

На правах рукописи



Ремизов Евгений Кириллович

**РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ПЕПТИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
ЛИЧИНОК *GALLERIA MELLONELLA* И *MUSCA DOMESTICA* И ИЗУЧЕНИЕ ИХ
БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Саратов – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Ларионова Ольга Сергеевна

Официальные оппоненты:

Сычева Мария Викторовна, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет», заведующий кафедрой микробиологии и заразных болезней

Генералов Сергей Вячеславович, кандидат биологических наук, ФКУЗ научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" Роспотребнадзора, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактических иммуноглобулинов

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина»

Защита состоится «__» _____ 2020 года в __00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.07 на базе Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, учебный комплекс № 3, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ» и на сайте www.sgau.ru

Отзывы направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная площадь, д. 1. e-mail: karpuninal@mail.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
профессор

Карпунина Лидия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В современных условиях интенсификации сельского хозяйства промышленное разведение животных предполагает использование антибактериальных препаратов, направленных на профилактику инфекционных заболеваний. Однако неконтролируемое использование антибиотиков приводит к селекции антибиотикорезистентных штаммов, следует отметить, что терапия заболеваний вызываемых этими штаммами затруднена. Пептиды насекомых обладают барьерной функцией и способны защищать макроорганизм от различных патогенных агентов. В процессе эволюции насекомые сформировали огромный потенциал с большой разновидностью пептидов, как результат они являются наиболее перспективным источником для поиска новых агентов, обладающих широким спектром фармакологического действия (Wang G. et al., 2015). Антимикробные пептиды (АМП) способны оказывать негативное воздействие на бактерии, микроскопические грибы, а также, согласно последним исследованиям, обладают противоопухолевой активностью. Кроме этого, АМП способны вызывать эффективный киллинг вирусов, обладают потенциально низкой возможностью селекции антибиотикорезистентных штаммов, оказывают сопутствующий спектр противовоспалительных свойств (Gennaro R. et al., 2002; Diamond, G. et al., 2009).

В этой связи выделение, изучение антимикробных пептидов и исследование их биологических свойств позволит не только решить задачи фундаментального характера, но и создаст предпосылки к разработке антибактериальных препаратов нового поколения на их основе.

Отдельные антимикробные пептиды обладают цитотоксическим эффектом и поэтому могут быть использованы при лечении заболеваний слизистых оболочек, покровных тканей животных, действуя на животные клетки, без введения в кровь пациента. Такие пептиды активно используются для создания новых лекарственных препаратов.

В настоящее время имеются сведения об антимикробных пептидах, свойствах, спектре и механизме их действия, однако систематизировать эти знания на данный момент не удалось, вследствие недостаточности фактического материала. Список изученных в этом отношении видов живых организмов слишком мал, чтобы делать обобщения, касающиеся больших систематических групп. Кроме того, требуется сравнение спектров действия антимикробных пептидов разных видов, принадлежащих к разным таксонам, а также изучение специфичности их действия в отношении спектра микробов, контактирующих с данным видом организмов в естественных условиях.

Научно-исследовательская работа по выделению наиболее перспективных АМП позволит решить проблемы нарушения микробиоценозов живых организмов, будет способствовать терапии заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами, и может использоваться для профилактики заболеваний различной этиологии.

Таким образом, изучение антимикробной активности пептидов, выделенных из различных насекомых, зависимости их биологической активности от фазы развития насекомого и его вида, а также разработка экспериментальной технологии их индивидуального получения позволит пополнить сведения о АМП, которые станут основой для экспериментальной разработки антимикробных препаратов нового поколения.

Степень разработанности темы исследования. Имеющиеся в открытой печати литературные сведения подтверждают целесообразность использования насекомых для получения антимикробных пептидов, в частности имеются данные о влиянии некоторых АМП животного происхождения на ряд патогенных микроорганизмов. В частности, подобными исследованиями занимались такие ученые, как R. Davis, 2009; G. Maisetta, 2010; M. Ashby, 2014. В отдельных работах изучалось влияние АМП на *Salmonella typhimurium*, воздействие АМП на организм животных, влияние АМП, получаемых из кишечника животных на некоторые бактерии. В литературных источниках также имеются доказательства того, что использование насекомых в целях извлечения из них АМП, является приоритетным вектором в работах по поиску противомикробных препаратов. Вместе с тем, более поздними исследованиями ученых G. Guo 2017; M. Tonk, 2017; V. Machado, 2020 детально изучался механизм действия антимикробных пептидов в целом, а также перспективы использования АМП в медицинских целях. В этой связи выбор темы работы был обусловлен актуальностью данных исследований и недостаточностью сведений по получению антимикробных пептидов из насекомых *Galleria mellonella* и *Musca domestica*, а также изучение их антимикробного действия на различные штаммы микроорганизмов.

Цель работы – выделение пептидов из биомассы личинок *G. mellonella*, *M. domestica*, изучение их антимикробной активности и биотрансформации в организме белых мышей.

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработка методики пробоподготовки биомассы личинок для получения белковых фракций.
2. Разработка методики проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для разделения белковых фракций.
3. Изучение антимикробной активности полученных пептидов различными

способами.

4. Исследование биотрансформации пептидов в организме лабораторных животных.

Научная новизна. Разработана оригинальная методика получения водорастворимых пептидов из биомассы личинок. Установлено, что для получения фармацевтической композиции на основе антимикробных пептидов необходимо соблюдение трех основных стадий: высаливания, хроматографического разделения и создания конечной фармацевтической композиции. Доказана антимикробная активность пептидов, выделенных из *G. mellonella* и *M. domestica* по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P), *Salmonella typhimurium* 1626, *Candida albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Escherichia coli* 1027. Выявлены пептиды 3 и 6, выделенные из *G. mellonella*, обладающие наиболее высокой антимикробной активностью. Пептид 3 ингибировал рост микроорганизмов *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) в концентрации 0,18 мг/л; пептид № 6 проявлял антимикробную активность в концентрации 0,111 мг/л по отношению к *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *E. coli* 1027, *B. cereus* ATCC 10702, *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653. Пептид 4.2, выделенный из биомассы личинок *G. mellonella*, обладал антимикробной активностью к *E. coli* 1027 в концентрации 10 мг/л. Установлено, что АМП, меченые флюоресцеин изотиоционатом (ФИТЦ), спустя сутки после внутримышечного и внутрибрюшинного введения белым нелинейным мышам, локализуются, главным образом, в печени и селезенке.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные нами данные по метаболизации антимикробных пептидов в организме лабораторных мышей при различных способах введения представляет теоретическую значимость для дальнейших исследований. Таким образом, проведенные исследования создают предпосылки к созданию препаратов на основе антимикробных пептидов *G. mellonella* и *M. domestica*. По материалам диссертационной работы получен патент на изобретение: Композиция антимикробных пептидов, полученных из личинок *M. domestica*, и способ ее получения (№ 2018142602 от 04.12.2018). Разработаны способы культивирования имаго и выращивания личинок *G. mellonella* и *M. domestica*. В работе представлена оригинальная методика выделения водорастворимых пептидов из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica*. Разработанный нами алгоритм получения антимикробных пептидов может быть использован в дальнейших исследованиях по конструированию противомикробных препаратов на основе АМП. Результаты исследований используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторных занятий со студентами факультета ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий ФГБОУ ВО «Саратовский

государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Методология и методы исследований. Методология данного диссертационного исследования заключалась в поиске способов получения пептидов из личинок некоторых насекомых, подборе способов для максимально эффективной их экстракции из биомассы личинок, исследования каждой полученной фракции белка на наличие антимикробной активности. Для достижения цели диссертационной работы, обоснования ее теоретической и практической значимости нами был использован комплекс сертифицированных методов, включающих физико-химические, микробиологические, морфологические, статистические.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оригинальная методика пробоподготовки для получения фракций водорастворимых пептидов, включает в себя гомогенизацию биомассы личинок, экстракцию, центрифугирование, многократное высаливание сульфатом аммония.
2. Оптимальные условия для разделения водорастворимых пептидов: 80 мм при скорости потока 1 мл/мин и длине волны 280 нм, на колонке BioSep SEC S-2000 300x7, время хроматографирования 60 мин, объем вводимой пробы 20 мкл и температуре 25 °С.
3. Пептиды, выделенные из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica* оказывали ингибирующее действие на *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027.
4. Накопление АМП, было выявлено в основном, в печени и селезенке через сутки после внутримышечного и внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ, белым нелинейным мышам. Отмечали интенсивное свечение при внутримышечном введении в костном мозге.

Работа выполнена на кафедре микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность результатов подтверждена значительным объемом экспериментальных данных с подтверждением их методами математической статистики.

Материалы диссертации были представлены на: Международном конкурсе инноваций «Молодой Учёный Alltech (2018)», где работа стала региональным победителем (Европа-Азия); Международной конференции BIT's 9th Anniversary World DNA Day – 2018 (Китай, Далянь); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России на II этапе работа заняла 1 место (Киров, 2018); Национальной научно-практической конференции в ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им Н. И. Вавилова (Саратов,

2018); Конкурсе научно-инновационных работ молодых ученых и студентов СГАУ (Грант Ректора) работа заняла 2 место (Саратов, 2018); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России на III этапе работа заняла 1 место (Оренбург, 2018); XXIII Агропромышленном форуме юга России и выставке «Интерагромаш» «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса», посвященной 90-летию ДГТУ (РИСХМ) (Ростов-на-Дону, 2020).

Публикации. Основные результаты отражены в 7 публикациях, из них 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК РФ и 1 патент РФ.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Автору данной работы принадлежат подготовка, организация и осуществление, физико-химических, микробиологических, морфологических исследований, непосредственное участие в обсуждении полученных результатов и их формулировке, написании выводов, подготовке публикаций и патента.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованных литературных источников, содержащего 165 наименований, в том числе 135 иностранных научных работ. Работа представлена на 99 страницах, иллюстрирована 21 таблицей и 32 рисунками.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект, материалы и методы исследований

Биологическими объектами для проведения исследования явились следующие виды насекомых: большая восковая моль *Galleria mellonella* и комнатная муха *Musca domestica*.

Методика содержания и выращивания биомассы восковой моли

Galleria mellonella

В лаборатории кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» для проведения исследований был оборудован специальный инсектарий, в котором стабильно поддерживался температурный режим на уровне от 28 до 35 °С без проникновения солнечного света, относительная влажность воздуха составляла от 70 до 80 %. Помещение инсектария оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Большую восковую моль содержали в садках. Садок для содержания имаго восковой моли представлял собой герметичный контейнер (35×15×10 см) из древесины с плотно закрывающейся верхней частью, и при необходимости сдвигающейся прозрачной крышкой из оргстекла (35×13×3

см) с многочисленными вентиляционными отверстиями маленького диаметра, обеспечивающими достаточное количество воздуха для жизнедеятельности *G. mellonella*. Конструкция данного пенала позволяла максимально эффективно контролировать стадии развития восковой моли, наличие корма и без лишней необходимости тревожить насекомых. Культивировали личинок большой восковой моли до стадии окукливания.

Методика содержания и выращивания биомассы *Musca domestica*

Имаго *M. domestica* содержали в специальных садках, оборудованных в инсектарии кафедры, где стабильно поддерживалась температура воздуха около 27 – 30 °С и относительная влажность 70 %. В помещении инсектария была оборудована приточно – вытяжная вентиляция. Для кормления *M. domestica* использовали белковые и углеводные и корма. Поение, кормление и получение биомассы производили в садке.

Методика выделения водорастворимых пептидов из личинок

Galleria mellonella* и *Musca domestica

Выделение водорастворимых пептидов, полученных из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica*, проводили методом холодной экстракции по разработанной нами оригинальной методике.

Методика разделения водорастворимых пептидов методом ВЭЖХ

Полученные фракции были проанализированы и разделены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение, и определение производилось методом ВЭЖХ с предварительным поиском оптимального набора растворителей и условий для проведения хроматографирования. Для этого 20 мкл исследуемого раствора с помощью микрошприца вводили в хроматографическую колонку. Время анализа для одной пробы занимало 60 мин, поток 1 мл/мин.

Определение содержания белка и молекулярной массы выделенных пептидов

Содержание белка в испытуемых образцах определяли по методу Лоури. Для построения калибровочной кривой используют бычий альбумин. Для каждого вновь приготовленного реактива Фолина строили новый калибровочный график.

Концентрацию белка анализируемых фракций определяли колориметрическим методом по Лоури на спектрофотометрическом оборудовании фирмы «ShimadzuUV-1280» при длине волны 450 нм. Молекулярную массу выделенных пептидов определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-Na) с использованием камеры Helicon и блока питания BIO-RAD.

Методика определения антимикробной активности

Антибактериальную активность определяли согласно методике МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания (МУК 4.2.1890-04, 2004). Изучение антибактериальной активности проводили макро- и микрометодом. Кроме этого использовали ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар.

В исследованиях использовали следующие культуры микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* шт. ATCC 6538 (209-P); *Salmonella typhimurium* шт. 1626, которые были получены из государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора; *Bacillus cereus* шт. ATCC 11778, предоставленный ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»; *Candida albicans* шт. РКПГУ-401/NCTC-885-65, *E. coli* 1027, полученные из лаборатории «Российская коллекция патогенных грибов» ГБОУ ВПО Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России.

Изучение биотрансформации пептидов в тканях и органах белых мышей

Исследования проводили на базе центра коллективного пользования «Симбиоз» с применением научного оборудования в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (г. Саратов).

Объектом исследования служили белые нелинейные мыши ($n = 10$), массой 20 г. Первым пяти мышам ($n = 5$) антимикробные пептиды, меченные ФИТЦ, вводили внутримышечно в область бедра в дозе 100 мкл, оставшимся мышам ($n = 5$) препарат вводили внутривентрально в дозе 100 мкл. Спустя сутки методом транслокации шейных позвонков под эфирным наркозом проводили эвтаназию. После чего были взяты мазки-отпечатки почки, печени, селезенки, костного мозга и мазок крови.

Микроскопирование мазков-отпечатков проводили на флуоресцентном микроскопе «Leica DMi 3000B» с применением ультрафиолетового фильтра. Анализ и поиск поля зрения изображения достигался при помощи видеокамеры Leica DFC420C, а также программного обеспечения Leica Application Suite.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение пептидов, полученных из личинок *Galleria mellonella* и *Musca domestica*

Разработанная нами методика включала в себя следующие этапы: гомогенизация биомассы личинок, экстракция, центрифугирование, высаливание сульфатом аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, повторное растворение, высаливание сульфатом аммония.

Разделение водорастворимых пептидов методом ВЭЖХ и изучение их физико-химических свойств

Разделение водорастворимых пептидов проводили с использованием колонки SEC S-2000 300 × 2120 мм фирмы BioSep при скорости потока 1 мл/мин и длине волны 280 нм с применением в качестве подвижного растворителя 0,1 М фосфатно-солевого буферного раствора, время хроматографирования составляло 60 минут, объем вводимой пробы 1575 мкл и температуре колонки 25 °С. Данная скорость потока является оптимальной для разделения пептидов, полученных из биомассы личинок. Уменьшение скорости потока подвижной фазы не приводит к лучшему разделению фракций, однако, увеличивает время анализа, а увеличение скорости потока приводит к объединению фракций.

Таким образом, используя метод разделения пептидов, с применением в качестве элюента фосфатно-солевого буфера, получали фракции водорастворимых пептидов, которые использовали в дальнейших исследованиях.

По разработанной нами методике было получено 46 фракций водорастворимых пептидов из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica*. После разделения пептидов проводили диализ на протяжении 24 часов против 0,9% раствора хлорида натрия. Концентрация белка, выделенных пептидов варьировала от 0,04-94,86 мг/мл. При изучении молекулярной массы, было выявлено, что она находилась в диапазоне 3,4-6 кДа.

Определение антимикробной активности макрометодом

Антимикробная активность полученных белковых фракций, выделенных из биомассы личинок *G. mellonella* была изучена по отношению к ряду групп Грам+, Грам- микроорганизмов, а именно *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *Candida albicans* РКПГУ-401/NCTC-885-653, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027.

По данным ВОЗ микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* принадлежат к первой критической группе, имеющей множественную лекарственную устойчивость среди трех «критических, высоких и средних» приоритетных групп, требующих разработки новых антибиотиков (Taccsonelli E. et al., 2017). Кроме этого, согласно, этого списка *S. aureus* относится к группе с высоким приоритетом селекции антибиотикорезистентности.

Следовательно, выбор некоторых штаммов, принадлежащих к данным группам, для проведения исследований на антибактериальную активность пептидов очевиден.

Первоначально, было проведено определение антимикробной активности пептидов *G. mellonella* на стадии до окукливания и после окукливания.

Данный эксперимент проводили макрометодом с внесением белковых фракций в жидкую питательную среду. Для каждой культуры микроорганизмов и каждой концентрации эксперимент был выполнен в трех повторностях. По результатам исследований было выявлено, что белковая фракция № 3 имела антимикробную активность в концентрации 0,18 мг/л по отношению к *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P). Белковая фракция № 6 имела антимикробную активность в концентрации 0,111 мг/л по отношению ко всем группам исследуемых микроорганизмов.

Аналогичные данные при исследовании антимикробной активности белковых фракций из биомассы личинок *G. mellonella* на стадии окукливания. Поскольку принципиальных отличий в антимикробной активности пептидов в зависимости от стадии развития личинок не было обнаружено, таким образом, в дальнейших исследованиях этот факт не учитывали.

Таблица 1 – Антимикробная активность белковых фракций № 1 - 7 (*G. mellonella*)

Фракция белка	Штаммы микроорганизмов			
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>C. albicans</i> РКПГУ– 401/NCTC– 885-653	<i>B. cereus</i> ATCC 10702
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	+	-	+	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	+	+	+	+
7	-	-	-	-

Примечание – ‘+’- бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов)

‘-’ – бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

Далее этим же методом были проанализированы следующие пептиды, выделенные из биомассы личинок *G. mellonella* № 2.1-2.7 и 3.1-3.7. Для данного эксперимента

использовали культуры следующих штаммов: *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *B. cereus* ATCC 10702. Для каждой культуры микроорганизмов и каждой концентрации эксперимент был выполнен в трех повторностях. Пробирки помещали в термостат при температурном режиме 37 °С в течение 24 часов. По истечению времени производили учет результатов.

В результате изучения антимикробной активности макрометодом было установлено, что пептиды № 2.3 и 2.6 ингибируют рост штамма *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), пептид № 2.6 – *S. typhimurium* 1626. Пептиды № 2.3 и 2.6 обладают активностью по отношению к штамму *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, № 2.6 – *B. cereus* ATCC 10702. Антимикробная активность пептидов № 2.1; 2.2; 2.4; 2.5 и 2.7 не была выявлена (Таблица 2).

Таблица 2 – Антимикробная активность белковых фракций № 2.1 - 2.7 (*G. mellonella*)

Белковые фракции	Штаммы микроорганизмов			
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>C. albicans</i> РКПГУ– 401/NCTC–885- 653	<i>B. cereus</i> ATCC 10702
2.1	–	–	–	–
2.2	–	–	–	–
2.3	+	–	+	–
2.4	–	–	–	–
2.5	–	–	–	–
2.6	+	+	+	+
2.7	–	–	–	–

Примечание – ‘+’- бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов)

‘-’ – бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

В результате изучения антимикробной активности пептидов 3.1-3.7 было установлено, что антимикробной активностью в отношении штамма *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) обладают пептиды № 3.4 и 3.6. Пептиды № 3.2 и 3.6 ингибируют рост штамма *S. typhimurium* 1626, пептиды № 3.3 и 3.6 – *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653. В отношении штамма *B. cereus* ATCC 10702 антимикробную активность проявляют пептиды № 3.2, 3.6 и 3.7 (Таблица 3).

Таблица 3 – Антимикробная активность белковых фракций № 3.1 - 3.7 (*G. mellonella*)

Белковые фракции	Микроорганизмы			
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>C. albicans</i> РКПГУ– 401/NCTC–885- 653	<i>B. cereus</i> ATCC 10702
3.1	–	–	–	–
3.2	–	+	–	+
3.3	–	–	+	–
3.4	+	–	–	–
3.5	–	–	–	–
3.6	+	+	+	+
3.7	–	–	–	+

Примечание – «+» - бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов);

«–» - бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

Антимикробную активность белковых фракций 1-6, выделенных из биомассы личинок *Musca domestica* определяли аналогичным методом. Было выявлено, что белковая фракция 2 обладала антимикробной активностью по отношению *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *B. cereus* ATCC 10702.

Таблица 4 – Антимикробная активность белковых фракций, выделенных из биомассы личинок *Musca domestica*

Фракция белка	Микроорганизмы			
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>C. albicans</i> РКПГУ– 401/NCTC–885- 653	<i>B. cereus</i> ATCC 10702
1	-	-	-	-
2	+	+	+	+
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-

Примечание – ‘+’- бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов);

‘-’ – бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

Определение антимикробной активности диффузным методом

На данном этапе исследований для определения антимикробной активности выделенных нами пептидов был использован метод диффузии препарата в агар.

Этим методом были проанализированы 4 белковых фракции, выделенные из биомассы личинок *Galleria melonella*.

Антимикробную активность определяли на плотных питательных средах по отношению к патогенным микроорганизмам таким как: *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *E. coli* 1027, *B. cereus* ATCC 10702, *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653. Нами было установлено, что наиболее эффективно действовал пептид 1.2 на грамотрицательные микроорганизмы, а наиболее эффективными концентрациями по отношению к грамположительным явились – 0,65 мг/л для *S. aureus* ATCC 6538(209-P) и 2.5мг/л для *B. cereus* ATCC 10702, где наблюдалась максимальная задержка роста бактерий.

Для *S. typhimurium* 1626 при концентрации пептида 1.2 - 1.25 мг/л результаты антимикробной активности были сопоставимы с некоторыми бета-лактамными антибиотиками на микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*. В представленной ниже таблице 5 отображены показатели данных полученных в результате эксперимента.

Таблица 5 – Зоны задержки роста микроорганизмов, мм

Концентрация	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>S. aureus</i> ATCC 6538(209-P)	<i>B. cereus</i> ATCC 10702
10мг/л	10±0,9	-	-
5мг/л	15±1,1	-	15±1,8
2.5мг/л	20±1,3	-	19±1,6
1.25мг/л	27±1,4	11±0,8	14±0,9
0.625мг/л	25±1,7	12±0,9	13±1
0.31мг/л	21±1	10±1,2	10±1,1

Таким образом, пептид 1.2 обладал антимикробной активностью в большей степени к штаммам *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702.

Определение антимикробной активности микрометодом

Для определения антимикробной активности микрометодом были использованы пептиды 4.1; 4.2 и 6.1, выделенные из личинок большой восковой моли.

Для данного эксперимента использовали культуры *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538(209-P), *E. coli* 1027, *B. cereus* ATCC 10702.

В лунки планшетов вносили инокулюмы микроорганизмов, после чего к ним

добавляли испытуемые пептиды в следующих концентрациях: 0,15; 0,31; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 мг/л. Для каждого штамма микроорганизмов и каждой концентрации, эксперимент выполнялся в трех повторностях. Заполненные планшеты укладывали в термостат при установке температуры 37 °С и через 24 часа производили учет.

Анализируя полученные результаты можно заключить, что этот пептид 4.2 обладает высокой противомикробной активностью по отношению к *B. cereus* ATCC 10702, *S. typhimurium* 1626 в концентрации 0,625 мг/л, и сравнительно высокой по отношению к *E. coli* 1027 в концентрации 10 мг/л и не вызывает гибели *S. aureus* ATCC 6538(209-P) (Таблица 6).

Выявлено что, пептид № 6.1 высокоэффективен и ингибирует рост *B. cereus* ATCC 10702 в концентрации 0,625 мг/л. Однако способность ингибировать рост *S. typhimurium* 1626 у пептида 6.1 ниже, чем у пептида 4.2 и ограничена концентрацией 10мг/л. Что же касается *S. aureus* ATCC 6538(209-P), *E. coli* 1027 изученные нами концентрации пептида 6.1 не вызывают угнетения данного штамма, предположительно, что ингибирование данных штаммов возможно при более высокой концентрации АМП (Таблица 6).

Таблица 6 – Антимикробная активность пептидов 4.1, 4.2, 6.1

Штамм	Пептид № 4.1		Пептид № 4.2		Пептид № 6.1	
	0.625мг/л	10мг/л	0.625мг/л	10мг/л	0.625мг/л	10мг/л
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 1027	-	-	-	+	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 10702	-	-	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i> 1626	-	-	+	+	-	+

Примечание – ‘+’- бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов);

‘-’ – бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

Таким образом, исследования в данной области являются предпосылками к созданию антибактериальных препаратов, и, кроме того будет способствовать решению проблемы нарушения микробиоценоза живых организмов, терапии заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами и профилактики заболеваний различной этиологии.

Изучение биотрансформации пептидов в организме белых мышей

Для понимания механизма метаболизма антимикробных пептидов в макроорганизме, нами были проведены эксперименты по биотрансформации антимикробных пептидов в организме белых мышей. В результате проведенного

эксперимента, было установлено, что антимикробные пептиды, меченые ФИТЦ через 24 часа после внутрибрюшинного введения, не вызывали флуоресценции в крови, что явилось свидетельством их отсутствия в кровяном русле.

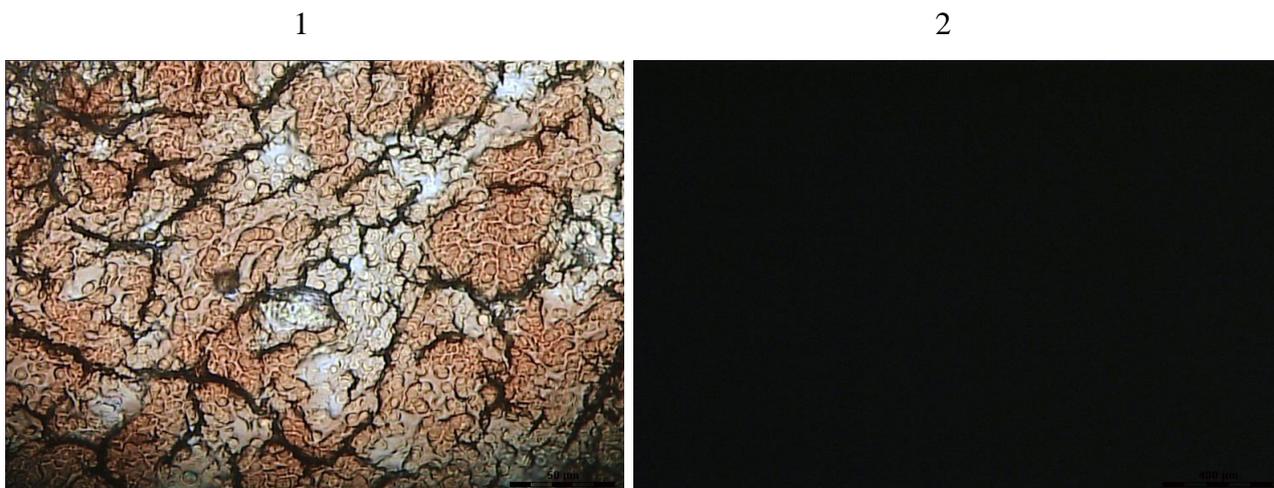


Рисунок 1 – Мазок крови мыши, после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x600

Аналогичные данные были получены при внутримышечном введении АМП, меченых ФИТЦ, и так же через 24 часа отмечали полное выведение препарата из крови.

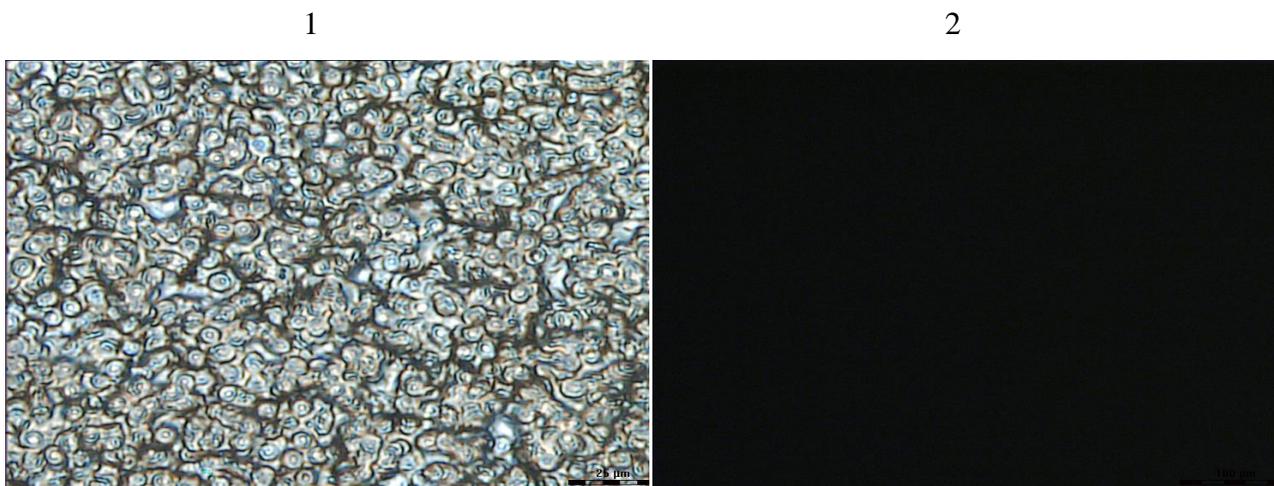
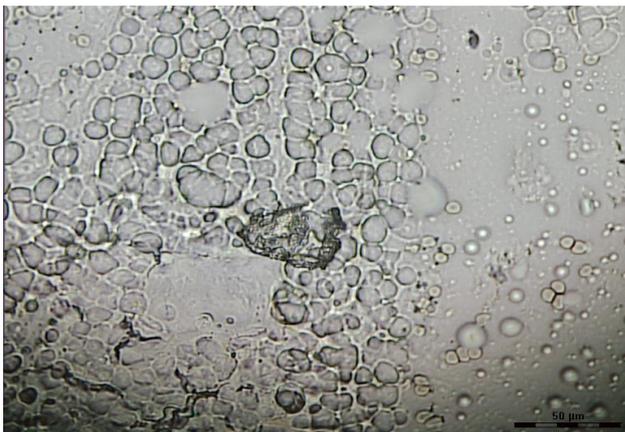


Рисунок 2 – Мазок крови мыши после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия без фильтра (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x630

Флуоресценция не была обнаружена при микроскопии мазка отпечатка из костного мозга после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ, что говорит о полном отсутствии пептидов в мозге.

Однако довольно сильная и интенсивная флуоресценция отмечалась через 24 часа после внутримышечного введения, что явилось результатом локализации искомого вещества в клетках костного мозга.

1



2

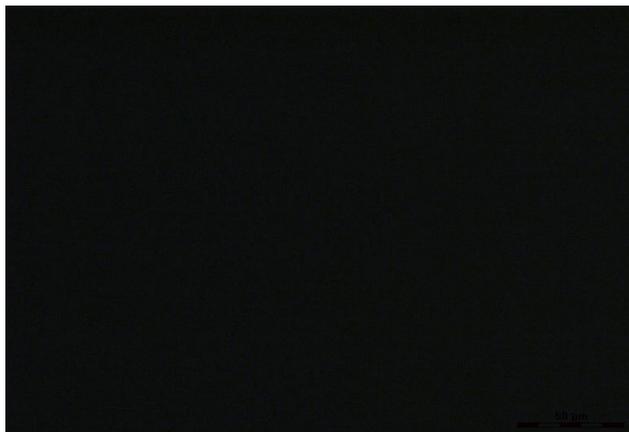
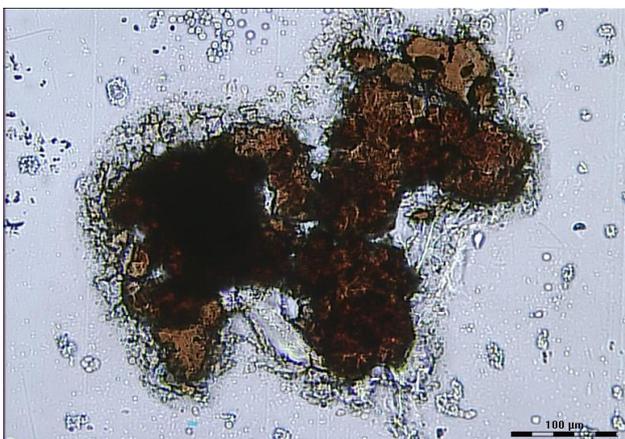


Рисунок 3 – Мазок отпечаток костного мозга мыши после внутривбрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x40

1



2

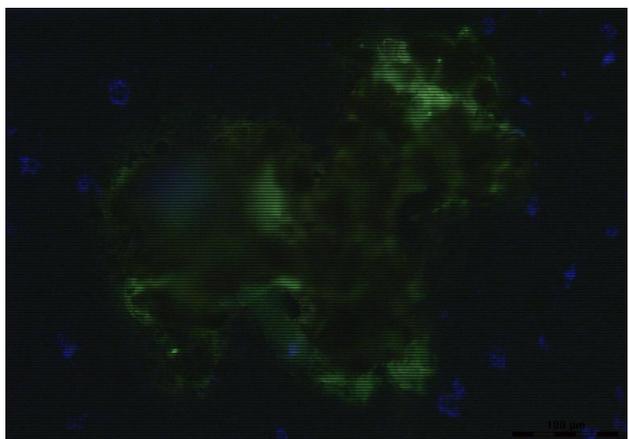


Рисунок 4 – Мазок отпечаток костного мозга мыши после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x200

При микроскопии мазка отпечатка из паренхимы печени после внутривбрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ, через 24 часа, регистрировали довольно интенсивное свечение внутри структурных образований, что подтверждало на сосредоточение пептидов в паренхиматозных клетках.

Следует отметить, что после внутримышечного введения пептиды также локализуются в паренхиме печени и остаются в ней в течение 24 часов с момента введения, сосредотачиваясь внутри структурных образований, имеющих оболочку.

1



2

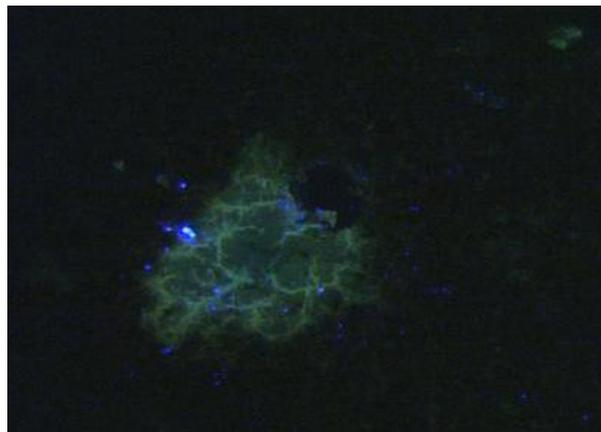
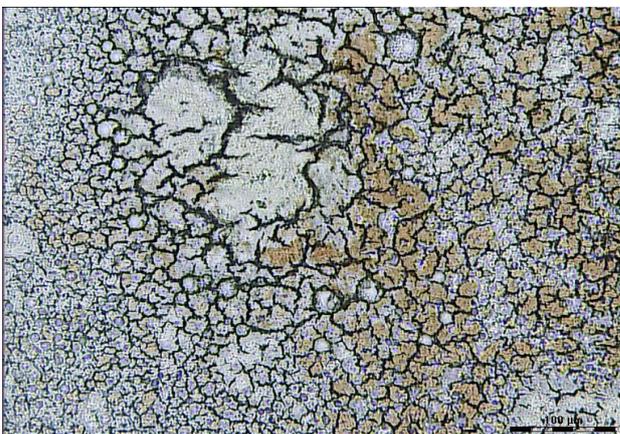


Рисунок 5 – Мазок отпечаток паренхимы печени мыши после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x100

1



2

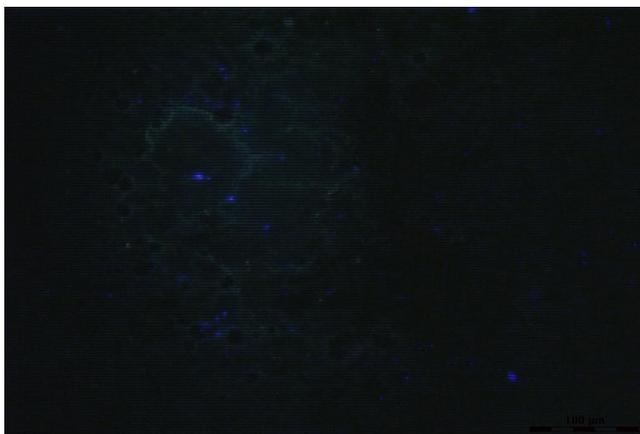
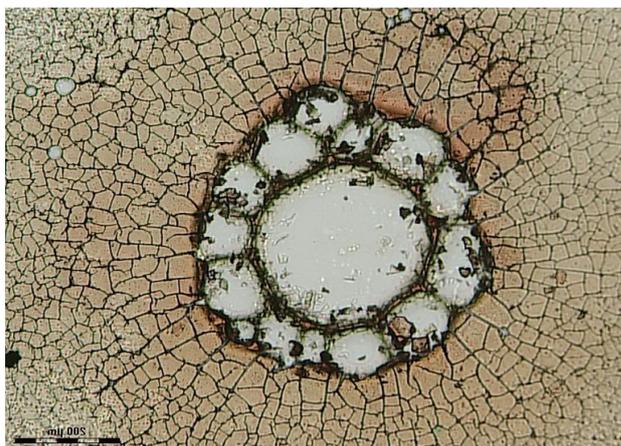


Рисунок 6 – Мазок отпечаток паренхимы печени мыши после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x200

Отсутствие флуоресценции искомым пептидов в почках регистрировали при микроскопическом исследовании мазка отпечатка паренхимы почки через 24 часа после внутрибрюшинного введения АМП, что свидетельствовало об их отсутствии в данных органах. Аналогичные явления отмечали после внутримышечного введения АМП. Флуоресценцию через сутки не отмечали в мазке отпечатке паренхимы почки.

Полная локализация пептидов в клетках селезёнки в течение 24 часов была подтверждена при микроскопии мазка отпечатка паренхимы селезенки мыши после внутрибрюшинного введения АМП с регистрацией флуоресценции, имеющей строго очерченную форму и границы.

1



2

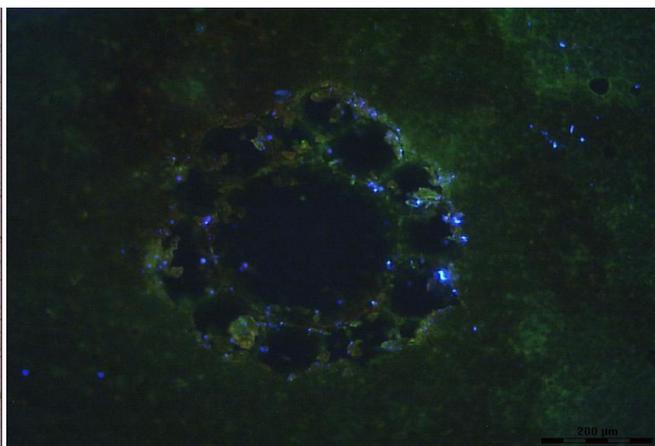
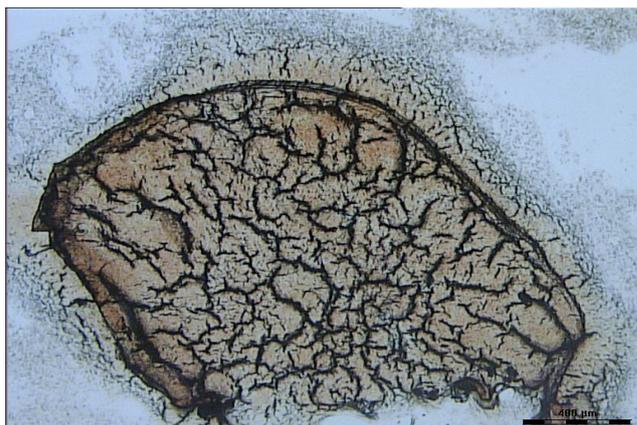


Рисунок 7 – Мазок отпечаток паренхимы селезенки мыши после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1), Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x100

При внутримышечном введении АМП, меченых ФИТЦ наблюдали аналогичные результаты.

1



2

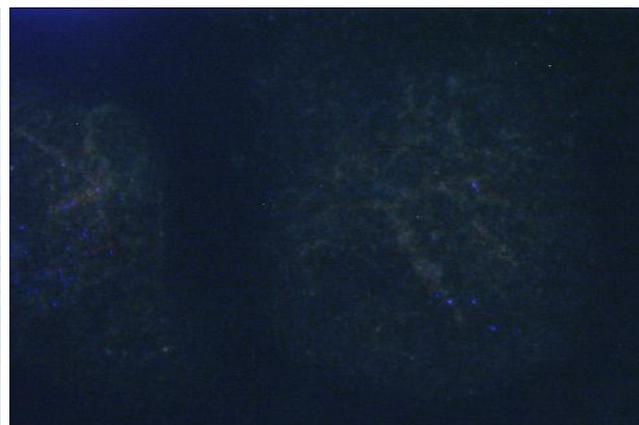


Рисунок 8 – Мазок отпечаток паренхимы селезенки мыши после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1), Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x50

Таким образом, нами было выявлено, что через сутки независимо от способа после введения АМП, меченых ФИТЦ, белым нелинейным мышам происходит их накопление, в основном, в печени и селезенке. Кроме того, отмечали интенсивное свечение при внутримышечном введении в костном мозге.

Таким образом, можно предположить, что АМП обладают тропизмом к органам ретикулоэндотелиальной системы. Могут захватываться иммунокомпетентными клетками при попадании в кровеносное русло, а затем транспортируются в органы иммунной системы, где и метаболизируются.

Заключение

Полученные нами данные по антимикробной активности и метаболизации пептидов, выделенных из организма насекомых, могут стать отправной точкой для дальнейших исследований и основой для конструирования новых антимикробных препаратов.

Многие исследователи утверждают, что исследования, связанные с открытиями АМП более эффективных в лечении инфекций, вызванных микроорганизмами, также относятся к веществам, продуцируемым насекомыми. Причиной этого, является эволюционный успех, который позволяет насекомым занимать различные среды обитания. Важную часть этого успеха можно отнести к эффективности их иммунитета. Кроме того, существует более 30 миллионов видов насекомых, то есть огромный источник ресурсов для поиска новых веществ для дальнейшего применения в медицине, пищевой промышленности и косметологии в качестве заменителей и / или для использования в сочетании с антибиотиками (Ganz T. et al., 2003; Wang G. et al., 2004; Peters B. et al., 2010; Clausen M-L. et al., 2016; Mylonakis E. et al., 2016).

Выводы

1. Разработана методика выделения водорастворимых пептидов из личинок *Galleria mellonella* и *Musca domestica*, состоящая из следующих стадий: гомогенизации; экстракции; центрифугирования; высаливания сульфатом аммония; растворения; высаливания сульфатом аммония.
2. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии экспериментально подобраны оптимальные условия для разделения водорастворимых пептидов: 80 мм при скорости потока 1 мл/мин и длине волны 280 нм, на колонке BioSep SEC S-2000 300x7, время хроматографирования 60 мин, объем вводимой пробы 20 мкл и температуре 25 °С.
3. Выявлены антимикробные пептиды, выделенные из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica* оказывающие ингибирующее действие на *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *C. albicans* РКПГУ-401/NCTC-885-653, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. Наиболее высокой антимикробной активностью обладали пептиды 3 и 6, выделенные из *G. mellonella*, пептид 3 ингибировал рост микроорганизмов *C. albicans* РКПГУ-401/NCTC-885-653, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) в концентрации 0,18 мг/л; пептид № 6 проявлял антимикробную активность в концентрации 0,111 мг/л по отношению к *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *E. coli* 1027, *B. cereus* ATCC 10702 *Candida albicans* РКПГУ-401/NCTC-885-653.
4. В результате исследования было выявлено, что через сутки независимо от способа после введения АМП, меченых ФИТЦ, белым нелинейным мышам происходит их

накопление, в основном, в печени и селезенке. Кроме того, отмечали интенсивное свечение при внутримышечном введении в костном мозге.

Практические предложения

1. Для получения антимикробных пептидов из биомассы насекомых рекомендуется использовать разработанную нами оригинальную технологию, включающую в себя следующие стадии: гомогенизацию; экстракцию; центрифугирование; высаливание сульфатом аммония; растворение; высаливание сульфатом аммония.
2. Для разделения пептидов методом ВЭЖХ показано использование колонки BioSep S2000 300x2120 мм на длине волны 280 нм, объем петли 1575 мкл, элюентом был 0,1 М фосфатный буферный солевой раствор. Аналитические определения проводили в следующих условиях: скорость потока - 1,0 мл/мин, объем вводимой пробы - 20 мкл, температура колонки 25 °С. Время анализа для одной пробы 60 мин, поток 1 мл/мин.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Настоящее исследование по выделению наиболее перспективных АМП может стать предпосылкой к разработке высокоэффективных антимикробных препаратов, которые могут быть использованы в качестве терапии при лечении заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами, и кроме этого, будет способствовать решению проблемы нарушения микробиоценозов живых организмов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В издании, рекомендованном ВАК РФ:

1. Ларионова О.С. Биотрансформация антимикробных пептидов *M. domestica* при различных способах введения *in vivo* / О.С. Ларионова, Л.С. Крылова, Я.Б. Древко, А.М. Буров, С.В. Козлов, Е.К. Ремизов, Е.А. Фауст // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2018. – № 8. – С. 21-29.

Патент:

2. Пат. 2714128 Российская Федерация. МПК А61К 35/64. Композиция антимикробных пептидов, полученных из личинок *Musca domestica*, и способ ее получения/ Крылова Л.С., Древко Б.И., Фауст Е.А., Ремизов Е.К., Смирнова К.Ю., Древко Я.Б., Бородина М.А., Осина Т.С., Ларионова О.С.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. - № 2018142602; заявл. 04.12.2018; опубл. 12.02.2020; бюл. 20.

В материалах конференций и семинаров и в других изданиях:

3. Крылова Л.С. Индикация пептидов из биомассы личинок насекомых и изучение их антимикробной активности / Л.С. Крылова, Е.К. Ремизов, К.Ю. Смирнова, О.С. Ларионова // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2019. – № 4 (44). – С. 3-6.

4. Крылова Л.С. Получение водорастворимых пептидов из биомассы личинок *Musca domestica* и изучение их свойств / Е.К. Ремизов, К.Ю. Смирнова, Е.И. Сорокатая, Я.Б. Древо // Вестник КрасГАУ. – 2020. – №4. – С. 97-101.
5. Larionova O.S. Antimicrobial Peptides as a Base for the Development of Novel Antimicrobial Drugs / O.S. Larionova, Ya. B. Drevko, A.V. Bannikova, E.K. Remizov, E.A. Faust, L.S. Krylova // BIT's 9th Anniversary World DNA Day – China. – Dalian, 2018. – P. 196.
6. Ремизов Е.К. Разработка способа разделения водорастворимых пептидов методом ВЭЖХ и изучение их антибактериальной активности / Е.К. Ремизов, О.С. Ларионова, Я.Б. Древо // Сб. Современные проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса. – Саратов: Изд-во Саратовского государственного аграрного ун-та им. Н.И. Вавилова, 2018. – С. 228-231.
7. Амеликина А.А. Индикация антимикробных пептидов и изучение их антибактериальной активности / А.А. Амеликина, Е.К. Ремизов, О.С. Ларионова, Я.Б. Древо, Е.А. Фауст// В кн.: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Материалы международного форума. – Москва: Изд-во Общество с ограниченной ответственностью "Русские Экспо Дни Групп", 2018. – С. 147-149.