

## ЭНДОГЕННЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Азимова В. Т., Потатуркина-Нестерова Н. И., Нестеров А. С.

*ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, Россия, azimova\_vera@mail.ru*

Проведен анализ представленных в литературе данных, посвященных эндогенным антимикробным пептидам (АМП) животного происхождения. Показано, что механизм действия антимикробных пептидов универсален и в большинстве случаев связан с нарушением целостности цитоплазматической мембраны клетки-мишени. Это проявляется в губительном воздействии на микроорганизмы, даже в случае наличия у них устойчивости к различным антибиотикам. Способность к производству антимикробных пептидов была обнаружена у многих живых существ, относящихся к различным таксонам: у медуз (*Cyanea capillata*), кольчатых червей (*Arenicola marina*), двустворчатых и брюхоногих моллюсков, у морских звезд (*Asterias rubens*), насекомых (отряды *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Hemiptera*, *Trichoptera* и *Odonata*), представителей классов рыб, земноводных, птиц и др. Это представляет большой интерес, т.к., оказывая антимикробный эффект, АМП не обладают способностью вызывать антибиотикорезистентность, что открывает перспективы для разработки рациональных методов антибиотикотерапии.

Ключевые слова: эндогенные антимикробные пептиды, механизм действия, продуценты пептидов, таксоны животных, антибиотикотерапия.

## ENDOGENOUS ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF ANIMAL ORIGIN

Asimova V. T., Potaturkina-Nesterova N. I., Nesterov A. S.

*Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia, azimova\_vera@mail.ru*

The analysis of the submitted data in the literature on endogenous antimicrobial peptidam (amp) of animal origin. It is shown that the mechanism of action of antimicrobial peptides is universal and in most cases linked to the violation of the integrity of the cytoplasmic membrane of the target cell. This is evident in the disastrous effects on microorganisms, even if they have no resistance to various antibiotics. The ability to produce antimicrobial peptides have been found in many living things, belonging to different taxa: jellyfish (*Cyanea capillata*) annelid worm (*Arenicola marina*), bivalve and gastropods molluscs, starfish (*Asterias rubens*), insects (*Lepidoptera*, *Diptera* squads, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Trichoptera*, *Odonata* and *Hemiptera*), of classes of fish, amphibians, birds, etc. This is of great interest because providing antimicrobial effect AMP does not have the ability to cause resistance to antibiotics, which opens up prospects to develop sound methods of antibiotic therapy.

Keywords: endogenous antimicrobial peptides, mechanism of action, producers of animal taxa peptides, antibiotics.

В 1956 году Robert C. Skarnes и Dennis W. Watson описали вещества, выделяемые полиморфоядерными лейкоцитами кролика. Позднее Н. И. Зева и John K. Spitznagel показали, что эти вещества относятся к одному молекулярному семейству антимикробных протеинов, названных дефензинами [1]. Это открытие ознаменовало начало новой эры в развитии медицины и антибиотикотерапии в частности. Установлено, что механизм действия антимикробных пептидов универсален, что позволяет им быть губительными даже для микроорганизмов, выработавших устойчивость к различным антибиотикам [12].

Молекулярный механизм антибиотического действия АМП в большинстве случаев связан с нарушением целостности цитоплазматической мембраны. Предложены три основные модели, описывающие механизмы нарушения барьерных функций клеточной

мембраны в присутствии АМП. Согласно первой из них, названной моделью «бочки из клепок» («barrel-stave» model), молекулы АМП, обладающие, как правило, суммарным положительным зарядом, гидрофобностью и амфифильностью, внедряются в мембрану и формируют олигомерные ионные каналы или поры, внутренняя поверхность которых образована гидрофильными аминокислотными остатками [15].

Другая модель, именуемая «тороидальной», основывается на описании формирования тороидальной поры («toroidal pore» model). Главное отличие этой модели от предыдущей заключается в том, что внутренняя гидрофильная поверхность каналов включает не только катионные участки АМП, но и анионные головки фосфолипидов. Преимуществом этой модели является более высокая стабильность комплекса за счет электростатических взаимодействий АМП и липидов [19]. Третья модель, именуемая ковровой («carpet» model), основана на детергентоподобном действии АМП при высоких концентрациях пептидов: с увеличением их концентрации, положительно заряженные частицы пептидов равномерно покрывают клеточную мембрану, создавая молекулярный «ковёр». Постепенно клеточная мембрана утрачивает свою стабильность, в ней образуются разрывы, в результате чего клетка разрушается.

Результатом всех указанных механизмов является нарушение барьерной функции клеточной мембраны. При этом многие антимикробные пептиды губительны только для микроорганизмов и не нарушают целостность клеток организма, из которого данный пептид был получен. Избирательность действия АМП объясняется различиями биохимического состава и электрофизиологических свойств мембран микробов и клеток организма-хозяина [20], что делает возможным применение антимикробных пептидов в медицине.

Способность к производству антимикробных пептидов была обнаружена у многих живых существ, относящихся к различным таксонам. Так, например, в тканях сцифоидной медузы *Cyanea capillata*, представителя класса сцифоидных медуз типа кишечнополостные, были обнаружены фракции белков, обладающих антимикробной активностью в отношении грамотрицательной *Escherichia coli*. С помощью аналитического электрофореза в кислой буферной системе было определено, что выделенный пептид обладал молекулярной массой и зарядом при pH 2, близкими к молекулярной массе и заряду дефензина кролика NP-2 [7]. В настоящее время проводится работа по определению структуры молекул и генов полученных пептидов, на основе чего можно будет судить о принадлежности этих пептидов к какому-либо из известных классов АМП.

Антимикробные пептиды были выявлены у кольчатых червей. К примеру, из целоцитов морского червя пескожила (*Arenicola marina*) выделены два пептида, названных ареницинами [9]. Молекула Ареницина представляет собой

немодифицированную пептидную цепь, содержащую 21 аминокислотный остаток и стабилизированную одной дисульфидной связью, замыкающей цикл из 18 аминокислотных остатков. Эта структурная особенность дает большие преимущества при получении биологически активной субстанции или аналогов заявляемых пептидов вследствие снижения риска неправильного замыкания дисульфидных связей [8]. По своей антибиотической активности ареницины имеют широкий спектр действия: в условиях *in vitro* инактивируют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, а также низшие грибы.

Антимикробные пептиды были также обнаружены в гемоцитах двустворчатых и брюхоногих моллюсков, зараженных трематодами различных семейств [11]. Исследования показали, что заражение моллюска трематодами *Cotylurus sp.* и *Notocotylus sp.* приводит к увеличению содержания в гемолимфе животного гранулоцитов. Такой же результат был получен в эксперименте с двустворчатыми моллюсками при иммунизировании их бактериями *Salmonella typhimurium*, что объясняется наличием в гранулоцитах антимикробных пептидов (дефензинов и митицинов). Показано, что эти вещества скапливаются в особых гранулах в цитоплазме гранулоцитов, а после фагоцитоза они оказываются в фаголизосомах вместе с поглощенными бактериями [18, 22].

В настоящее время проводится изучение антимикробных пептидов из целомоцитов морской звезды *Asterias rubens*. В результате исследований впервые было выделено несколько пептидов с различными молекулярными массами. Изучение N-концевой аминокислотной последовательности выявило 100 % гомологию с актином морской звезды *Pisaster ochraceus*. Участие фрагментов актина в защитных реакциях организма ранее не было описано в литературе [9].

Большое количество антибактериальных пептидов обнаружено у насекомых. К примеру, у *Drosophila melanogaster* были обнаружены гены 20 антимикробных пептидов, и их продукты были сгруппированы в семь семей: аттацины, цекропины, дефензины, диптерицины, дрозомидины, дрозотины и мечниковин [19]. Индуцированные антимикробные пептиды, цекропины были выделены из гемолимфы оспоренных бактериями куколок шелкопряда *Hyalophora cecropia* [24]. С тех пор пептиды с антибактериальной активностью были очищены и описаны во многих других отрядах насекомых: *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Hemiptera*, *Trichoptera* и *Odonata* [5, 17].

В 2007 году из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaevi* был синтезирован аналог латарцинов Ltc1 и Ltc3b, антимикробных пептидов, способных формировать амфифильные структуры в мембранном окружении без участия дисульфидных связей. Последовательности аналогов соответствуют незрелым формам этих пептидов и содержат по одному дополнительному C-концевому аминокислотному остатку. Изучение взаимодействия

синтезированных пептидов с модельными мембранами показало, что его характер зависит от липидного состава мембран. Установлено, что аналог латарцина 3b наиболее активен в отношении мембран, содержащих холестерин. На основании полученных результатов обсуждается механизм действия исследованных антимикробных пептидов на мембраны [6].

Ряд антимикробных пептидов описан для представителей классов рыб. Данные пептиды были выделены из кожи, кожных слизистых секретов и слизистой оболочки кишечника рыб [1]. Так, из крови русского осетра (*Acipenser guldenstadti*) были получены пептиды, обладающие антимикробной активностью широкого спектра действия. Результаты исследования показали, что выделенные пептиды обладают выраженной способностью ингибировать рост грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ML35p, грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes* EGD, а также грибка *Candida albicans* 820 [14]. В настоящее время проводится анализ структуры полученных пептидов для установления их принадлежности к какой-либо группе из уже известных АМП.

В коже земноводных антимикробные пептиды были впервые обнаружены в 1987 году. Эти пептиды, состоящие из 23 аминокислотных остатков, получили название магаинины I и II. Впоследствии из кожных и гастроэнтеральных желёз шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* были выделены и другие представители семейства мегаининов: PGLa, фрагмент предшественника ксенопсина XPF, пептид из железистого эпителия желудка PGO и ряд других пептидов. Также пептиды были выявлены и у других родов лягушек: у рода *Rana* – бревенин, *Bombina* – бомбинин и у *Phylomedusa* – дермасептин [10]. Все перечисленные пептиды в физиологических концентрациях неактивны по отношению к клеткам эукариот, но сдерживают рост бактерий и грибов, а также способны индуцировать осмотический лизис простейших.

У птиц выделяют два семейства антимикробных пептидов: дефензины и кателицидины. Среди дефензинов наиболее широко распространены  $\beta$ -дефензины. Уже на ранних этапах исследований у цыплят идентифицировали четыре вида  $\beta$ -дефензинов, известных как галлинацины [16]. Данные пептиды обнаруживались в гетерофилах цыплят и различных эпителиальных тканях. Галлинацины оказывали антибактериальное воздействие на *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.*, *Clostridia sp.* и *Escherichia coli*, а также *Listeria monocytogenes* и *Candida albicans* [26]. Выявлено, что галлинацины участвовали в адаптивной эволюции и были одним из механизмов приспособления животных и птиц к новым условиям обитания и растущему разнообразию патогенов.

К 1985 году стало известно, что и млекопитающие, в том числе человек, могут выделять антимикробные пептиды [1]. А именно, дефензины, кателицитины и гистатины. Основными продуцентами антимикробных пептидов в организме млекопитающего являются

кератиноциты, эпителиоциты слизистых оболочек кишечника, респираторного тракта, мочеточников, репродуктивного тракта, макрофаги, моноциты, дендритные клетки [3, 4]. АМП (семейство гистатинов) могут также синтезироваться ацинарными клетками околоушной и поднижнечелюстной железами и выделяться со слюной [23]. Антимикробные пептиды вырабатываются организмом постоянно, но многие из них активируются лишь при воспалении или повреждении органов. Поэтому одной из основных целей современной науки является поиск веществ, стимулирующих выброс антимикробных пептидов в организме человека и животных, и изучение возможности применения на практике их искусственно синтезируемых аналогов.

Таким образом, антимикробные пептиды встречаются у представителей многих таксонов: от кишечнорастворимых до человека. Это представляет большой, как теоретический (понимание механизмов эволюции молекулярных факторов врожденного иммунитета), так и прикладной интерес. Особый интерес представляет антимикробный эффект пептидов, т.к., по сравнению с применяемыми антибактериальными химиопрепаратами, антимикробные пептиды обладают более широким спектром действия, более низкой минимальной бактерицидной концентрацией и отсутствием к ним резистентности у патогенных микроорганизмов. Это даёт преимущество пептидам животного происхождения, обладающим антибактериальным действием, и открывает перспективы для разработки рациональных методов использования антимикробных препаратов.

### Список литературы

1. Абатуров А.Е. Катионные антимикробные пептиды системы неспецифической защиты респираторного тракта: дефензины и кателицидины. Дефензины – молекулы, переживающие ренессанс (часть 2) // Здоровье ребенка. – 2011. – Т. 7. – С. 34.
2. Азимова В.Т. Эндогенные антимикробные пептиды человека / В.Т. Азимова, Н.И. Потатуркина-Нестерова, А.С. Нестеров // Современные проблемы науки и образования. – 2015. - № 1; URL:<http://www.science-education.ru/121-17746> (дата обращения 05.03.2015).
3. Будихина А.С., Пинегин Б.В. Дефензины – мультифункциональные катионные пептиды человека // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – №. 2. – С. 31.
4. Буряк А.К., Срибная О.С., Пурьгин П.П. Изучение пептидного состава антибактериально активных фракции методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56. – №. 3. – С. 387-396.

5. Василевский А.А. и др. Синтетические аналоги антимикробных пептидов из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaevi* // Биоорганическая химия. – 2007. – Т. 33. – №. 4. – С. 405-412.
6. Комелев А.В. и др. Изучение физико-химических и функциональных свойств антимикробных пептидов сцифоидной медузы *Cyanea capillata* // Вестник СПбГУ. Серия 3: биология. – 2010. – № 2. – С. 68-74.
7. Пептиды ареницины, выделенные из морского кольчатого червя *Arenicola marina*, обладающие антимикробным действием // [http://www.ntpo.com/patents\\_medicine/medicine\\_6/medicine\\_2202.shtml](http://www.ntpo.com/patents_medicine/medicine_6/medicine_2202.shtml) (Дата обращения 11.08.2015).
8. Петрова Т.А., Кокряков В.Н., Кулева Н.В. Исследования кафедры биохимии, проводимые на морской биологической станции СПбГУ //30 лет морской биологической станции Санкт-Петербургского университета: итоги и перспективы. – 2005. – С. 51.
9. Погребной П. В. Эндогенные пептидные антибиотики как факторы иммунитета животных //Биополимеры и клетка. – 1998. – Т. 14. – №. 6. – С. 512.
10. Прохорова Е.Е., Атаев Г.Л. Защитные реакции моллюсков семейства Planorbidae (Gastropoda, Pulmonata) на трематодную инвазию.
11. Степанов Ю.М. и др. Аргинин в медицинской практике (обзор литературы) // Журн. АМН України. – 2004. – Т. 10. – №. 2. – С. 339-351.
12. Торчинский Ю.М. Сера в белках. – М., 1977. – 123 с.
13. Шамова О. В. и др. Антимикробные пептиды из лейкоцитов русского осетра (*Acipenser guldenstadti*) //Фундаментальные исследования. – 2006. – №1.
14. Antibiotikum// <https://de.wikipedia.org/wiki/Antibiotikum> (дата обращения 14.08.2015).
15. Evans E.W., Beach G.G., Wunderlich J., Harmon B.G. Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. *J Leukoc Biol*, 1994, 56: 661–665.
16. Hetru C., Hoffmann D., Bulet P. (1998) in: Molecular mechanisms of immune responses in insects (Brey P.T., Hultmark D., eds) Chapman & Hall, London, pp. 40–66.
17. Humbert E., Coustau C. Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance in the *Biomphalaria glabrata* – *Echinostoma caproni* system // *Journal of Parasitology*. 2001. 122. 651–660.
18. Irving P., Troxler L., Hetru C. (2004) *CR Biol.*, 327, 557–570.
19. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. // *Biophys J*. 2001. V. 81. № 3. P. 1475–1485.
20. Matsuzaki K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1462. № 1–2. P. 1–10.
21. Parisi M.-G., Lia H., Jouveteau L. B. P., Dyrindac E. A., Parrinello N., Cammarata M., Rocha P. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria //

Fish & Shellfish Immunology. 2008. 25 (6). 834–840.

22. Rabinovich O.F., Rabinovich I.M., Abramova E.S. Изменение микробной флоры при патологии слизистой оболочки рта // Stomatologia (Mosk). – 2011. – Т. 6. – С. 71.

23. Shai Y. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1462. № 1–2. P. 55–70.

24. Sugiarto H., Yu P.-L. Avian antimicrobial peptides: the defence role of beta defensins. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 323: 721–727.

25. Tenover FC. Novel and emerging mechanisms of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens. Am J Med 1991; 91(suppl B):76S-81S.

**Рецензенты:**

Слесарев С.М., д.б.н., доцент, зав. кафедрой биологии, экологии и природопользования, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск;

Кан Н.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой последипломного образования и семейной медицины, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск.