

ДОЗОЗАВИСИМЫЕ ЭФФЕКТЫ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА GM-CSF

А.В. Зурочка¹, Ю.Г. Суховой², В.А. Зурочка¹, М.А. Добрынина¹,
Е.Г. Костоломова², А.А. Колобов³, А.С. Симбирцев³

¹ Учреждение РАН институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

² Учреждение Российской академии наук Тюменский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Тюмень

³ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург

Резюме. Исследованы различные эндогенные и синтетические пептиды с целью выявления их антибактериальной активности. Исследования показали, что при исследовании дозозависимых эффектов антибактериальной активности иммуотропного пептида ZP-2, входящего в состав активного центра GM-CSF, была выявлена ярко выраженная антибактериальная активность как по спектру активности, так и по степени бактерицидного действия в низких концентрациях. Комбинированное применение вещества, полученного из супернатанта CD34⁺CD45⁻ клеток и синтетического пептида ZP-2 значительно потенцируют действие друг друга. Возможно данное явление связано с различным механизмом их действия на бактерии. Полученные данные свидетельствуют о том, что синтетические пептиды обладают не только иммуностимулирующей активностью, но и прямым антибактериальным действием и имеют серьезную перспективу при создании новых антибактериальных препаратов с уникальными свойствами. Таким образом, полученный пептид может быть использован не только как иммуностимулирующее, но и как антибактериальное средство.

Ключевые слова: GM-CSF, пептиды, дефенсин.

DOSE-DEPENDENT EFFECTS OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SYNTHETIC PEPTIDES ISOLATED FROM GM-CSF ACTIVE CENTER

Zurochka A.V., Suhovei Yu.G., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Kostolomova E.G., Kolobov A.A., Simbirtsev A.S.

Abstract. Several endogenic and synthetic peptides were investigated in order to reveal their antibacterial activity. The study of dose-dependent effects of antibacterial activity of the immunotropic peptide ZP-2, which is included in GM-CSF active center, shown significant antibacterial activity of ZP-2 by action range and by rate of bactericidal activity in case of low concentration. Combined application of substance derived from supernatant of CD34⁺CD45⁻ cells and synthetic peptide ZP-2 enhances significantly actions of each other. Probably, this effect is connected with various mechanisms of their influence on bacteria. The obtained facts indicate that synthetic peptide has not only immunostimulating action but it also promotes a direct antibacterial activity. These data support an idea that synthetic peptides have good perspectives in case of development new antibacterial drugs with unique characteristics. (*Infekc. immun.*, 2012, vol. 2, N 3, p. 657–660)

Key words: GM-CSF, peptides, defensins.

поступила в редакцию 23.05.2011
отправлена на доработку 01.06.2011
принята к печати 23.11.2011

© Зурочка А.В. и соавт., 2012

Адрес для переписки:

Зурочка Александр Владимирович,
д.м.н., профессор, ведущий научный
сотрудник лаборатории иммунологии
воспаления Института иммунологии
и физиологии УРО РАН

454005, Челябинск, ул. Телевизионная, 6,
кв. 36.
Тел.: 8 919 307-75-98.
E-mail: v_zurochka@mail.ru

Введение

Развитие антибиотикотерапии привело к формированию антибиотикорезистентных микроорганизмов, появление которых является неизбежным биологическим явлением и предотвратить его практически невозможно. При этом антибиотикорезистентность микроорганизмов представляет опасность не только для пациента, у которого последние выделены, но и для многих других людей, ни разу не сталкивавшихся до заболевания с резистентными штаммами бактерий [1, 14]. На большинство выпускаемых новых антибиотиков, являющихся лишь незначительными модификациями традиционных препаратов, у бактерий невосприимчивость развивается особенно быстро. Поэтому борьба с антибиотикорезистентностью в настоящее время приобрела глобальный масштаб.

Однако проблему возрастающей устойчивости бактерий к антибиотикам невозможно решить только с помощью разработки лекарств, являющихся, по сути, химическими модификациями известных антибактериальных препаратов [11].

В связи с увеличением числа штаммов бактерий, устойчивых к антибиотикам, появлением новых патогенов с новыми свойствами, а также из-за существующей угрозы биотерроризма, назрела необходимость создания принципиально новых антибактериальных препаратов, имеющих кардинально иные механизмы действия, или комбинации механизмов, отличных от уже существующих. На сегодняшний день одним из наиболее перспективных направлений поиска новых соединений является разработка антибактериальных средств на основе эндогенных пептидов и продуктов клеточного происхождения [2, 10, 17].

Эндогенные антимикробные пептиды являются важной составляющей системы врожденного иммунитета эукариотического организма, которая обеспечивает защиту против патогенов. Антимикробные пептиды — эффекторные молекулы, которые вызывают лизис микроорганизмов путем нарушения структуры и функций цитоплазматической мембраны [3, 7, 15]. Благодаря ярко выраженным антимикробным свойствам и небольшому размеру молекул, эти пептиды рассматриваются как потенциальные агенты для лечения инфекционных заболеваний человека [5, 6, 18, 19]. Несомненными преимуществами антимикробных пептидов перед традиционными антибиотиками, в частности, в терапии латентных инфекций, являются более широкий спектр антибактериального действия, функциональная активность при малых концентрациях, практически полное отсутствие возможности формирования резистентности возбудителей к антимикробным пепти-

дам, возможность синтеза аналогов природных пептидов с измененными биологическими свойствами [4, 12, 16]. Нами ранее были выявлены антимикробные эффекты синтетических пептидов активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) [8]. Данная работа является логическим продолжением исследования антимикробных дозозависимых эффектов эндогенных молекул клеток иммунной системы.

Материалы и методы

Исследована антибактериальная активность синтетических пептидов эндогенного происхождения, соответствующих по первичной последовательности активному центру гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и имеющих структуру Thr-Nle-Nle-Ala-Ser-His-Tyr-Lys-Gln-His-Cys-Pro (ZP-2). Синтез пептидов проводился твердофазным способом на синтезаторе «Applied Biosystems 430A» по методу *in situ* с использованием N α -Вос-защищенных производных аминокислот. Для блокирования боковых цепей трифункциональных аминокислотных остатков использованы защитные группы бензильного и уретанового типов. Присоединение аминокислотных остатков проводили методом 1-гидроксисбензотриазоловых эфиров, используя 5-кратные избытки реагентов. По завершении сборки полипептидной цепи пептидил полимер обрабатывали жидким фтористым водородом по Sn1/Sn2 механизмам в присутствии скавенджеров. Продукт высаживали диэтиловым эфиром и очищали методом препаративной обращенно-фазовой хроматографии до гомогенного состояния. Конечные продукты охарактеризованы данными аминокислотного и масс-спектрального анализов и аналитической ОФ ВЭЖХ. Аминокислотный состав полученных соединений и их молекулярный вес соответствовали теоретическим, чистота по данным аналитической ОФ ВЭЖХ была не менее 95%. Вторым изучаемым соединением было вещество, выделенное из супернатанта клеток фенотипа CD34⁺CD45⁻ (источник костный мозг), выделенного методом аналитической ВЭЖХ, химическая структура и молекулярная масса соединения в настоящее время исследуются.

Антибактериальную активность исследуемых веществ изучали в отношении *S. aureus* 155, *E. coli* 2290 диффузионно-дисковым методом [13].

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что синтетические пептиды активного центра GM-CSF обладают выраженной антибактериальной активностью в отношении грамотрицательных

и грамположительных бактерий [8], при этом данные соединения обладают и выраженной иммуностимулирующей активностью [8]. В тоже время антибактериальная активность синтетических пептидов проявлялась в достаточно высоких концентрациях, поэтому нами была предпринята попытка к поиску антибактериальной активности в более низких концентрациях веществ и при изучении комбинированного действия различных соединений, полученных из супернатантов клеток иммунной системы.

Как видно из полученных данных (табл.), синтетический пептид из активного центра GM-CSF ведет себя необычным образом. Так при концентрации 0,3 мг/мл он не проявлял антибактериальной активности, как и при концентрации 3 мг/мл, как было показано нами ранее [8]. В то же время в более низких концентрациях (0,03 и 0,01 мг/мл), наоборот, показал высокую антибактериальную активность. Изучаемое вещество из супернатанта клеток CD34⁺CD45⁻ во всех изучаемых концентрациях выявило антибактериальную активность. Надо отметить, что при самых низких концентрациях (0,01 мг/мл) выявляется некоторое снижение изучаемой активности, что является логичным. Но наиболее интересные данные были получены при исследовании комбинированного действия этих двух веществ.

Так, любая комбинация этих препаратов обладала антибактериальной активностью, при этом в двух сочетаниях, а именно при соотношениях 0,3+0,01 мг/мл, не зависимо от того, какой препарат находится в концентрационной составляющей, комбинация их давала максимальный антибактериальный эффект. Полу-

ченные данные свидетельствуют о том, что данные химические соединения обладают с одной стороны, антибактериальными свойствами с широким спектром действия и в достаточно низких концентрациях, а с другой стороны могут значительно потенцировать действия друг друга, что открывает широкую перспективу для практического использования данных веществ в клинической практике.

Таким образом, при исследовании дозозависимых эффектов антибактериальной активности иммуностимулирующих пептидов, входящих в состав активного центра GM-CSF, была выявлена ярко выраженная антибактериальная активность как по спектру активности, так и по степени бактерицидного действия в низких концентрациях. Комбинированное применение вещества, полученного из супернатанта CD34⁺CD45⁻ клеток и синтетического пептида ZP-2 значительно потенцируют действие друг друга. Возможно, данное явление связано с различным механизмом их действия на бактерии. Полученные данные свидетельствуют о том, что синтетические пептиды обладают не только иммуностимулирующей активностью [8], но и прямым антибактериальным действием и имеют серьезную перспективу при создании новых антибактериальных препаратов с уникальными свойствами.

Список литературы

1. Апчел А.В., Попова О.В., Румянцева А.В. Изучение антимикробной активности пептидов в отношении антибиотикорезистентных микроорганизмов // Санкт-Петербургские дерматологические чтения. — СПб., 2008. — С. 18–19.

ТАБЛИЦА. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА GM-CSF И ВЕЩЕСТВА ИЗ СУПЕРНАТАНТА CD34⁺CD45⁻ КЛЕТОК

№	Исследуемые средства	Концентрация, мг/мл	n	Диаметр зоны подавления, мм	
				<i>S. aureus</i> 155	<i>E. coli</i> 2290
1	ZP-2	0,3	10	0,0±0,0	0,0±0,0
		0,03	10	24,4±2,3	17,6±1,6
		0,01	10	12,2±1,6	10,3±1,8
2	Вещество из супернатанта CD34 ⁺ CD45 ⁻ клеток	0,3	10	25,4±3,8	19,6±3,6
		0,03	10	22,4±2,8	17,6±2,6
		0,01	10	20,4±1,8	13,6±1,6
3	Вещество + ZP-2	0,3+0,3	10	12,3±1,4	9,2±1,2
		0,3+0,03	10	25,4±3,2	20,3±2,8
		0,3+0,01	10	28,6±3,4	19,4±2,3
4	Вещество + ZP-2	0,3+0,3	10	12,3±1,4	9,2±1,2
		0,03+0,3	10	25,4±3,6	22,4±2,6
		0,01+0,3	10	31,3±2,2	24,3±2,2
5	Вещество + ZP-2	0,3+0,3	10	12,3±1,4	9,2±1,2
		0,03+0,03	10	18,4±1,6	22,5±2,8
		0,01+0,01	10	22,2±1,8	19,6±2,6

Примечание: жирным выделены максимально эффективные комбинации доз изучаемых препаратов, обладающих антибактериальным действием.

2. Артамонова А.Ю., Шанин С.Н., Орлов Д.С., Шамова О.В., Колодкин Н.И., Рыбакина Е.Г. Иммуномодулирующая активность антимикробных пептидов индолицидина и его структурных аналогов // Медицинская иммунология. — 2009. — Т. 11, № 1. — С. 101–104.
3. Будихина А.С., Пинегин Б.В. Альфа-дефензины — антимикробные пептиды нейтрофилов: свойства и функции // Иммунология. — 2008. — Т. 29, № 5. — С. 317–320.
4. Волкова Л.В., Косарева П.В., Платова Н.И., Аверьянова Н.И. Теоретическое обоснование антибактериального действия пептидного комплекса, ассоциированного с процессом интерферогенеза // Сибир. мед. журн. — 2004. — Т. 19, № 3. — С. 82–85.
5. Волкова Л.В., Косарева П.В., Попов В.Ф., Тимашева О.А. Антибактериальная активность пептидного комплекса, выделенного из препаратов лейкоцитарного интерферона // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2005. — № 5. — С. 54–57.
6. Ганковская О.А., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Лавров В.Ф., Романовская В.В., Карташов Д.Д., Фензелева В.А. Роль Toll-подобных рецепторов и дефензинов в противомикробной защите урогенитального тракта женщин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2008. — № 1. — С. 46–50.
7. Громовых П.С., Митин Ю.В., Казаченко А.С. Синтез линейных антимикробных пептидов, содержащих лизин // Вестник КрасГУ. — 2004. — № 4. — С. 56–61.
8. Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г., Аргунова Е.Г., Субботин А.М., Колотов А.А., Симбирцев А.С. Антибактериальные свойства синтетических пептидов активного центра GM-CSF // Цитокины и воспаление. — 2010. — Т. 9, № 4. — С. 32–34.
9. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Костоломова Е.Г., Зуева Е.Б. Влияние пептида активного центра ГМ-КСФ на реакцию бласттрансформации лимфоцитов // Медицинская иммунология. — 2009. — Т. 11, № 4–5. — С. 316–317.
10. Кокряков В.Н., Ковальчук Л.В., Алешина Г.М., Шамова О.В. Катионные противомикробные пептиды как молекулярные факторы иммунитета: мультифункциональность // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2006. — № 2. — С. 98–105.
11. Крылов А.В., Киселева Е.П., Алешина Г.М., Шамова О.В., Кокряков В.Н. Влияние дефенсина и лактоферрина на функциональную активность эндотелиальных клеток *in vitro* // Бюлл. эксперим. биол. мед. — 2007. — Т. 144, № 9. — С. 306–309.
12. Лазарев В.Н., Говорун В.М., Александрова Н.М., Лопухин Ю.М. Генная терапия хронических инфекционных заболеваний урогенитального тракта с использованием цитотоксических пептидов // Вопр. мед. химии. — 2000. — Т. 46, № 3. — С. 324–331.
13. Справочник по микробиологии и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. — 3-е изд. — М., 1982. — С. 172–179.
14. Черешнев В.А., Косарева П.В., Аверьянова Н.И., Шилова Ф.А., Зимушкина Н.А., Логинова И.А. Морфологические и гематологические критерии эффективности лечения экспериментального пиелонефрита комплексом природных цитокинов и антибактериальных пептидов // Перм. мед. журн. — 2008. — Т. 25, № 2. — С. 5–13.
15. Шамова О.В., Сакута Г.А., Орлов Д.С. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре // Цитология. — 2007. — Т. 49, № 12. — С. 1000–1010.
16. Loose C., Jensen K., Regoutous I., Stephanopoulos G. A linguistic modem for the rational design of antimicrobial peptides // Nature. — 2006. — Vol. 443. — P. 867–869.
17. Jacobs M.R. Retapamulin: a semisynthetic pleuro-mutilin compound for topical treatment of skin infections in adults and children // Future Microbiol. — 2007. — Vol. 2. — P. 591–600.
18. Garcia A.E., Selsted M. Olive baboon theta-defensins // FASEB J. — 2008. — Vol. 22. — Abstract 673.11.
19. Garcia A.E., Osapay G., Tran P.A., Yuan J., Selsted M.E. Isolation, synthesis, and antimicrobial activities of naturally occurring theta-defensin isoforms from baboon leukocytes // Infect. Immun. — 2008. — Vol. 76, N 12. — P. 5883–5891.