

УДК 577.112.6:577.19

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

Е.Д. Тазинцева¹, магистрант программы подготовки «Биология клетки», тел. +7-904-182-07-80, tazintsevae@ulsu.ru;

А.А. Ломакин², магистрант направления подготовки «Биология», тел. +7-960-362-15-17, artemy.lomakin@yandex.ru;

Е. В. Юрова¹, аспирант направления подготовки «Клеточная биология, гистология, цитология (биологические науки)», тел. +7-917-627-89-11, urovaev523@gmail.com;

Е.А. Белобородов¹, инженер-исследователь, тел. +7-906-394-16-19, beloborodov.evgeniy.a@gmail.com;

С.М. Слесарев¹, доктор биологических наук, доцент, тел. +7-902-123-48-33, sergey_sl@mail.ru

¹ФГБОУ ВО УлГУ

²ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ им. П.А. Столыпина

Ключевые слова: пептид, биосинтез, антимикробный пептид, антибактериальная активность.

*В статье описывается исследование антибактериальной активности синтезированных антимикробных пептидов на культуру *Staphylococcus aureus* в лабораторных условиях.*

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках программы «УМНИК» (грант 13729ГУ/2018).

Введение. Синтетические антимикробные пептиды являются аналогами выделенных природных соединений, что наряду с основными активными свойствами гарантирует 100 % растворение под действием собственных ферментов организма и исключает накопление и длительное токсическое действие. Их преимущество в малых размерах активной молекулы (не более 50 аминокислот массой не более 5000 Дальтон), что обуславливает лучшую проницаемость, как между слоями кожи, так и внутрь клетки и, как следствие, выраженность эффекта. На клеточную культуру пептидный комплекс оказывает заметное действие в течение первых двух часов, нарушая целостность мембраны или вызывая сбой в дыхательной цепи, что не позволяет бактериям успеть развить резистентность к пептидам до своей гибели. Это делает синте-

зированные антимикробные пептиды привлекательными кандидатами для разработки лекарственных препаратов.

Однако некоторые особенности пептидов не позволяют использовать их для комплексного лечения — так потенциальная иммуногенность исключает возможность инъекционного введения, а чувствительность к пептидазе не позволяет пероральное введение без существенных модификаций. В связи с этим актуально применение синтезированных антимикробных пептидов в виде местных средств, как активная добавка к различным мазям, лосьонам, шампуням и перевязочным материалам.

На данный момент лечение инфекционных кожных заболеваний в основном предполагает использование антибиотиков. Повсеместное их использование в течение последних семидесяти лет на порядок снизило эффективность терапии. Это случилось во многом благодаря постоянной мутации резистентных штаммов, а так же выявлению группы людей с индивидуальной непереносимостью антибиотиков [1].

Так что добавление синтетических пептидов с более нацеленной активностью предлагается как вспомогательное терапевтическое вмешательство при лечении инфекционных кожных заболеваниях, и как профилактическая стратегия в ежедневном уходе

Цель работы. Определить антибактериальную активность синтезированных антимикробных пептидов на культуру *Staphylococcus aureus* в лабораторных условиях.

Были поставлены задачи исследования:

- 1) Подбор антимикробных пептидов;
- 2) Синтез пептидов на пептидном синтезаторе;
- 3) Выявление антибактериального действия синтезированных пептидов разных концентраций на культуру *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на базе лаборатории молекулярной и клеточной биологии НИТИ им. С.П. Капицы УлГУ.

В качестве тест-объекта выступала культура условно-патогенного штамма *Staphylococcus aureus* №1 из коллекции Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина.

В исследовании определялись антибактериальные свойства синтетических антимикробных пептидов. Пептиды были получены на твёрдофазном пептидном синтезаторе ResPer SL (INTAVIS, Германия) с помощью Fmoc-технологии [2] и стандартных методик для синтеза [3]. Анализ пептидов проводился методом ион-обменной хроматографии (анион-обменная), детектирование проводилось на длине волны 280

нм (колонка Agilent PL-SAX, 4,6x150 мм, размер частиц 8мкм, диаметр пор 1000 ангстрем, хроматографическая система Bio-Rad NGC Quest). Элюирование градиентное, элюент А - 20мМ Tris-HCl в деионизированной воде, элюент Б - 20мМ Tris-HCl + 1М NaCl в деионизированной воде.

В работе использовались сухой питательный бульон для культивирования микроорганизмов (ГРМ-бульон) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), бактериологический агар (Испания, перефасовано ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), одноразовый пластик – наконечники, 96-луночные микропланшеты (Techno Plastic Products, Швейцария).

Для исследования антибиотических свойств были отобраны синтетические антимикробные пептиды, удовлетворяющие основным условиям:

- длина пептида не более 20 аминокислот;
- молекулярная масса пептида приближена к 2000 дальтон;
- способность связываться с бактериальной мембраной;
- способность нарушать процессы на бактериальной мембране.

Были отобраны следующие пептиды-кандидаты:

- HM-2 (синтетический пептид), AKKVKFRLGIGAVLKVLWTG (20);
- H5 (синтетический пептид), AKKVKFRLGIGAVLKVLKKG (20);
- TsAP-2 (пептид *Tityus serrulatus*), FLGMIPGLIGGLISAFK (17);
- Ranalexin (пептид *Rana catesbiana*), FLGGLIKIVPAMICAVTKKC (20);
- Protegrin 1 (PG-1) (пептид *Sus scrofa domesticus*), RGGRLCYCRRRFCVVCVGR (18).

Были выбраны концентрации 100, 50 и 12,5 мкМ вещества на лунку 96-луночного планшета. Каждый пептид оценивали в трёх повторах анализа.

Бактерии культивировали в течение 24 ч в жидкой питательной среде (ГРМ-бульон) до середины экспоненциальной фазы роста. Мутность культур измеряли и корректировали при помощи микропланшетного ридера Infinite F50 (TECAN, Австрия).

Для определения антибактериальной активности антимикробного пептида в лунку 96-луночного планшета вносили 90 мкл бактериальной культуры и 10 мкл пептида в конечной концентрации на лунку 100 и 12,5 мкМ. В качестве контроля использовали лунки с исключительно бактериальным инокулятом – для контроля в лунку вносили 90 мкл культуры в жидкой питательной среде и добавляли 10 мкл деионизированной воды.

Микропланшеты инкубировали в течение суток при 37⁰С и исследовали ингибирование роста путём контроля оптической плотности

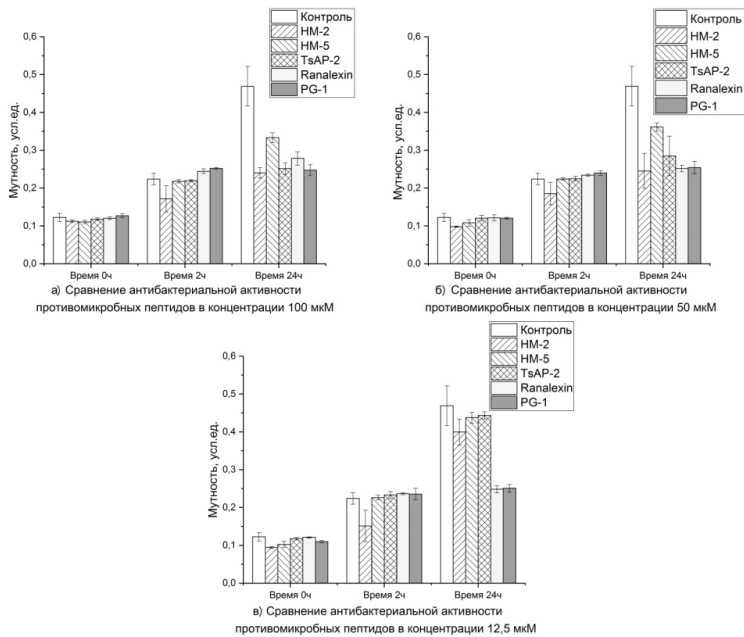


Рисунок 1 - Антибактериальная активность антимикробных пептидов в концентрациях а) 100 мкМ, б) 50 мкМ и в) 12,5 мкМ на лунку, выраженная в условных единицах.

при 620 нм (OD620). По степени мутности ячейки микропланшета судили о жизнеспособности бактерий и антибактериальной активности пептида.

Результаты исследования и их обсуждение. По итогам работы можно судить о следующем (рис. 1):

- при первом делении через 2 часа после добавления пептида в культуру все отобранные пептиды показали схожую картину действия вне зависимости от концентрации и структуры;

- через сутки динамика менялась: появлялись различия в графиках воздействия различных концентраций и различных типов пептидов.

Синтетический линейный пептид HM-2 через сутки в концентрациях 100 и 50 мкМ вполнину ингибирует рост культуры, тогда как в концентрации 12,5 мкМ нельзя сделать выводы по недостоверным результатам (рис. 2, а).

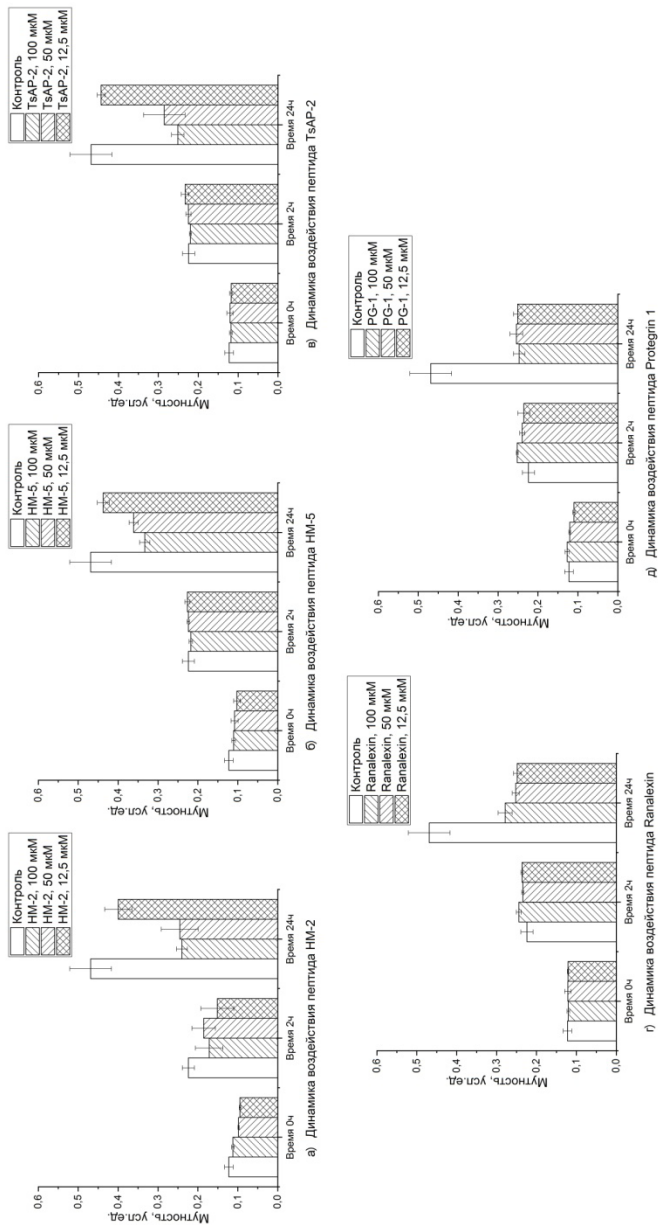


Рисунок 2 - Антибактериальная активность антимикробных пептидов а) HM-2, б) HM-5, в) TsAP-2, г) Rapalexin, д) Proteglin 1, выраженная в условных единицах.

Синтетический линейный пептид НМ-5 через сутки в концентрациях 100 и 50 мкМ ингибирует культуру на четверть, и в концентрации 12,5 мкМ так же ингибирует культуру недостаточно сильно (рис. 2, б).

Линейный пептид бразильского скорпиона TsAP-2 имеет схожую картину воздействия, как и НМ-2: он показывает суточную активность в концентрациях 100 и 50 мкМ, в концентрации 12,5 мкМ он не оказывает достаточного влияния на культуру (рис. 2, в).

Ranalexin, пептид лягушки-быка, имеет более сложную структурную организацию (линейную с гептакольцом на одном из концов), и показывает другую картину воздействия (рис. 2, г). Суточное воздействие на культуру оказалось чуть более слабым, чем 100 мкМ концентрация НМ-2 и TsAP-2, однако все концентрации Ranalexin имеют одинаковую силу воздействия, в отличие от НМ-2 и TsAP-2.

Пептид домашней свиньи Protegrin 1 имеет структуру β -шпильки и показывает картину воздействия, сходную с Ranalexin (рис. 2, д), но имеет чуть более выраженное действие.

Наибольшую антибактериальную активность показал пептид Protegrin 1, так же его активность не зависела от конечной концентрации и в течение времени. Наименьшую антибактериальную активность показал пептид НМ-5, его активность заметно снижалась при изменении концентрации и в зависимости от времени.

Заключение. Полученные в эксперименте результаты позволяют судить о следующем:

- 1) Выбранные антимикробные пептиды не теряют своей активности при синтезе в лабораторных условиях;
- 2) Синтезированные пептиды имеют достаточную антибактериальную активность, чтобы исследоваться в дальнейшем;
- 3) Антибактериальная активность пептидов изменяется в зависимости от концентрации у линейных пептидов и не изменяется в зависимости от концентрации у пептидов более сложной вторичной структурной организации.

Планируется дальнейшее исследование выбранных пептидов, в частности определение возможности синергии пептидов при совместном воздействии на бактериальную культуру.

Библиографический список:

1. Всемирная Организация Здравоохранения, Информационный бюллетень «Устойчивость к антибиотикам», Октябрь 2017 г. <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/ru/>

2. Merrifield, R., Barany, G. Solid-phase peptide synthesis // The peptide: analysis, synthesis, biology. N 2 / Ed. by M. Gross. New York, 1980. P. 3–283.
3. Mirgorodskaya O. A., Haselmann K. F., Kjeldsen F., Roepstorff P., Zubarev R. A. Towards the standard-module approach to disulfide-linked polypeptide nanostructures. I. methodological prerequisites and mass spectrometric characterization of the test two-loop structure // Eur. J. Mass Spectrom. 2003. N 9. P. 139–148.

INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SYNTHESIZED ANTIMICROBIAL PEPTIDES

*Tazintseva E.D., Lomakin A.A., Iurova E. V.,
Beloborodov E.A., Slesarev S.M.*

Keywords: *peptide, biosynthesis, antimicrobial peptide, antibacterial activity.*

The article describes the research of the antibacterial activity of the synthesized antimicrobial peptides on the culture of Staphylococcus aureus in vitro.