеспособности клеток *S. enterica* при инкубации с АБС для определения параметров подготовки образцов для исследований в ПЭМ. Для этого культуру *S. enterica*, выращенную на агаризованной среде LB (“Difco”, Великобритания), засеивали в МХБ и культивировали в шейкере-инкубаторе в течение ночи при 37°C и 180 об./мин (ES-20, “BIOSAN”, Латвия), затем концентрацию клеток доводили МХБ до 1×10^7 КОЕ/мл. Полученную суспензию клеток смешивали с исследуемыми соединениями, разведенными в МХБ (конечные концентрации составили 5, 10, 50 и 100 мкМ) и инкубировали при 37°C. Образцы (по 100 мкл) отбирали через 5, 15 и 45 мин и высевали на агаризованную среду LB для подсчета выросших колоний [11]. В качестве контроля использовали 1%-ный раствор ДМСО. По результатам изучения жизнеспособности *S. enterica* при разных концентрациях АБС (табл. 1) были определены рабочие концентрации DL₄12 и ципрофлоксацина: 5 мкМ. Период инкубации с АБС для подготовки образцов для ПЭМ (15 и 30 мин) был определен на основе предыдущих исследований [6].

Для исследования в ПЭМ культуру *S. enterica*, выращенную на агаризованной среде LB, засеивали в среду МХБ и культивировали в течение ночи при 37°C и 180 об./мин, концентрацию клеток доводили МХБ до 1×10^7 КОЕ/мл. В пластиковые пробирки (50 мл) вносили 25 мл суспензии клеток

Таблица 1. Изменения жизнеспособности *S. enterica* в бульоне Мюллера-Хинтона при инкубации с DL₄12 и ципрофлоксацином (данные приведены в lgKOE/мл)

Время, мин	Изменение жизнеспособности								Контроль
	ципрофлоксацин, мкМ				DL ₄ 12, мкМ				
	100	50	10	5	100	50	10	5	
5	7.2 ± 0.2	7.2 ± 0.2	6.9 ± 0.1	7.2 ± 0.1	6.5 ± 0.2	6.5 ± 0.6	7.2 ± 0.1	7.4 ± 0.2	7.5 ± 0.3
15	6.6 ± 0.6	5.9 ± 0.1	6.3 ± 0.6	5.9 ± 0.2	5.2 ± 0.2	5.2 ± 1.2	7.1 ± 0.2	7.2 ± 0.1	7.5 ± 0.1
45	6.5 ± 0.1	6.1 ± 0.2	5.5 ± 0.5	5.0 ± 0.2	2.7 ± 0.4	4.1 ± 1.3	6.8 ± 0.1	6.9 ± 0.3	7.6 ± 0.1

S. enterica (10⁷ КОЕ/мл) и добавляли 25 мл раствора АБС в МХБ. Конечная концентрация АБС составила — 5 мкМ (DL₄12 — 4.25 мкг/мл, ципрофлоксацин — 1.84 мкг/мл). Смесь клеток и АБС инкубировали в шейкере-инкубаторе при 37°C и 180 об./мин (ES-20, “BIOSAN”, Латвия) в течение 15 и 30 мин. В качестве контроля служила интактная культура *S. enterica*.

После инкубации с АБС суспензию бактерий фиксировали двумя способами.

1. К образцам добавляли по 1 мл 8%-ного раствора формальдегида (“SPI”, США) для блокирования взаимодействия АБС и клеток бактерий; образцы центрифугировали при 8600 g в течение 10 мин (“Sartorius”, Германия). Супернатант удаляли, осадок переносили в пробирки (2 мл) и центрифугировали при 12000 об./мин в течение 10 мин (“Eppendorf”, Австрия). Супернатант удаляли, осадки фиксировали в 2 мл 4%-ного формальдегида на растворе Хенкса pH 7.2 (“Life Technologies”, США) в течение ночи при температуре 4°C. Затем образцы трижды промывали раствором Хенкса и пост-фиксировали 1%-ным раствором OsO₄ в течение часа.

2. Взаимодействие АБС с бактериями блокировали добавлением к образцам 500 мкл 25%-ного раствора глутаральдегида (“SPI”, США); образцы центрифугировали при 8600 g в течение 10 мин (“Sartorius”, Германия). Супернатант удаляли, осадок переносили в пробирки (2 мл) и центрифугировали при 12000 об./мин в течение 10 мин (“Eppendorf”, Австрия). Супернатант удаляли, осадки фиксировали по модифицированному методу Райтера-Келленбергера [12] в 2 мл 1%-ного OsO₄, разведенного в 0.2 М цитратном буфере, pH 6, в течение ночи при комнатной температуре. Затем осадки трижды промывали цитратным буфером и пост-фиксировали 0.5%-ным раствором уранила ацетата pH 3.0 в течение 2 ч.

Фиксированные по 2 методикам образцы обезжизняли по стандартной схеме и заливали в смесь эпон-аралдит (“Electron Microscopy Sciences”, США), формируя по 2 блока с каждого образца. Серии ультратонких срезов изготавлива-

ли на ультрамикротоме Leica EM UC7 (“Leica”, Германия). Ультратонкие срезы контрастировали растворами цитрата свинца (“EMS”, США) и уранила ацетата (“EMS”, США), и изучали в ПЭМ Jem 1400 (“Japan Electron Optics Laboratory”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Снимки получали с помощью цифровой камеры бокового ввода Veleta (“Electron Microscopy Soft Imaging Solutions”, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ ультраструктурных изменений клеток бактерий с целью установления механизма их повреждения АБС предполагает изучение ранних этапов взаимодействия клеток с повреждающим агентом. Метод ПЭМ обеспечивает возможность исследовать начальные стадии взаимодействия АБС с клетками бактерий [6, 13]. Использование высоких концентраций АБС приводило к стремительным деструктивным изменениям и гибели бактерий, что не позволяло вычленить изменения клеточных структур, отражающие специфику воздействия того или иного АБС. Основываясь на проведенных микробиологических исследованиях [6], в настоящей работе (табл. 1) была выбрана концентрация DL₄12 и ципрофлоксацина — 5 мкМ, продолжительность инкубации АБС с бактериями — 15 и 30 мин.

Клетки бактерий, по существу, состоят из трех основных компонентов: мембранной оболочки, цитоплазмы и нуклеоида. Дополнительной структурой грамположительных бактерий является клеточная стенка на внешней стороне ограничивающей мембраны. У грамотрицательных бактерий оболочка клеток состоит из двух мембран, между которыми расположено периплазматическое пространство, содержащее слой пептидогликанов, который многие авторы идентифицируют как клеточную стенку, исходя из сходства ее состава с клеточной стенкой грамположительных бактерий [14, 15]. Несмотря на “простое” строение, как показала история изучения бактерий, зафиксировать клетки для адекватной визуализации ультраструктуры непросто [12]. В данной работе была использована

фиксация формальдегидом с дофиксацией OsO_4 , поскольку она обеспечивала сохранность всех клеточных структур [12]. Модифицированный метод Райтера-Келленбергера, при котором образцы фиксируют OsO_4 , а затем дофиксируют уранила ацетатом, использовался в качестве дополнительного, для подтверждения полученных результатов. Сравнение разных методов фиксации бактерий не является предметом данного исследования, использование двух методов обусловлено стремлением получить дополнительные доказательства характера выявленных изменений ультраструктуры клеток *S. enterica* под действием соединения DL_412 .

Антибактериальные соединения, внесенные в питательную среду, в большинстве случаев, проникают внутрь клеток, где реализуют свое повреждающее действие. Изучение ультратонких срезов оболочки клеток *S. enterica*, инкубированных с ципрофлоксацином в течение 15 и 30 мин и зафиксированных разными способами, не выявило изменений ультраструктуры внешней и внутренней мембран, а также периплазматического пространства по сравнению с интактными клетками. Проникновение соединения DL_412 в клетки *S. enterica* приводило к появлению в периплазматическом пространстве тонкого слоя гомогенного вещества средней электронной плотности (рис. 2а, 2б), которое чаще наблюдалось на полюсах клеток. Это вещество хорошо визуализируется на фоне электронно-прозрачного содержимого периплазматического пространства при обоих способах фиксации и, видимо, отражает взаимодействие DL_412 с пептидогликанами периплазматического пространства грамотрицательных клеток [14]. Эти изменения аналогичны описанным ранее изменениям клеточной стенки *S. aureus* [6], основой которой являются пептидогликаны [14].

Внешняя мембрана клеточной оболочки *S. enterica* сохраняла целостность на протяжении всего срока инкубации с DL_412 , что наблюдалось при обоих способах фиксации. Внутренняя мембрана “сливалась” с цитоплазмой при фиксации формальдегидом, но четко визуализировалась при фиксации по методу Райтера-Келленбергера. В некоторых участках контакта с гомогенным веществом она деформировалась; участки разрушения мембраны отмечались в области контакта с поверхностью включений, появляющихся под действием DL_412 .

Полиморфные включения в цитоплазме клеток *S. enterica* (рис. 2в–2к) являлись ярким проявлением воздействия DL_412 . Одним из возможных вариантов формирования включений являлось проникновение гомогенного вещества из периплазматического пространства в цитоплазму (рис. 2в–2д). Очевидно, что процесс внедрения DL_412 в цитоплазму был связан с его взаимодействием с компонентами внутренней

мембраны и цитоплазмы. Разнообразие морфологии включений могло отражать взаимодействие DL_412 с разными компонентами цитоплазмы. Наблюдаемое во включениях гомогенное вещество средней электронной плотности при фиксации формальдегидом имело более плотную периферию (рис. 2ж, 2з, 2к), других различий включений при разной фиксации не обнаружено. Увеличение продолжительности инкубации клеток *S. enterica* с соединением DL_412 до 30 мин приводило к возрастанию размеров включений. Следует отметить, что в структуре цитоплазмы *S. enterica*, граничащей с включениями, не наблюдалось видимых отличий от удаленных участков.

В некоторых клетках отмечались включения, сформированные упорядоченными слоями электронно-плотных мембран, образующих структуры, напоминающие гантели (рис. 2л). Данные включения прилегали к внутренней мембране и, вероятно, формировались в результате взаимодействия с соединением DL_412 .

Таким образом, проникновение соединения DL_412 в клетки *S. enterica* приводило к формированию включений в цитоплазме и изменению структуры содержимого периплазматического пространства. В клетках *S. aureus* это соединение вызывало повреждение структуры клеточной стенки с ее последующим разрушением и формирование областей нарушения структуры цитоплазмы вблизи клеточной мембраны [6]. Очевидно, что разные визуальные характеристики нарушений ультраструктуры бактерий отражали разные механизмы взаимодействия соединения DL_412 с грамположительными и грамотрицательными бактериями.

Происходящие при инкубации с DL_412 морфологические изменения клеток *S. enterica* не ограничивались вышеописанными. Соединение DL_412 , обладающее рибонуклеазной активностью, реализовывало ее при взаимодействии с рибосомами и нуклеоидом.

Рибосомы являются мишенью большого числа антибиотиков, действие которых направлено на определенные участки этих органоидов, подавляя, таким образом, синтез белка в клетках бактерий [2, 16]. Рибосомы бактерий были открыты с помощью ПЭМ Джорджем Паладе в середине 1950 гг. и описаны как округлые электронно-плотные частицы размером около 20 нм, заполняющие клетки и сохраняющие морфологию при выделении из клеток [17, 18].

На ультратонких срезах клеток интактной культуры *S. enterica* сферические электронно-плотные рибосомы заполняют цитоплазму (рис. 3а). Толщина ультратонких срезов составляет 60–70 нм, что не позволяет различить субъединицы рибосом, однако, их структура и пространственная организация в 70S рибосоме изучены с помощью

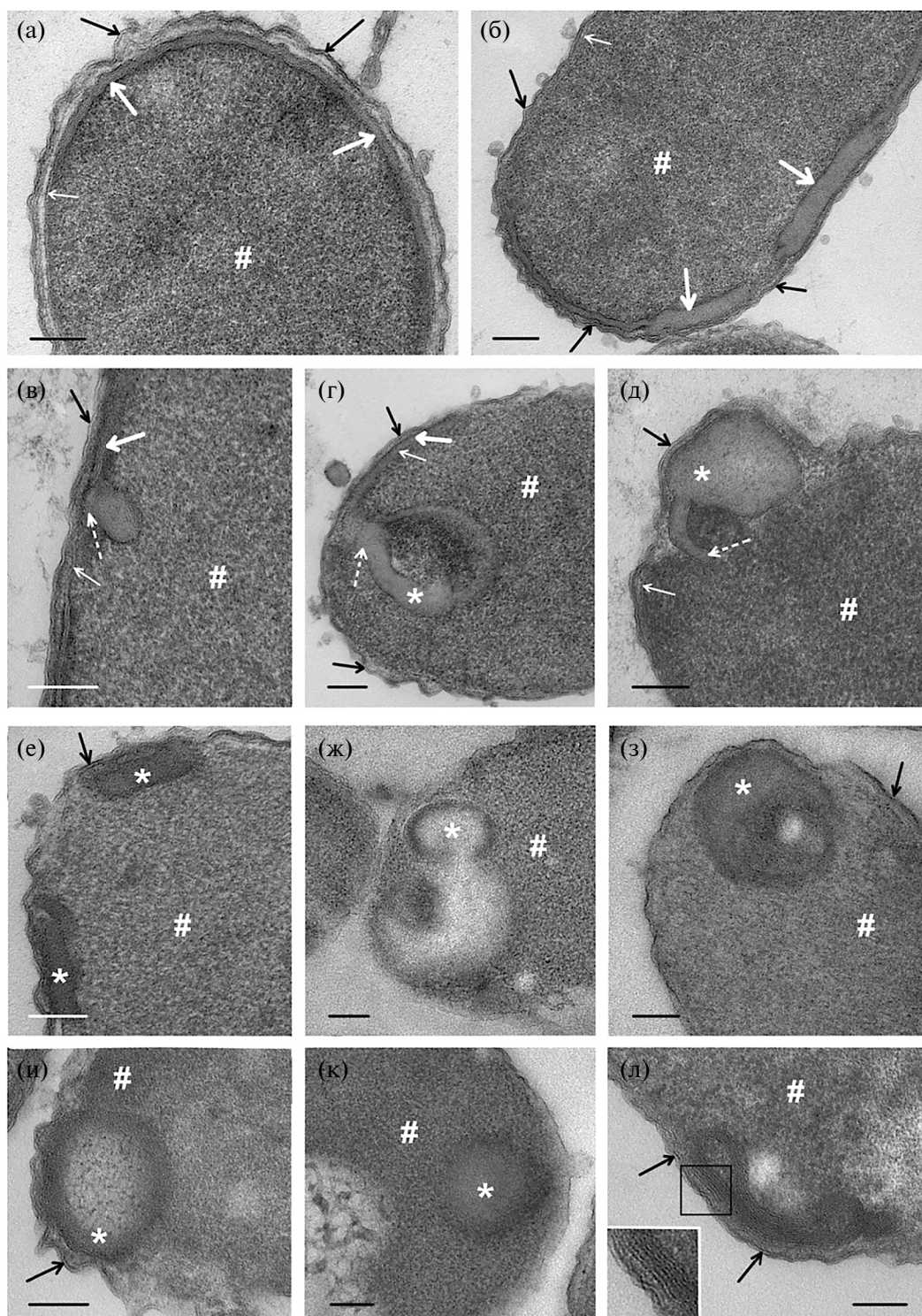


Рис. 2. Изменения ультраструктуры клеток *S. enterica* на ультратонких срезах в ПЭМ после воздействия DL₄12: а, б — гомогенное вещество средней электронной плотности в периплазматическом пространстве; в–д — внедрение гомогенного вещества в цитоплазму и формирование включений; е–л — морфологические варианты включений; л — мембранная структура высокой электронной плотности, рамкой показан увеличенный участок структуры. Черными стрелками показана внешняя мембрана клеточной оболочки; белыми тонкими стрелками — внутренняя мембрана; белыми толстыми стрелками — гомогенное вещество в периплазматическом пространстве; пунктирными стрелками показана связь между гомогенным веществом в периплазматическом пространстве и в цитоплазме; # — цитоплазма; звездочкой — гомогенное вещество в составе включений. Время инкубации с соединением DL₄12 15 мин; а–е, и, л — фиксация по методу Райтера-Келленбергера; ж–з, к — фиксация формальдегидом. Масштаб: 100 нм.

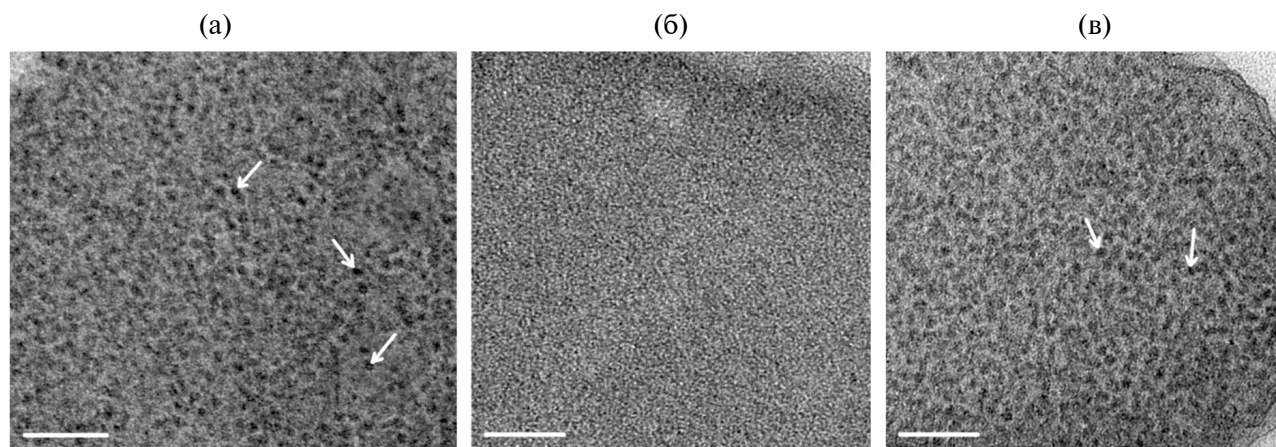


Рис. 3. Цитоплазма клеток *S. enterica* на ультратонких срезах в ПЭМ: а — intactные клетки; б — 15 мин инкубации с DL₄12; в — 15 мин инкубации с ципрофлоксацином. Рибосомы на снимках а и в показаны стрелками, на б — не визуализируются. Фиксация формальдегидом. Масштаб: 100 нм.

криоэлектронной микроскопии, данные которой подтверждают сферическую форму рибосом на ультратонких срезах [19, 20].

Впечатляющим эффектом инкубации *S. enterica* с соединением DL₄12 являлось исчезновение видимых рибосом в цитоплазме клеток бактерий, цитоплазма равномерно заполнена неоформленным мелкозернистым материалом (рис. 3б). Бесструктурную цитоплазму можно видеть в клетках *S. enterica* и на рис. 2. Интересно, что дезорганизация рибосом не сопровождалась видимыми изменениями цитоплазмы. Дезорганизация рибосом наблюдалась во всех клетках *S. enterica* на ультратонких срезах, при обоих методах фиксации через 15 мин инкубации бактерий с DL₄12 и эффект сохранялся на протяжении всего исследования. В то же время цитоплазма intactных клеток и клеток, инкубированных с ципрофлоксацином, была заполнена четкими округлыми электронно-плотными рибосомами (рис. 3а, 3в). Дезорганизация рибосом, по-видимому, была обусловлена рибонуклеазной активностью соединения DL₄12. Изучение ультратонких срезов клеток *S. aureus*, инкубированных с DL₄12, также продемонстрировало бесструктурную цитоплазму, в противоположность содержащей рибосомы цитоплазме intactных клеток [6].

Метод ультратонких срезов не позволил установить, на какую именно РНК *S. enterica* воздействует рибонуклеаза DL₄12, ее мишенями могут быть как матричная РНК, так и рибосомальная, и транспортная, участвующие в скреплении субъединиц рибосом во время синтеза белка.

Инкубация с соединением DL₄12 до неузнаваемости изменяла морфологию клеток *S. enterica*: на фоне однородной бесструктурной цитоплазмы выделялся округлый электронно-прозрачный нуклеоид с ровными границами (рис. 4а, 4б).

Инкубация с ципрофлоксацином приводила к уменьшению нуклеоида, он был плохо различим на фоне цитоплазмы, в отличие от intactных клеток бактерии (рис. 4г, 4д). Нуклеоид intactных клеток располагался по всей длине клеток и имел неправильную форму, на срезах были видны его сегменты (рис. 4ж, 4з). Округлый электронно-прозрачный нуклеоид, содержащий электронно-плотные пучки утолщенных нитей ДНК, определял морфологию основной доли клеток *S. enterica*, инкубированных с DL₄12 (рис. 4б); при этом в некоторых клетках нуклеоид содержал тонкие нити ДНК (рис. 4в). Инкубация бактерии с ципрофлоксацином приводила к дезорганизации нитей ДНК, нуклеоиды содержали бесструктурный зернистый материал (рис. 4е). Нуклеоид на срезах intactных клеток *S. enterica* был представлен четкими переплетенными нитями диаметром 2–15 нм (рис. 4з, 4и), что соответствовало различным уровням упаковки ДНК, описанным в [21].

В соответствии с последними представлениями [12, 22–25], нуклеоид грамотрицательных бактерий имеет погруженную в “заполняющее” вещество компактную центральную зону, из которой выходят петли ДНК в зону транскрипции. Территория нуклеоида (ДНК-плазма) отделена от цитоплазмы по границе раздела фаз и заполнена веществом, состав которого точно не определен, полагают, что оно содержит различные виды РНК. Данная модель объясняет известные данные о “поведении” нуклеоида и пространственной организации ДНК грамотрицательных бактерий. Показано, что РНК играет критическую роль в поддержании структуры нуклеоида, при ее разрушении нуклеоид деградирует [12].

Рибонуклеазная активность соединения DL₄12 обусловлена его химической структурой [3]. Очевидно, что именно она ответственна за поврежде-

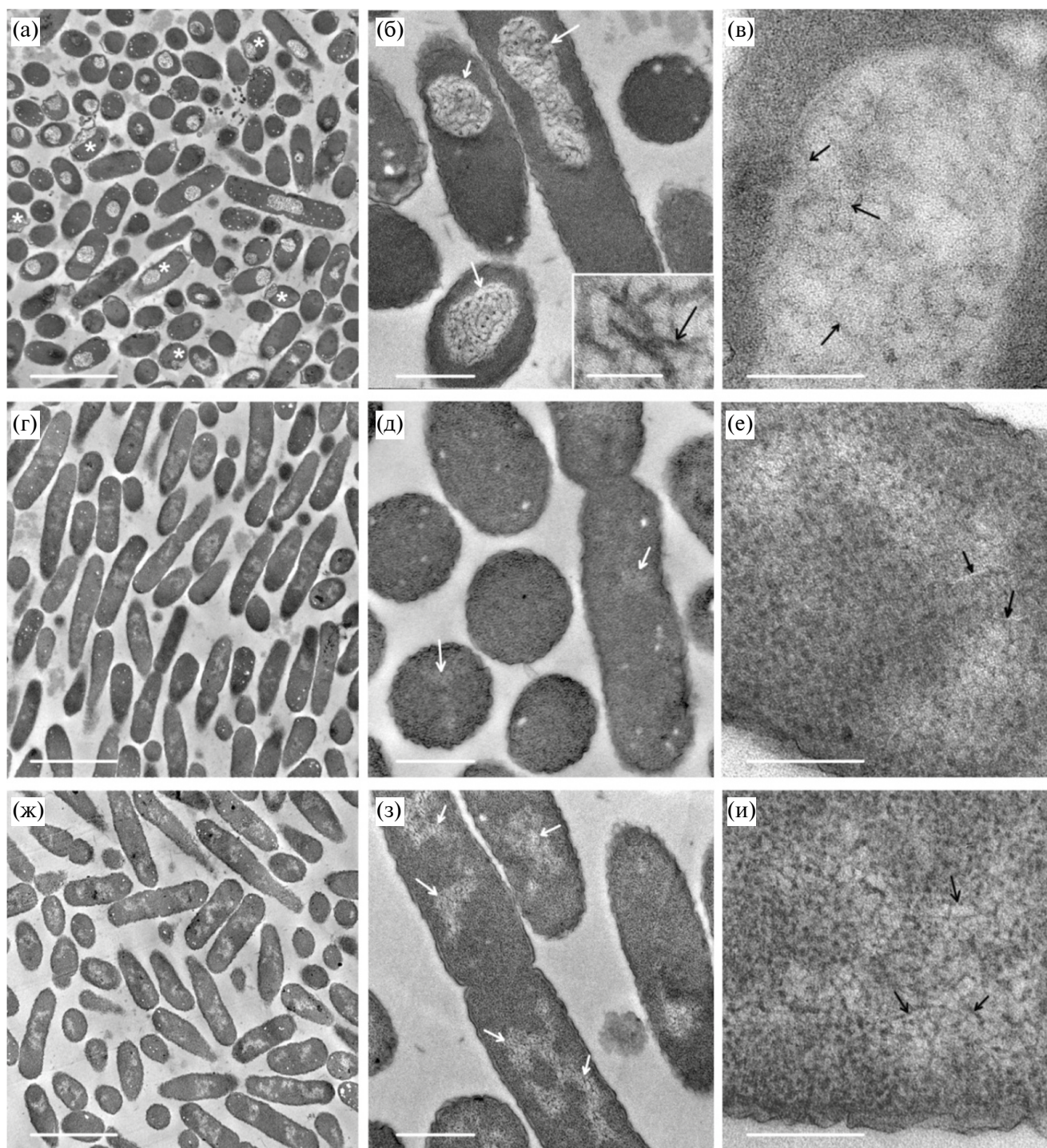


Рис. 4. Изображения клеток *S. enterica* на ультратонких срезах в ПЭМ после 15 мин инкубации с DL₄12 (а–в) и ципрофлоксацином (г–е); ж–и — intactные клетки. а–в изменения нуклеоида (показан белыми стрелками), черными стрелками показаны нити ДНК; звездочкой — клетки с эксцентричным расположением ядра. На врезке — пучки утолщенных нитей ДНК (б), под ними — “заполняющее” вещество; д, е — нарушение структуры нуклеоида, нити ДНК не видны; ж, з — intactные клетки с четким нуклеоидом неправильной формы. Фиксация формальдегидом. Масштаб: 2 мкм (а, г, ж), 500 нм (б, д, з) 200 нм (в, е, и), 100 нм (врезка).

ние/разрушение РНК, связанных с бактериальными ДНК и РНК, “заполняющими” территорию нуклеоида, в результате чего в клетках *S. enterica* происходило изменение структуры нитей ДНК и формы нуклеоида, становившегося округлым, а “заполняющее” вещество становилось электронно-прозрачным (рис. 4а–в). Разрушающее воздействие РНКаз на изолированный целый нуклеоид бактерий было показано ранее [12, 26, 27], что подтвердило наблюдения о том, что структура нуклеоида и нитей ДНК *S. enterica* существенно нарушаются по сравнению с интактными клетками при воздействии DL₄12.

Во многих клетках *S. enterica* наблюдалось смещение нуклеоида к внутренней мембране, на некоторых срезах прослеживался их контакт, наблюдались вдавления оболочки бактерий (рис. 4а, 5а). Известно, что петли бактериальной хромосомы распределены по всему объему клеток, приближаясь к внутренней мембране, в которую попадают синтезированные белки [12]. Возможно, деформация оболочки на определенных участках бактериальных клеток связана с различным характером взаимодействия петель хромосомы и внутренней мембраны.

Изменения ультраструктуры нуклеоида и нитей ДНК при инкубации с ципрофлоксацином не были похожи на изменения, связанные с DL₄12, что подтверждало специфичность эффекта данного соединения и говорило о различных механизмах взаимодействия ципрофлоксацина и соединения DL₄12 с клетками *S. enterica*.

Характер морфологических изменений клеток *S. enterica*, инкубированных с соединением DL₄12, и зафиксированных по методу Райтера-Келленбергера, не отличался от наблюдаемого при фиксации формальдегидом (рис. 4, 5). Клетки бактерии имели гомогенную бесструктурную цитоплазму; округлый нуклеоид с четкими границами содержал нити ДНК, пучки которых лежали в разных плоскостях, при наложении пучков просматривались электронно-плотные участки, утолщение нитей ДНК не наблюдалось (рис. 5а). “Заполняющее вещество” маскировалось нитями ДНК, однако при сильном увеличении в ПЭМ было видно электронно-прозрачное вещество. При фиксации формальдегидом нити ДНК были толще и нередко “склеивались” между собой, делая “заполняющее” вещество более доступным для наблюдения (рис. 4а, 4б). Различия, наблюдаемые в структуре нитей ДНК при разных способах фиксации, обусловлены тем, что OsO₄ не связывается с ДНК, сохраняя ее структуру, тогда как формальдегид сшивает ДНК с белками [12].

Нуклеоид интактных клеток *S. enterica* и инкубированных с ципрофлоксацином при фиксации по Райтеру-Келленбергеру сохранял морфологические характеристики, наблюдаемые при фикса-

ции формальдегидом (рис. 4г, 4д, 4ж, 4з, 5б, 5в, 5д, 5е). Фиксация по Райтеру-Келленбергеру хорошо визуализировала обе мембраны оболочки клеток *S. enterica*, (рис. 5г, 5е), в отличие от фиксации формальдегидом (рис. 4е, 4и). В клетках *S. enterica* инкубация с ципрофлоксацином не приводила к заметным изменениям внешней и внутренней мембран оболочки, тогда как при инкубации с DL₄12 в местах контакта нуклеоида с внутренней мембраной нарушается целостность мембраны, при этом внешняя мембрана сохранялась, даже в клетках с выраженным набуханием нуклеоида.

Следует отметить, что внешняя мембрана оболочки на срезах всех клеток *S. enterica* сохраняла свою целостность при инкубации с DL₄12, видимых изменений ее структуры не было обнаружено, что давало основания предположить, что молекулы DL₄12 способны проходить через внешнюю мембрану бактерии, не вызывая видимых нарушений ее структуры. Известно, что АБС могут проникать через внешнюю мембрану грамотрицательных клеток различными путями, включая диффузию через липополисахаридный слой, белковые каналы, а также образованные поринами поры, последние способны пропускать молекулы размером около 600 Да, а их внутренний диаметр достигает 40–45 Å [14, 15, 28, 29]. Молекула DL₄12 имеет молекулярный вес 849.83 Да и линейные размеры 15–20 Å [3], это позволило предположить, что молекулы соединения DL₄12 могут использовать поры внешней мембраны *S. enterica* для проникновения в периплазматическое пространство. В оболочке грамотрицательных бактерий также есть поры, пронизывающие обе мембраны и обеспечивающие “проход” из внеклеточного пространства в цитоплазму [3, 15]. Можно предположить, что соединение DL₄12 может использовать эти поры для прямого попадания в цитоплазму, где развивается дезорганизация рибосом и нарушение пространственной организации нуклеоида.

Итак, уже через 15 мин инкубации с DL₄12 во всех клетках *S. enterica* на ультратонких срезах регистрировались изменения ультраструктуры нуклеоида и дезорганизация рибосом. Данные изменения, несомненно, были связаны, в первую очередь, с рибонуклеазной активностью молекулы DL₄12, нельзя также исключить и роль свойств этой молекулы как катионного амфифила. Выявленные в настоящей работе ультраструктурные изменения, обнаруживаемые при действии DL₄12, не описаны ни в одной работе. По существу, в работе были визуализированы эффекты рибонуклеазной активности соединения DL₄12, проникающего в клетку через две мембраны бактериальной оболочки.

Рост числа бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, среди которых преобладают грамотрицательные виды, становится серьезнейшей угрозой человечеству, а создание новых высокоэффективных препаратов против этих

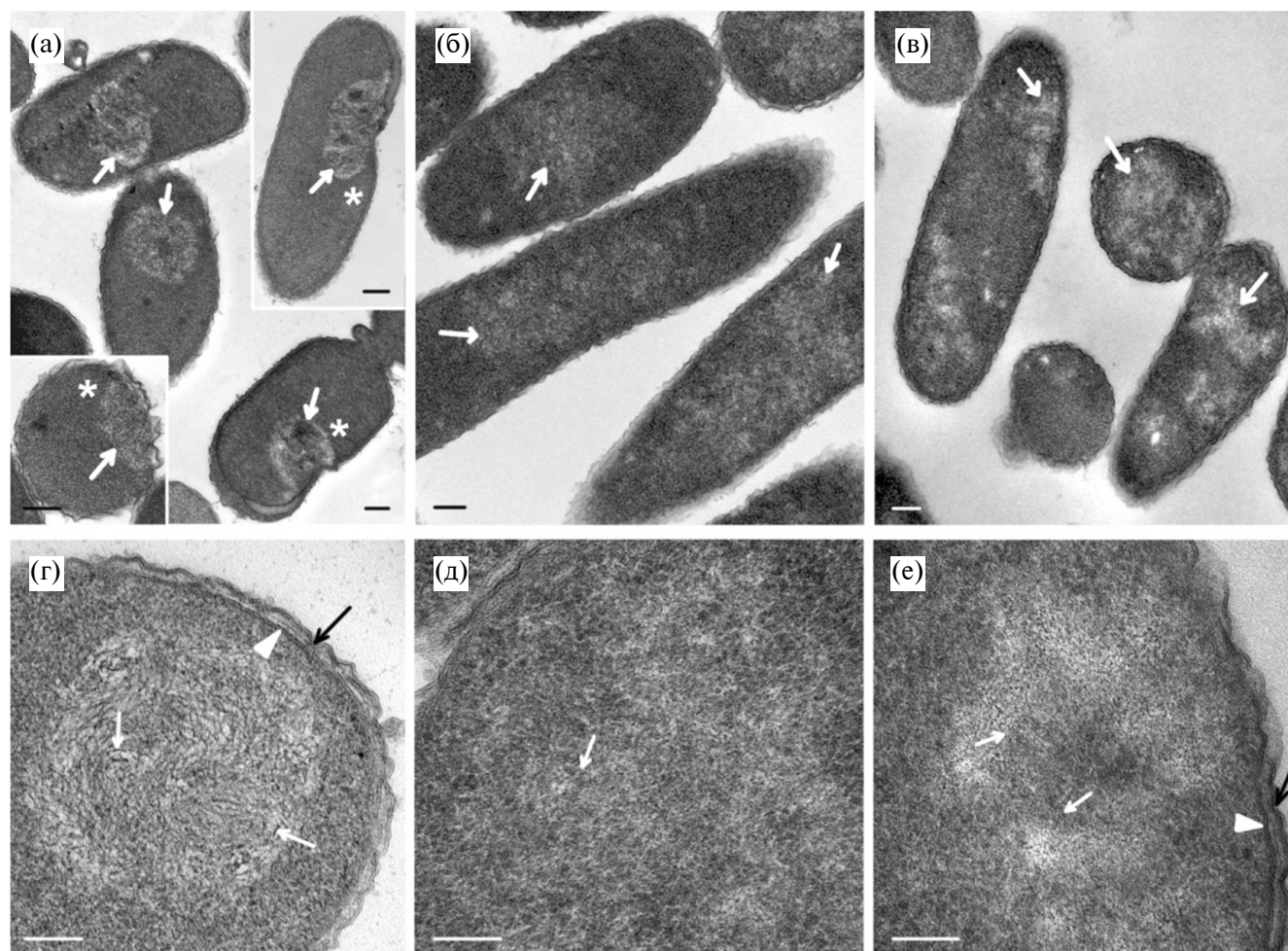


Рис. 5. Изображения клеток *S. enterica*. (а, г) — 15 мин. инкубации с DL₄12; (б, д) — ципрофлоксацином; (в, е) — интактные клетки: а–е — изменения нуклеоида (показан толстыми белыми стрелками). Черными стрелками показаны вдавления оболочки бактерии в местах контакта нуклеоида и внутренней мембраны. Звездочкой — клетки с прилежащим к внутренней мембране нуклеоидом. г — четкие неорганизованные пучки нитей ДНК. Тонкими белыми стрелками показаны отдельные нити ДНК; черной стрелкой — внешняя мембрана клеточной оболочки; головкой стрелки — внутренняя мембрана. д — короткие фрагменты нитей ДНК после инкубации с ципрофлоксацином. е — в интактных клетках тонкие нити ДНК показаны белой стрелкой; черной стрелкой — внешняя мембрана; головкой стрелки — внутренняя мембрана. Фиксация по Райтеру-Келленбергеру. Масштаб: а–в — 200 нм, г, д, е — 100 нм.

микроорганизмов является одной из важнейших задач биомедицины [15, 30]. Соединение DL₄12 обладает выраженными антибактериальными свойствами в отношении таких грамотрицательных микроорганизмов, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *S. enterica*, *E. coli* [5]. Настоящая работа показала уникальные свойства соединения DL₄12, убивающего грамотрицательную бактерию *S. enterica*, в том числе с помощью дезорганизации рибосом. Несомненно, механизмы воздействия DL₄12 на бактерии, особенности его проникновения в их клетки и взаимодействие с комплексом защитных систем бактерий, требуют дальнейших исследований, которые могут привести к появлению нового высокоэффективного препарата против множества бактерий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1 “Интеллектуальные материалы для биомедицины”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thomas J.R., Hergenrother P.J. // Chem. Rev. 2008. V. 108. № 4. P. 1171–1224. <https://doi.org/10.1021/cr0681546>
2. Zhang L., He J., Bai L., Ruan S., Yang T., Luo Y. // Med. Res. Rev. 2021. V. 41. № 4. P. 1855–1889. <https://doi.org/10.1002/med.21780>
3. Yarinich L.A., Burakova E.A., Zakharov B.A., Boldyreva E.V., Babkina I.N., Tikunova N.V., Silnikov V.N. // Eur. J. Med. Chem. 2015. V. 95. № 563–573. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.033>
4. Fedorova A.A., Azzami K., Ryabchikova E.I., Spitsyna Y.E., Silnikov V.N., Ritter W., et al. // Antiviral Res. 2011. V. 91. № 3. P. 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.06.011>
5. Burakova E.A., Saranina I.V., Tikunova N.V., Nazarkina Z.K., Laktionov P.P., Karpinskaya L.A. et al. // Bioorg. Med. Chem. 2016. V. 24. № 22. P. 6012–6020. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.064>
6. Grigor'eva A.E., Bardasheva A.V., Ryabova E.S., Tupitsyna A.V., Zadornykh D.A., Koroleva L.S. et al. // Microorganisms. 2023. V. 11. № 9. P. 2192. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092192>
7. Bonvin E., Personne H., Paschoud T., Reusser J., Gan B.H., Luscher A. et al. // ACS Infect. Dis. 2023. V. 9. № 12. P. 2593–2606. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00421>
8. Cardoso M.H., Menegueti B.T., Costa B.O., Buccini D.F., Oshiro K.G.N., Preza S.L.E. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 19. P. 4877. <https://doi.org/10.3390/ijms20194877>
9. Majalekar P.P., Shirote P.J. // Curr. Drug Targets. 2020. V. 21. № 13. P. 1354–1370. <https://doi.org/10.2174/1389450121666200621193355>
10. Zadornykh D., Zhang Z., Liu C., Serpokrylova I., Bardasheva A., Tikunova N., Silnikov V., Koroleva L. // Int. J. of Health Sci. 2022. V. 6. № S7. P. 3009–3023. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS7.12110>
11. Wang Z., Liu X., Da T., Mao R., Hao Y., Yang N. et al. // Commun. Biol. 2020. V. 3. № 1. P. 41. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0761-3>
12. Kuzminov A. // J. Bacteriol. 2024. V. 206. № 3. P. e0021123. <https://doi.org/10.1128/jb.00211-23>
13. Grigor'eva A., Bardasheva A., Tupitsyna A., Amirkhanov N., Tikunova N., Pyshnyi D., Ryabchikova E. // Microorganisms. 2020. V. 8. № 12. P. 1991. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121991>
14. Sharma P., Vaiwala R., Gopinath A.K., Chockalingam R., Ayappa K.G. // Langmuir. 2024. V. 40. № 15. P. 7791–7811. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c03474>
15. Maher C., Hassan K.A. // mBio. 2023. V. 14. № 6. P. e0120523. <https://doi.org/10.1128/mbio.01205-23>
16. Lin J., Zhou D., Steitz T.A., Polikanov Y.S., Gagnon M.G. // Annu. Rev. Biochem. 2018. V. 87. № 451–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011942>
17. Brielle R., Pinel-Marie M.L., Chat S., Gillet R., Felden B. // Methods. 2017. V. 117. P. 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.10.003>
18. Cougot N., Molza A.E., Delesques J., Giudice E., Cavalier A., Rolland J.P., et al. // J. Mol. Biol. 2014. V. 426. № 2. P. 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.035>
19. Herrero Del Valle A., Innis C.A. // FEMS Microbiol. Rev. 2020. V. 44. № 6. P. 793–803. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa032>
20. Razi A., Britton R.A., Ortega J. // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. № 3. P. 1027–1040. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1231>
21. Ohniwa R.L., Morikawa K., Takeshita S.L., Kim J., Ohta T., Wada C., Takeyasu K. // Genes Cells. 2007. V. 12. № 10. P. 1141–1152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01125.x>
22. Ishihama A. // EcoSal Plus. 2009. V. 3. № 2. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.2.6>
23. Dillon S.C., Dorman C.J. // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. № 3. P. 185–195. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2261>
24. Birnie A., Dekker C. // ACS Nano. 2021. V. 15. № 1. P. 111–124. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c07397>
25. Bakshi S., Choi H., Weisshaar J.C. // Front. Microbiol. 2015. V. 6. № 636. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00636>
26. Zimmerman S.B. // J. Struct. Biol. 2006. V. 153. № 2. P. 160–175. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.10.011>
27. Khan S.R., Kuzminov A. // PLoS One. 2017. V. 12. № 12. P. e0190177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190177>
28. Horne J.E., Brockwell D.J., Radford S.E. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. № 30. P. 10340–10367. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011473>
29. Vergalli J., Bodrenko I.V., Masi M., Moynie L., Acosta-Gutierrez S. et al. // Nat. Rev. Microbiol. 2020. V. 18. № 3. P. 164–176. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0294-2>
30. Manrique P.D., Lopez C.A., Gnanakaran S., Rybenkov V.V., Zgurskaya H.I. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2023. V. 1519. № 1. P. 46–62. <https://doi.org/10.1111/nyas.14921>

Ribosome Disorganization and Other Effects of Artificial RNase DL₄12 on *Salmonella enterica* Cells

A. E. Grigor'eva^a, A. V. Tupitsyna^a, E. S. Ryabova^a, A. V. Bardasheva^a, D. A. Zadvornyykh^a,
L. S. Koroleva^a, V. N. Silnikov^a, and E. I. Ryabchikova^{a,*}

^a*Institute of Chemical Biology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, 630090 Russia*

^{*}*e-mail: lenryab@yandex.ru*

Cationic amphiphile DL₄12, which has RNase activity (D — DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane); L₄ — tetramethylene linker; 12 — dodecyl residue), was synthesized at the ICBFM SB RAS, and showed pronounced antibacterial properties. A suspension of *Salmonella enterica* ATCC 14028 cells was incubated with DL₄12 (5 μM) for 15 and 30 min, or with ciprofloxacin (5 μM, reference compound). Intact cells served as controls. Samples were fixed with formaldehyde (4%, postfixed with 1% OsO₄), or by the Reiter-Kellenberger method (1% OsO₄, postfixed with 0.5% uranyl acetate), dehydrated and embedded into an Epon-Araldite mixture. Ultrathin sections were examined using an electron microscope Jem 1400 (“Jeol”, Japan). Within 15 min of incubation with compound DL₄12, visible ribosomes disappeared throughout the cytoplasm of *S. enterica* cells; In the periplasmic space, a homogeneous substance of average electron density was observed, its penetration into the cytoplasm was noted, in which polymorphic inclusions appeared. The ultrastructure of the nucleoids was significantly disrupted; they became rounded, and the DNA strands “stick together” into bundles. The ultrastructure of the outer membrane remained unchanged. The observed changes in the structure of *S. enterica* are due to a combination of RNase activity and amphiphilic properties of DL₄12 and did not differ depending on the fixation method. Such changes were not described in any publication. Our study made it possible for the first time to visualize the influence of RNase activity and the amphiphilic component of the compound DL₄12, which penetrated into the cell through two bacterial membranes without their visible damage.

Keywords: artificial RNase; cationic amphiphile; *Salmonella enterica*; ribosome disorganization; nucleoid structure