

Функциональная активность синтетического производного индолицидина

Т.М. Пашкова, к.б.н., ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ

Проблема антимикробной резистентности (АМР) в настоящее время приобрела критическое значение для гуманной и ветеринарной медицины. Доказа-

тельством этому являются ежегодные сообщения о выявлении новых случаев устойчивости бактерий [1]. Масштаб проблемы иллюстрирует и решение глав государств, входящих в ООН, координировать усилия по сдерживанию распространения АМР [2].

Сложившаяся ситуация заставляет учёных держать в поле зрения вопрос об изыскании новых антимикробных средств, способных обеспечить эффективную борьбу с лекарственно-устойчивыми микроорганизмами. К числу таких альтернатив относятся антимикробные пептиды (АМП) – важный молекулярный механизм врождённого иммунитета.

Описано более четырёх тысяч разнообразных эндогенных пептидных антибиотиков [3, 4], но только недавно интерес к этим молекулам перешёл из плоскости фундаментальных исследований в клиническую область, поскольку их способность быстро убивать клетки-мишени, необычайно широкий спектр действия и активность в отношении штаммов, резистентных к другим антибиотикам, делают эти молекулы крайне перспективными для разработки лекарственных препаратов.

Среди более 4 тыс. описанных в настоящее время эндогенных антимикробных пептидов особое внимание привлекает индолицидин – катионный антимикробный пептид, выделенный из нейтрофильных гранулоцитов быка. Интерес к данному соединению обусловлен не только широким спектром его биологической активности, включающей антимикробное [5], иммуномодулирующее [6] действия, стимуляцию регенерации тканей [7], но и уникальной химической структурой, обеспечивающей значительный антимикробный эффект.

Однако побочным эффектом действия индолицидина является высокая цитотоксическая активность, которая ограничивает его прямое использование в ветеринарной и медицинской практике и заставляет модифицировать молекулу таким образом, чтобы сохранить её высокий антимикробный потенциал, минимизировав побочные эффекты [8].

Всё вышеизложенное предопределило цель настоящего исследования – изучить функциональные свойства нового синтетического производного индолицидина.

Материал и методы исследования. В работе исследованы функциональные свойства производного индолицидина (Ind-58), полученного путём химического синтеза коллегами из федерального государственного унитарного предприятия «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства. Ind-58 характеризуется более низкой по сравнению с природной молекулой индолицидина побочной токсической активностью в отношении эритроцитов [9].

Антимикробные свойства Ind-58 оценивали в отношении тест-культур коллекции: *Escherichia coli* MG1655, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 14893, *Staphylococcus aureus* FDA 209 P методом микротитрования в бульоне [10]. За минимальную ингибирующую концентрацию принимали концентрацию пептида, полностью предотвращающую формирование колоний.

Антилизоцимную активность (АЛА) определяли по методике О.В. Бухарина с соавторами (1999) [11].

Влияние различных концентраций АМП на антилизоцимную активность микроорганизмов определяли в отношении вышеперечисленных культур, предварительно соинкубированных в течение часа с синтетическим производным индолицидина в минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и 1/4 минимальной ингибирующей концентрации.

Полученные в ходе исследования численные материалы были обработаны статистически. Достоверность различий сравниваемых показателей оценивалась по t-критерию Стьюдента [12].

Результаты исследования. Как показало наше исследование, Ind-58 обладал антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов с минимальными бактерицидными концентрациями на уровне нескольких десятков микрограмм на миллилитр (табл.).

Антимикробная активность синтетического производного индолицидина – Ind-58

Тест-культура		МИК, мкг/мл
Грам-отрицательные	<i>E. coli</i> MG1655	12,5
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>100
Грам-положительные	<i>B. cereus</i> ATCC 14893	6,25
	<i>S. aureus</i> FDA 209 P	6,25

В сравнительном аспекте наиболее выраженное антимикробное действие Ind-58 демонстрировал в отношении *S. aureus* и *B. cereus*.

В серии экспериментов установлено однонаправленно ингибирующее действие Ind-58 на антилизоцимную активность микроорганизмов.

Индолицидин-58 в обеих изученных концентрациях оказывал максимальный подавляющий эффект (более 70%) в отношении выраженности антилизоцимного признака *B. cereus* по сравнению с исходным уровнем АЛА ($p < 0,001$).

Ингибирующее действие у синтетического производного индолицидина выявлено в отношении АЛА кишечной палочки в МИК и 1/4 МИК: снижение уровня изучаемого признака по сравнению с исходным на 57% ($p < 0,05$) и 73% ($P < 0,01$) соответственно.

Умеренное снижение антилизоцимного признака с амплитудой от 14 до 21% регистрировали после соинкубирования клонов золотистого стафилококка с Ind-58 в 1/4 МИК и МИК соответственно.

Способность деградировать лизоцим у клонов *P. aeruginosa* ATCC 27853 под воздействием синтетического производного индолицидина в МИК и 1/4 МИК снижалась на 26% (рис.).

Таким образом, анализ динамики антилизоцимной активности микроорганизмов под влиянием синтетического производного индолицидина по-

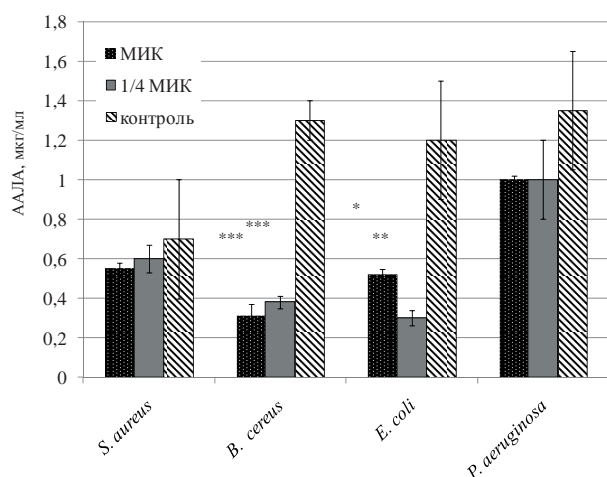


Рис. – Влияние Ind-58 на антилизоцимную активность микроорганизмов

Примечание: * – достоверность различий выраженности антилизоцимной активности микроорганизмов в контроле и после соинкубирования с синтетическим производным индолицидина – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$

казал однозначное значимое снижение изучаемого показателя.

Преимущества АМП по сравнению с конвенционными антибиотиками микробного происхождения делают их крайне перспективными базовыми соединениями для разработки лекарственных препаратов. Однако, поскольку эндогенные антимикробные пептиды могут оказывать цитотоксическое действие на клетки высших эукариот, их прямое использование в ветеринарной и медицинской практике ограничено [13]. Изучение взаимосвязи структура – биологическая активность в ряду химически модифицированных аналогов эндогенных АМП позволяет установить структурные требования к молекуле с высоким терапевтическим индексом. Последующее изучение функциональной активности полученных производных открывает широкие перспективы для выявления и внедрения в практику активных антимикробных соединений.

Полученные нами результаты свидетельствуют о наличии у синтетического производного Ind-58 антимикробной активности в отношении различных представителей грамположительных и грамотрицательных форм бактерий, причём значения МИК у синтетического АМП были ниже, чем у природной молекулы индолицидина [14]. Известно, что суммарный заряд Ind-58 при pH 7,0 равен +4, в то время как у природной молекулы эндогенного антибиотика – +3. Принимая во внимание данные литературы [15], согласно которым увеличение общего положительного заряда молекулы способствует усилению антимикробных свойств, полученные нами результаты представляются верными.

Для сохранения возбудителя от антимикробных факторов сыворотки крови или фагоцитов бактериальная клетка способна продуцировать секреторные субстанции, направленные на разрушение

механизмов клеточной и гуморальной защиты и обеспечивающие длительную персистенцию в организме хозяина. Подавление препаратами персистентных свойств возбудителя затрудняет его паразитирование в макроорганизме и тем самым повышает эффективность лекарственных воздействий [11], поэтому на следующем этапе нашей работы мы попытались оценить влияние Ind-58 на антилизоцимную активность микроорганизмов.

Полученные в исследованиях *in vitro* данные позволили установить, что под влиянием синтетического АМП происходит снижение способности микроорганизмов деградировать лизоцим, что может быть связано с нарушением работы бактериального генома [9].

Таким образом, полученные результаты открывают перспективу для дальнейшего изучения функциональной активности индолицидина-58 с целью создания нового антимикробного препарата, эффективного в отношении патогенных микроорганизмов, способных длительно персистировать в организме хозяина.

Выводы:

1. Индолицидин (Ind-58) обладает антимикробной активностью в отношении всех изученных микроорганизмов, причём наиболее выраженное антимикробное действие демонстрирует в отношении *S. aureus* и *B. cereus*.

2. Установлено однонаправленно подавляющее действие Ind-58 на антилизоцимную активность всех изученных микроорганизмов. Максимальный ингибирующий эффект отмечен в отношении выраженности АЛА *B. cereus*.

3. Перспективным является дальнейшее исследование индолицидина-58 для создания нового антимикробного препарата, пригодного для борьбы с персистирующей бактериальной инфекцией.

Литература

1. Antibiotic resistance: Italian awareness survey / A. Prigitano [et al.] // J. Infect. Public Health. 2018. Vol. 11(1). P. 30–34. doi: 10.1016/j.jiph.2017.02.010.
2. Venter H., Henningsen M.L., Begg S.L. Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment: the biochemistry behind the headlines // Essays Biochem. 2017. Vol. 61(1). P. 1–10.
3. Сычёва М.В. Влияние антимикробных пептидов из тромбозитов сельскохозяйственных животных на способность микроорганизмов к образованию биоплёнок / М.В. Сычёва, О.Л. Карташова, Е.В. Шейда, И.В. Вальшева // Вестник КрасГАУ. 2011. № 1. С. 130–132.
4. Vieira M.E., Linhares M.B. Isolation, characterization and mechanism of action of an antimicrobial peptide from *Lecythis pisonis* seeds with inhibitory activity against *Candida albicans* // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2015. Vol. 47. No. 9. P. 716–729.
5. An integrated study on antimicrobial activity and ecotoxicity of quantum dots and quantum dots coated with the antimicrobial peptide indolicidin / E. Galdiero [et al.] // Int. J. Nanomedicine. 2016. Vol. 11. P. 211–4199.
6. Артамонов А.Ю. Иммуномодулирующая активность антимикробных пептидов индолицидина и его структурных аналогов / А.Ю. Артамонов [и др.] // Медицинская иммунология. 2009. № 1. С. 101–104.
7. Лазаренко В.А., Ляшев Ю.Д., Шевченко Н.И. Эффекты синтетического аналога индолицидина на регенерацию кожи при локальной холодной травме // Научные ведомости Белгородского государственного университета. 2015. № 4 (201). С. 77–84.

8. Пантелеев П.В. Строение и биологические функции β -спилечных антимикробных пептидов / П.В. Пантелеев [и др.] // Acta Naturae. 2015. Т. 7. № 1 (24). С. 39–50.
9. Antimicrobial activity of the indolicidinderived novel synthetic peptide In-58 / A.S. Vasilchenko [et al.] // J. Pept. Sci. 2017. Vol. 23. P. 855–863.
10. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances // Nature protocols. 2008. Vol. 3(2). P. 163–175.
11. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий: монография / О.В. Бухарин. М.: Медицина, 1999. 366 с.
12. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьёв. Л.: Гос. изд-во мед. лит., 1962. 180 с.
13. Antimicrobial activity of novel synthetic peptides derived from indolicidin and ranalexin against *Streptococcus pneumoniae* / H.M. Jindal [et al.] // PLoS One. 2015. Vol. 10. No. 6. doi: 10.1371/journal.pone.0128532.
14. In vitro activities of membrane-active peptides against gram-positive and gram-negative aerobic bacteria / A. Giacometti [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. 1998. Vol. 42(12). P. 3320–3324.
15. Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides // Biopolymers. 2000. No. 55(1). P. 4–30.