

ФАКУЛЬТЕТ МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ И БИОИНЖЕНЕРИИ

СЕКЦИЯ «ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕДИЦИНЫ»

УДК 577.6: 577.6: 579.842.11

А.Ю.Артамонов (6 курс, каф. ФХОМ), Д.С.Орлов, к.м.н., н.с. ГУ НИИ ЭМ РАМН

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОТЕГРИНА И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОТЕГРИНОПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ

Выбор темы работы связан с возрастающим интересом к изучению фундаментальных основ врожденного иммунитета. Так как в настоящее время резистентность микроорганизмов к традиционным антибиотикам стремительно возрастает, а также появляются новые возбудители инфекционных заболеваний, возникает необходимость поиска новых лечебных антибиотических препаратов. Один из наиболее активных антимикробных пептидов животного происхождения протегрин PG-1, выделенный из лейкоцитов свиньи [1], кроме микробицидной активности обладает гемолитическим эффектом [2], что делает проблематичным перспективу его использования как лекарственного препарата. Был синтезирован ряд протегриноподобных пептидов со структурными отличиями для проведения в дальнейшем структурно-функционального анализа биологических свойств протегриноподобных пептидов; пять из них были исследованы в представленной работе: P45, P85, P88, P90, P91.

Цель исследования: изучить антимикробное действие природного пептида протегрина PG-1 и синтетических протегриноподобных пептидов.

В работе решались следующие задачи: 1) освоение и использование фотометрического метода оценки проницаемости мембраны микроба; 2) изучение характера проницаемости мембраны микроба в норме; 3) исследование характера проницаемости мембраны микроба при действии антимикробных пептидов.

Объектом исследований был выбран микроорганизм *Escherichia coli*, штамм ML-35p.

Информативным методом для выявления продукта химической реакции, наиболее интенсивно поглощающего свет определенной длины волны, является фотометрический метод определения оптической плотности раствора. Из закона Бугера – Ламберта – Бера [3] следует соотношение: (1)

$D = \lg(I_0 I^{-1}),$	(1)
------------------------	-----

где D – оптическая плотность, I_0, I – интенсивность светового пучка на входе и выходе кюветы, соответственно, эрг.см⁻².

Особенностью штамма ML-35p [4] является наличие специфических ферментов: цитоплазматической β – галактозидазы и периплазматической β – лактамазы. Для проведения химической реакции с каждым из этих ферментов использовались следующие субстраты: Нитроцефин (Calbiochem-Novabiochem), который при гидролизе β – лактамазой, образует продукт с максимумом поглощения на длине волны $\lambda_{\max}=486$ нм; ONPG (Sigma-Aldrich), продукт гидролиза которого (гидролиз β – галактозидазой) поглощает на $\lambda_{\max}=405$ нм. Таким образом, существует возможность исследовать проницаемость внешней и внутренней мембран микроорганизма.

Измерения проводились на приборе SpectraMAX250 (Molecular Devices Corp.). Данные обрабатывались с помощью программного пакета Sigma Plot 8.0 (SPSS). Общий объем раствора в каждой ячейке составлял 200 мкл (Нитроцефин 22 мкМ или 2,5 мМ ONPG; бактерия $5 \cdot 10^6$ CFU; пептид 1,25 – 40 мкМ; 10 мМ NaP буфер с 100 мМ NaCl pH 7.4). Началом эксперимента считалось добавление бактерии.

В работе получены следующие результаты: исследовано действие пяти пептидов, как на внешнюю, так и внутреннюю мембрану микроорганизма E.coli. На примере исследования P-88 (Рис.1) показано, что пептид увеличивает проницаемость внешней мембраны и не действует на внутреннюю мембрану.

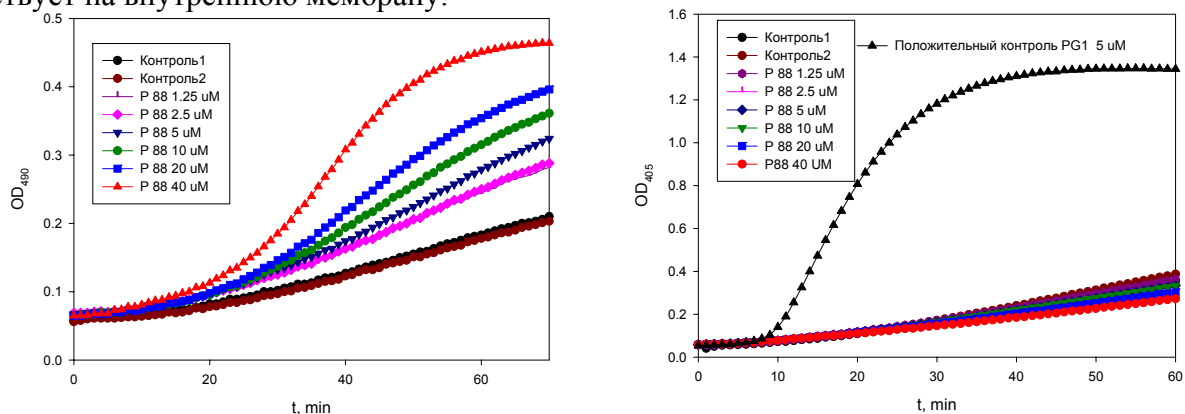


Рис. 1. Действие синтетического пептида P-88 в концентрациях 1.25 мкМ – 40 мкМ на внешнюю (слева) и внутреннюю (справа) мембраны E.coli.

Ниже приведена таблица результатов работы (табл. 1). Дополнительно в таблице указаны данные о гемолитической и цитотоксической активности пептидов (данные получены ранее в лаборатории).

Таблица 1. Сравнительная таблица активности пептидов к мембранам E.coli, а также гемолитическая и антимикробная активности.

Пептид \ объект проявления активности	Внешняя мембрана	Внутренняя мембрана	Гемолиз эритроцитов	Антимикробная активность
PG-1	+	+	+	+
P-45	+	+	+	+
P-85	+	+	+	+
P-88	+	-	-	+
P-90	+	-	-	+
P-91	+	-	-	+

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Все исследуемые синтетические пептиды лизируют внешнюю мембрану и вызывают гибель микроорганизма.

2. Пептиды P88, P90, P91 не вызывают гемолиз, а также не лизируют внутреннюю мембрану. Их действие на внутреннюю мембрану сходно с действием на мембрану эритроцитов. В связи с этим, исследование пептидов данного ряда представляет интерес для понимания механизма действия антимикробных пептидов. С другой стороны, в перспективе возможно использование негемолитических пептидов как модели для создания новых антибиотических лечебных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Кокряков В. Н. Биология антибиотиков животного происхождения. – СПб.: Наука, 1999. – 162 с.

2. Kokryakov V. N., Harwig S.S.L., Panyutich E.A. et al. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides combine features of corticostatic defensins and tachyplesins // FEBS Lett. 1993. Vol. 327, n 2. P. 231—236
3. Кленин В.И. Термодинамика систем с гибкоцепными полимерами, – Издательство Саратовского университета, 1995.— 733 с.
4. Lehrer, R., Barton, A., Ganz, T., 1988. Concurrent assessment of inner membrane permeabilization and bacteriolysis in *E. coli* by multiple-wavelength spectrophotometry. *J. Immunol. Methods.* 108, 153 – 158.