

1
НОМЕР

БОНЦ

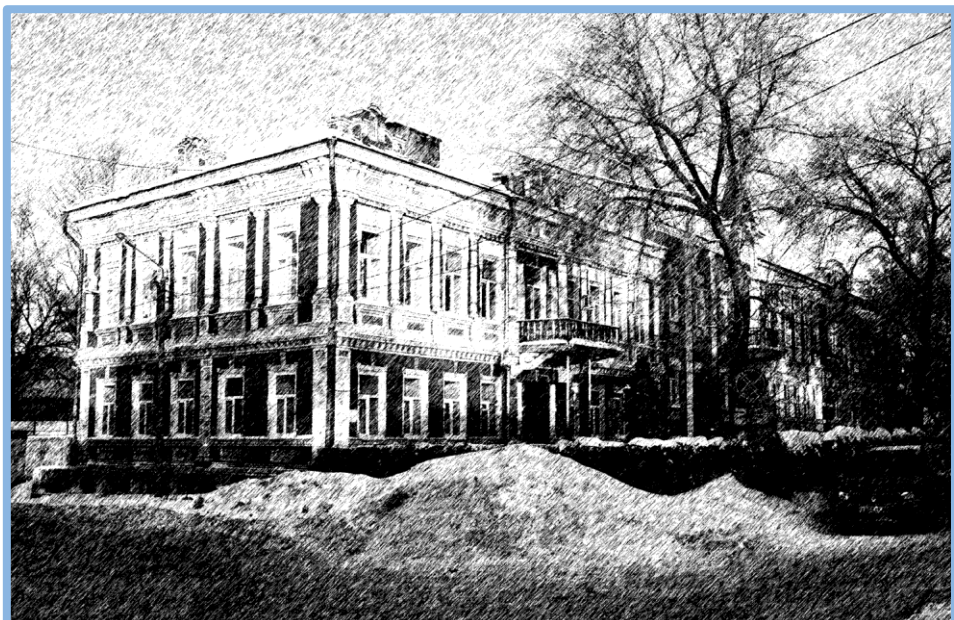
2016

ISSN 2304-9081

Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2016

УДК 619:579:636.52/.58

*М.В. Сычева^{1,2}, А.С. Васильченко^{2,3}, А.А. Кульсарин⁴, Е.А. Рогожин⁵,
Ю.И. Пешкова¹, О.Л. Карташова²*

ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОАНАЛИТИЧЕСКИХ И СЕПАРАЦИОННЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ МЕХАНИЗМА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ТРОМБОЦИТОВ КУРИЦЫ ДОМАШНЕЙ

¹ Оренбургский государственный аграрный университет», Оренбург, Россия

² Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, Россия

⁴ НПФ АП ЛЮМЭКС, С.-Петербург, Россия

⁵ Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Цель. Изучить механизм биологической активности очищенных антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней (*Gallus gallus*) с помощью электроаналитических и сепарационных методов.

Материалы и методы. В исследовании использовали очищенные пептиды из тромбоцитов кур. Дзета-потенциал бактериальных клеток рассчитывали по изменению электрофоретической подвижности; содержание ионов калия во внеклеточной среде определяли с помощью установки капиллярного электрофореза.

Результаты. Установлена катионная природа антимикробных пептидов, полученных из тромбоцитов курицы домашней, и их способность электростатически взаимодействовать с клеточной оболочкой микроорганизмов, нарушать целостность их барьерных структур.

Заключение. С помощью электроаналитических и сепарационных методов детализирован механизм антимикробного действия АМП из тромбоцитов *G. gallus* в отношении бактерий.

Ключевые слова: катионные антимикробные пептиды, тромбоциты, *Gallus gallus*, дзета-потенциал, калий.

*M.V. Sycheva^{1,2}, A.S. Vasilchenko^{2,3}, A.A. Kulsarin⁴, E.A. Rogozhin⁵,
Y.I. Peshkova¹, O.L. Kartashova²*

EVALUATION OF MECHANISM OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM *GALLUS GALLUS* PLATELETS USING AN ELECTROANALYTICAL AND SEPARATION METHODS

¹ Orenburg State Agrarian University, Orenburg, Russia

² Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

³ Orenburg State University, Orenburg, Russia

⁴ Lumex Instruments LLC, S.-Petersburg, Russia

⁵ M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia

Objective. The aim of this work was to study the mechanism of biological activity of the antimicrobial peptides (AMP) purified from the platelets of domestic chicken (*Gallus gallus*) using a various analytical methods.

Materials and methods. Zeta potential of bacterial cells was calculated by the changes in their electrophoretic mobility; content of the potassium ions in the extracellular medium was determined by capillary electrophoresis.

Results. In this study a cationic nature of antimicrobial peptides derived from *Gallus gallus* platelets was revealed. Ability to electrostatic interaction of AMP with the bacterial membranes followed permeabilization of their barrier structures was shown.

Conclusion. The mechanism of antimicrobial action of AMP derived from *G. gallus* platelets against bacteria was studied using an electroanalytical and separation methods.

Keywords: cationic antimicrobial peptides, platelets, *Gallus gallus*, Zeta potential, kalium.

Введение

Коэволюция макро- и микроорганизмов привела к возникновению врождённого иммунитета животных, основанного на продукции разнообразной группы пептидов и белков [1]. В настоящее время описано порядка четырёх тысяч различных антимикробных пептидов (АМП) [2], выделенных из живых существ различного уровня организации, что является убедительным доказательством универсальности и эволюционной древности этих элементов системы врожденного иммунитета.

Сочетание современных методов хроматографии, геномики и протеомики только в 2014 г. позволило охарактеризовать 104 новых пептида с известной аминокислотной последовательностью и выраженной антимикробной активностью [3].

Многие авторы уделяют внимание изучению биологических эффектов, проявляемых АМП [4-6]. Однако работ, посвященных антимикробным пептидам из тромбоцитов и кровяных пластинок человека и животных, не много [7, 8]. Между тем известно, что тромбоцитарные катионные белки характеризуются широким спектром бактерицидной активности, а также обладают иммуномодулирующей и гомеостазирующей функциями [9].

В этой связи выделение и исследование механизмов биологической активности антимикробных пептидов из тромбоцитов кур является актуальным как в плане накопления фундаментальных знаний о межвидовых особенностях биосинтеза тромбоцитарных АМП, так и с точки зрения использования тромбоцитов птицы в качестве источника агентов при создании новых противoinфекционных препаратов.

Вышеизложенное предопределило цель настоящего исследования: изучение механизма биологической активности очищенных АМП из тромбоцитов курицы домашней (*Gallus gallus*) с помощью электроаналитических и се-

парационных методов.

Материалы и методы

При проведении работы брали очищенные фракции антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней (*G. gallus*).

Для изучения механизмов биологической активности АМП из тромбоцитов использовали музейные штаммы *Staphylococcus aureus* P209 и *Escherichia coli* K12.

Дзета-потенциал интактных бактериальных клеток и клеток, подвергнутых воздействию АМП в минимальной бактерицидной концентрации, установленной нами ранее [10], регистрировали в суспензии на измерителе дзета-потенциала Photocor compact-Z (Фотокор, Россия). Дзета-потенциал бактериальных клеток рассчитывали по изменению электрофоретической подвижности с использованием уравнения Смолуховского.

Для измерения концентрации внеклеточных ионов калия при воздействии антимикробных пептидов клетки тест-штаммов *S. aureus* и *E. coli* дважды отмывались изотоническим раствором NaCl и суспензировались в дистиллированной воде. Затем в реакционную среду вносили очищенные антимикробные пептиды и инкубировали при 37⁰С в течение часа. Клетки, инкубированные с АМП (опыт) и без него (контроль), осаждались при 10000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант исследовался на содержание ионов калия с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель» (Люмэкс, Россия). Полученные результаты обрабатывали с использованием непараметрического рангового критерия Уилкоксона.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что интактные клетки *S. aureus* P209 и *E. coli* K12 обладали отрицательными значениями дзета-потенциала ($-24 \pm 0,2$ и $-36 \pm 0,5$ мВ, соответственно). Отрицательные значения потенциала клеток, очевидно, являются следствием суммарного присутствия отрицательно заряженных молекул липидов, липолисахаридов, а также тейхоевых и липотейхоевых кислот в составе клеточной стенки грамотрицательных и грамположительных бактерий, соответственно [11].

Соинкубирование исследуемых бактерий с АМП из тромбоцитов курицы домашней в течение 15 минут приводило к смещению значения дзета-потенциала *S. aureus* с $-24 \pm 0,2$ до $-4 \pm 0,01$ мВ ($p < 0,05$). Дзета-потенциал

эшерихий, обработанных АМП, также оказывался менее отрицательным ($p < 0,05$) и изменялся с контрольных величин до $-11 \pm 0,10$ мВ (рис. 1).

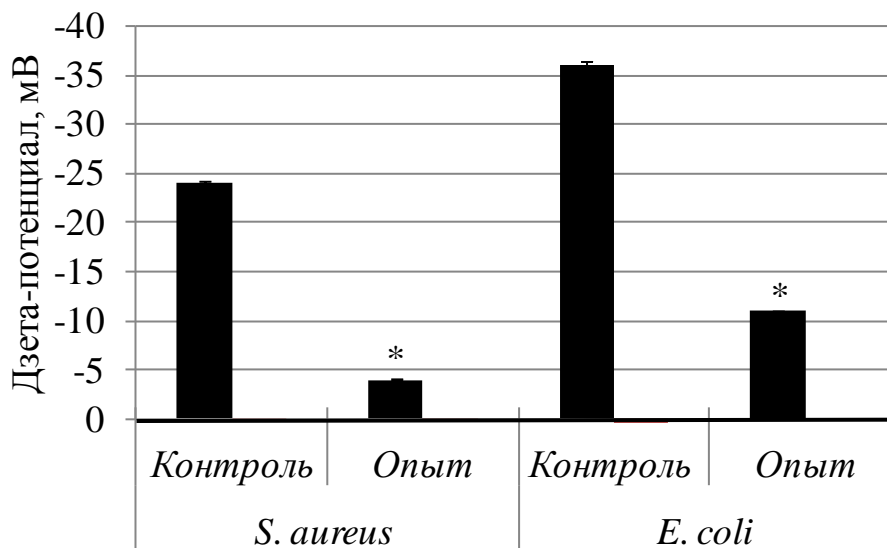


Рис. 1. Изменение дзета-потенциала *E. coli* и *S. aureus* в присутствии АМП из тромбоцитов курицы домашней.

Примечание: * – достоверность различий выраженности дзета-потенциала *S. aureus* и *E. coli* в контроле и после соинкубирования с АМП из тромбоцитов курицы домашней ($p < 0,05$) (критерий Уилкоксона).

Таким образом, первоначальное взаимодействие компонентов экстракта тромбоцитов с бактериальными клетками происходит за счет электростатического взаимодействия разноименно заряженных молекул, причем значительных различий в подобном взаимодействии от типа строения клеточной стенки бактерий не выявлено. В данном случае изменение заряда происходило на сопоставимые величины как у золотистых стафилококков, так и у эшерихий.

Наряду с поверхностным зарядом важным параметром бактериальных клеток является постоянная концентрация ионов K^+ . Благодаря разности электрических потенциалов между клеткой и средой, создаваемой Na^+/H^+ -антипортером, калий проникает внутрь клетки, и в благоприятных для бактериальной клетки условиях внутри поддерживается постоянная концентрация ионов K^+ , где она значительно больше, чем во внеклеточном пространстве. На этом факте основаны методики исследования пермеабилзации барьерных (мембранных) структур клеток при воздействии различных агентов.

Поэтому на следующем этапе исследования с использованием метода капиллярного электрофореза была дана оценка изменения содержания ионов K^+ во внеклеточной среде микроорганизмов, соинкубированных с АМП из тромбоцитов *G. gallus*.

Установлено, что во внеклеточной жидкости бактериальных клеток *S. aureus* содержание ионов калия оказалось ниже пределов детектирования прибора (не обнаружено). Обработка культуры фракциями экстракта тромбоцитов в МБК приводила к выходу ионов калия во внеклеточную среду, где они детектировались в концентрации 50 мкг/мл (таблица).

Таблица. Концентрация калия во внеклеточной среде микроорганизмов при взаимодействии с АМП

Штамм	Экспериментальная группа	Концентрация ионов K^+ , мкг/л
<i>S. aureus</i>	контроль	0
	опыт	50±0,23
<i>E. coli</i>	контроль	30±0,18
	опыт	130±0,25

Клетки грамотрицательных микроорганизмов *E. coli* оказались осмотически менее устойчивыми – при инкубации контрольных образцов в течение часа концентрация ионов калия во внеклеточной среде составляла 30 мкг/мл; в свою очередь внесение тестируемого препарата (АМП) приводило к освобождению еще 100 мкг/мл K^+ .

Таким образом, оценивая результаты капиллярного электрофореза исследуемых образцов, можно констатировать преимущественно мембранолитический механизм действия антимикробных пептидов, выделенных из тромбоцитов курицы домашней, на бактерии с различным типом строения клеточной стенки, о чем свидетельствовал выход во внеклеточное пространство значительного количества ионов K^+ , локализованного, главным образом, внутриклеточно.

Заключение

Важнейшим и интегральным биофизическим параметром клетки является поверхностный заряд, который оценивают, измеряя электрокинетический потенциал (дзета-потенциал), характеризующий

величину потенциала двойного электрического слоя на поверхности клетки. Определение величины дзета-потенциала клеток используется в клеточной биологии для анализа состояния мембран, оценки действия лекарственных средств и мембранотропных материалов [12].

Измерение дзета-потенциала позволило констатировать нейтрализацию отрицательного заряда клеточной оболочки при обработке бактерий тромбоцитарными АМП, что свидетельствует об их катионной природе и электростатическом характере первоначального взаимодействия с микроорганизмами.

На мембранолитический механизм действия пептидов, выделенных из тромбоцитов кур, на бактерии с различным типом строения клеточной стенки, указывает выход значительного количества ионов K^+ , локализованного преимущественно внутриклеточно, что находит подтверждение в работе других авторов по оценке механизма бактерицидного действия гибридных АМП [13] и согласуются с результатами исследований S.P. Коо et al. (1997, 1999), которые отмечали пермеабиллизацию мембран под воздействием АМП из кровяных пластинок человека [14, 15].

Таким образом, применение электроаналитических и сепарационных методов позволило детализировать механизм антимикробного действия АМП из тромбоцитов *G. gallus* в отношении бактерий.

(Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 14-04-97067 р_поволжье_a).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sanchez M.L., Martinez M.M., Maffia P.C. Natural antimicrobial peptides: pleiotropic molecules in host defense. *CellBio*. 2013. 2: 200-210.
2. Zhao X., Wu H., Lu H. et al. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *PLoS One*. 2013. 8(6): e66557.
3. Wang G., Mishra B., Lau K. et al. Review antimicrobial peptides in 2014. *Pharmaceuticals*. 2015. 8: 123-150.
4. Gomes A.P., Mano J.F., Queiroz J.A. et al. Incorporation of antimicrobial peptides on functionalized cotton gauzes for medical applications. *Carbohydr. Polym.* 2015. 127: 451-461.
5. Mathew B., Nagaraj R. Antimicrobial activity of human α -defensin 5 and its linear analogs: N-terminal fatty acylation results in enhanced antimicrobial activity of the linear analogs. *Peptides*. 2015. 71: 128-140.
6. Chen B., Fan D.Q., Zhu K.X. et al. Mechanism study on a new antimicrobial peptide Sphistin derived from the N-terminus of crab histone H2A identified in haemolymphs of *Scylla paramamosain*. *Fish Shellfish Immunol.* 2015. 47: 833-846.
7. Ivanov Y.B., Gritsenko V.A., Kuzmin M.D. The effect of brief exposure to sub-therapeutic concentrations of chlorhexidine digluconate on the susceptibility of staphylococci to platelet microbicidal protein. *Surg. Infect. (Larchmt)*. 2015. 16: 263-266.
8. Сычева М.В., Шейда Е.В., Карташова О.Л. и др. Антибактериальный спектр тромбо-

- дефензинов некоторых видов животных. Аграрный вестник Урала. 2010. 7(73): 50-51.
9. Бухарин О.В., Сулейманов К.Г. Природа и биологическая роль тромбоцитарного катионного белка. Успехи современной биологии. 1997. 3: 10.
 10. Сычева М.В., Рогожин Е.А., Пашкова Т.М. и др. Регуляция антилизосимной активности бактерий антимикробными пептидами из тромбоцитов кур. Российский иммунологический журнал. 2015. Т.9(18): 704-705.
 11. Wilson W., Wade M., Holman S. et al. Status of methods for assessing bacterial cell surface chargeq properties based on zeta potential measurements. J. Microbiol. Meth. 2001. 43: 153-164.
 12. Бондарь О.В., Сайфуллина Д.В., Мавлютова И.И. Мониторинг дзета-потенциала клеток человека при снижении их жизнеспособности и взаимодействии с полимерами. Acta Naturae. 2012. Т. 4: 80-83.
 13. Yu L.M., Yang T.T., Wang X.Q. CecropinA-magainin, a new hybrid antibacterial peptide against meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2015. 46: 218-221.
 14. Koo S.P., Bayer A.S., Kagan B.L. et al. Membrane permeabilization by thrombin-induced platelet microbicidal protein 1 is modulated by transmembrane voltage polarity and magnitude. Infect. Immun. 1999. 67: 2475-2481.
 15. Koo S.P., Yeaman M.R., Nast C.C. et al. The cytoplasmic membrane is a primary target for the staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein. Infect. Immun. 1997. 65: 4795-4800.

Поступила 24.12.2015

(Контактная информация: Сычева Мария Викторовна – к.б.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии и заразных болезней ФГБОУ ВО Оренбургский государственный аграрный университет; адрес: 460014 г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, тел.: 8 (3532) 689713; e-mail: sycheva_maria@mail.ru)

LITERATURA

1. Sanchez M.L., Martinez M.M., Maffia P.C. Natural antimicrobial peptides: pleiotropic molecules in host defense. CellBio. 2013. 2: 200-210.
2. Zhao X., Wu H., Lu H. et al. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. PLoS One. 2013. 8(6): e66557.
3. Wang G., Mishra B., Lau K. et al. Review antimicrobial peptides in 2014. Pharmaceuticals. 2015. 8: 123-150.
4. Gomes A.P., Mano J.F., Queiroz J.A. et al. Incorporation of antimicrobial peptides on functionalized cotton gauzes for medical applications. Carbohydr. Polym. 2015. 127: 451-461.
5. Mathew B., Nagaraj R. Antimicrobial activity of human α -defensin 5 and its linear analogs: N-terminal fatty acylation results in enhanced antimicrobial activity of the linear analogs. Peptides. 2015. 71: 128-140.
6. Chen B., Fan D.Q., Zhu K.X. et al. Mechanism study on a new antimicrobial peptide Sphistin derived from the N-terminus of crab histone H2A identified in haemolymphs of Scylla paramamosain. Fish Shellfish Immunol. 2015. 47: 833-846.
7. Ivanov Y.B., Gritsenko V.A., Kuzmin M.D. The effect of brief exposure to sub-therapeutic concentrations of chlorhexidine digluconate on the susceptibility of staphylococci to platelet microbicidal protein. Surg. Infect. (Larchmt). 2015. 16: 263-266.
8. Sycheva M.V., Shejda E.V., Kartashova O.L. i dr. Antibakterial'nyj spektr trombodefensinov nekotoryh vidov zhivotnyh. Agrarnyj vestnik Urala. 2010. 7(73): 50-51.
9. Buharin O.V., Sulejmanov K.G. Priroda i biologicheskaja rol' trombocitarnogo kationnogo belka. Uspehi sovremennoj biologii. 1997. 3: 10.
10. Sycheva M.V., Rogozhin E.A., Pashkova T.M. i dr. Reguljacija antilizocimnoj aktivnosti

- bakterij antimikrobnymi peptidami iz trombocitov kur. Rossijskij immunologicheskij zhurnal. 2015. T.9(18): 704-705.
11. Wilson W., Wade M., Holman S. et al. Status of methods for assessing bacterial cell surface chargeq properties based on zeta potential measurements. J. Microbiol. Meth. 2001. 43: 153-164.
 12. Bondar' O.V., Sajfullina D.V., Mavljutova I.I. Monitoring dzeta-potenciala kletok cheloveka pri snizhenii ih zhiznesposobnosti i vzaimodejstvii s polimerami. Acta Naturae. 2012. T. 4: 80-83.
 13. Yu L.M., Yang T.T., Wang X.Q. CecropinA-magainin, a new hybrid antibacterial peptide against meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2015. 46: 218-221.
 14. Koo S.P., Bayer A.S., Kagan B.L. et al. Membrane permeabilization by thrombin-induced platelet microbicidal protein 1 is modulated by transmembrane voltage polarity and magnitude. Infect. Immun. 1999. 67: 2475-2481.
 15. Koo S.P., Yeaman M.R., Nast C.C. et al. The cytoplasmic membrane is a primary target for the staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein. Infect. Immun. 1997. 65: 4795-4800.

Образец ссылки на статью:

Сычева М.В., Васильченко А.С., Кульсарин А.А., Рогожин Е.А., Пешкова Ю.И., Карташова О.Л. Применение электроаналитических и сепарационных методов исследования для оценки механизма биологической активности антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 1: 1-8 [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/MVS-2016-1.pdf>).