

# БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА АНТИМИКРОБНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ АЛЬТЕРНАТИВА СУЩЕСТВУЮЩИМ АНТИБИОТИКАМ

Котенкова Е.А., канд.техн. наук; Ертикеева Е.А.; Ахремко А.Г.

ФГБНУ «Всероссийский научно- исследовательский институт мясной промышленности им. В. М. Горбатова», г. Москва

**Аннотация.** Наибольшей антибактериальной активностью обладали лиофилизаты слизистой оболочки носовой и ротовой полости. Слизистые оболочки свиней характеризуются наличием широкого диапазона пептидов с молекулярными массами до 2000 Да.

В мясной промышленности остро стоит вопрос разработки альтернативных способов снижения потерь от порчи мяса и мясных продуктов [7]. На сегодняшний день преимущественно применяют антибиотические [2,6,14], что приводит к возникновению резистентных форм микроорганизмов, трофической передаче и накоплению остаточных количеств антибиотиков, возникновению ряда побочных действий, в том числе включающих расстройства желудочно-кишечного тракта и общему угнетению иммунитета [4,13]. В связи со сложившейся ситуацией как в сельском хозяйстве и пищевой промышленности, так и в современной фармакологии, существует необходимость поиска альтернативных антибиотических веществ, которые, помимо увеличения сроков хранения и улучшения качества продуктов питания, не будут оказывать негативное воздействие на макроорганизм. Альтернативой могут служить антимикробные пептиды (АМП), содержащиеся в тканях животных, в частности, слизистых оболочках. АМП проявляют реактивное (через 3 – 5 часов) высокоспецифичное иммуностимулирующее действие, причем практически не вызывают побочных действий ввиду их природного происхождения и пищевой гипоаллергенности [3]. Характерной особенностью АМП является избирательное действие в отношении не только грамположительных (*Clostridium*, *Bacillus*), но и грамотрицательных (*Pseudomonas*, *Proteus*) микроорганизмов, а также грибов (*Candida*, *Debaryomyces*), вирусов и простейших [4,10]. В связи с очевидными преимуществами АМП представляется возможным перспективность их использования для лечения и профилактики заболеваний у сельскохозяйственных животных, а также в пищевой отрасли с целью увеличения сроков хранения мяса и мясных продуктов [10].

В настоящее время открыто около 1400 АМП, из них более 500 локализовано в тканях млекопитающих [1]. Литературные данные свидетельствуют о наличии АМП в яде скорпиона (*Buthus martensii*) [9], ячмене (*Hordeum vulgare L.*) [8], кожных покровах атлантической трески (*Gadus morhua*) [12] и лягушки (*Rana phenoccephala*) [11]. Растет число публикаций, свидетельствующих, что в организме сельскохозяйственных животных также присутствует ряд веществ белково-пептидной природы, вовлеченных в иммунный ответ. На дан-

ный момент выделены и изучены АМП млекопитающих: гистатины, кателицидины и дефензины, содержащиеся преимущественно в тканях и секрете ротовой полости, лейкоцитах, нейтрофилах, сердечных и скелетных мышцах, а также в некоторых эпителиальных тканях. Наиболее изученным и близким аналогом антимикробных пептидов является «Лизоцим»- фермент, обладающий лизирующим действием по отношению к клеточной стенке грамположительных микроорганизмов, в то время как антимикробные пептиды активны в отношении большего числа патогенов, что значительно расширяет возможность их применения в пищевой промышленности, сельском хозяйстве и медицине и делает перспективным исследование АМП с целью получения на их основе аналоговых препаратов с выраженными антимикробными и антибактериальными свойствами [5].

Основной целью данной работы являлось изучение тканеспецифичных белков и пептидов слизистых оболочек свиней, обладающих антимикробной активностью методами протеомного и микробиологического анализа.

#### *Объекты и методы*

Объектами исследования являлись нативные экстракты и ультрафильтраты слизистых оболочек свиней (ротовой и носовой полости, языка, прямой кишки), а также их лиофилизаты.

Для получения нативных экстрактов сырье замораживали при температуре минус 20°C, после дефростации измельчали на мясорубке с диаметром отверстий 3-5 мм (KENWOOD, Англия). Экстракцию проводили раствором натрия хлорида (0,9 %) на лабораторной диспергирующей установке (ЛДУ, Россия), гидромодуль 1:2, в течение 24 часов при температуре 4-5 °С. Далее экстракт отделяли центрифугированием на центрифуге 6М («ELMI», Латвия) в течение 8 мин при 3500 об/мин. Ультрафильтрацию проводили на установке Владисарт (Владисарт, Россия) с использованием модулей VivaFlow200 (Sartorius, Германия). Были получены высоко- (Мм > 30 кДа), средне- (Мм = 5-30 кДа) и низкомолекулярные (Мм < 5 кДа) белковые и белково-пептидные ультрафильтраты. Концентрацию белка в экстрактах и ультрафильтратах определяли на фотометре BioChem SA (HTI, США) биуретовым методом. Полученные экстракты и ультрафильтраты высушивали на лиофильной сушке (ИНЕЙ-4, Россия) при температуре минус 41±1°C, вакууме 3,9±0,1 Па.

Анализ белково-пептидного состава выполняли методом электрофореза по Лэммли в 15 % и 18 % ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия в камере типа «VE-10» (Hellicon, США) при постоянной силе тока 30 мА и напряжении 55В и 150В в течение 2 часов. В качестве стандарта использовали маркер Thremo (Thremo, Литва).

Анализ пептидного профиля исследуемого сырья проводили в сравнении с мышечной тканью (свинина) на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии с трехквартопольным масс-спектрометром (жидкостной хроматограф AGILENT 1200 С с масс- селективным детектором AGILENT 6410, США).

Антибактериальную активность определяли диско- диффузионным методом: в чашки Петри на поверхность агара газоном высевали культуры *E. coli* и

*P. vulgaris*, затем подсушенные диски, смоченные растворенными в дистиллированной воде лиофилизатами (концентрации: 0,1 г/мл, 0,05 г/мл, 0,025 г/мл, 0,012 г/мл) выкладывали на агар. Чашки Петри с посевами инкубировали при температуре 37 °С в термостате ТС-1/20 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия), через 20 и 40 часов измеряли зоны подавления роста культур.

#### Результаты исследований

Результаты измерения концентрации белка в экстрактах и ультрафильтратах экстрактов слизистых оболочек представлены в таблице 1. Наибольшее содержание белка в нативном экстракте наблюдалось в слизистой оболочке носовой полости (17,0±1,2 г/л), в высокомолекулярном ультрафильтрате экстракта слизистой оболочки носовой полости (39,5±1,05 г/л), средномолекулярной фракции слизистой оболочки прямой кишки (1,1±0,07 г/л) и низкомолекулярном ультрафильтрате слизистой оболочки ротовой полости (1,9±0,2 г/л).

Таблица 1

Концентрация белка в экстрактах и ультрафильтратах экстрактов слизистых оболочек

Образец слизистой оболочки	Нативный экстракт	Концентрация белка, г/л		
		>30кДа	5-30 кДа	<5кДа
Ротовая полость	13,9±0,4	27,2±0,75	0,76±0,6	<b>1,9±0,2</b>
Носовая полость	<b>17,0±1,2</b>	<b>39,5±1,05</b>	0,46±0,3	1,1±0,4
Язык	15,1±0,4	32,5±1,5	0,42±0,3	1,5±0,1
Прямая кишка	10,6±0,3	21,2±0,9	<b>1,1±0,07</b>	0,75±0,2

Электрофоретический анализ экстрактов слизистых оболочек носовой и ротовой полостей, языка и прямой кишки показал наличие широкого диапазона белков с молекулярной массой от 5 до 200 кДа (Рисунок 1, 2). Существенных качественных и количественных различий в составе протеомного профиля исследуемых образцов от 38 до 120 кДа замечено не было. Однако в области 18-30 кДа были отмечены различия: в треке экстракта слизистой оболочки носовой полости наблюдалась полоса, соответствующая смеси белков с молекулярной массой 19-20 кДа, которая не детектировалась в треках остальных образцов. Большая вариабельность белковых полос наблюдалась в треках всех экстрактов в области от 5 до 15 кДа: во всех треках отмечалось наличие белковой смеси с молекулярной массой 10-11 кДа, наибольшая интенсивность отмечена в экстракте ротовой полости; во всех образцах детектировалась фракция с молекулярной массой 14 кДа за исключением экстракта прямой кишки, а также была обнаружена фракция с молекулярной массой <5 кДа с наибольшей интенсивностью проявления в слизистой оболочке языка (Рисунки 1 и 2).

Сопоставление полученных электрофореграмм с базами данных UniProt ProteinDataBase позволяет сделать предположение, что исследуемых слизистых оболочках присутствуют белки, вовлеченные в иммунный ответ и проявляющие антимикробную активность прямым или опосредованным путем, например, интегрин-β (Мм 87 и 86 кДа), β-катенин (Мм 85 кДа), α-TNF (50

кДа), рге/рго- $\beta$ -дефензина 129 белок (19 кДа), кателин (10,8 кДа),  $\beta$  - дефензин (7 кДа, 7,4 кДа, 17 кДа) [15].

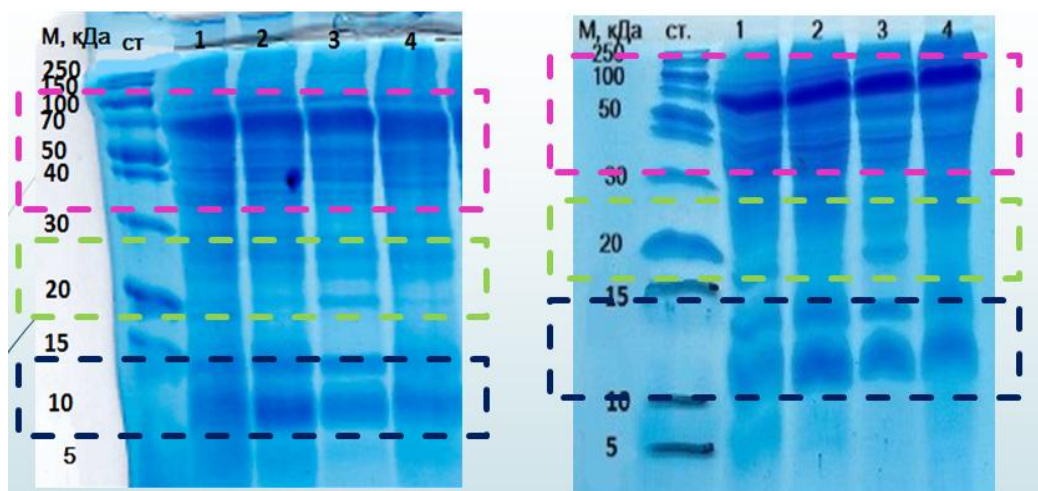


Рис. 1. Электрофорез в 15 % ПААГ Рис. 2. Электрофорез в 18 % ПААГ

Условные обозначения: Ст - Маркеры молекулярной массы (250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 и 5 кДа), 1- слизистая оболочка языка, 2- слизистая оболочка ротовой полости, 3- слизистая оболочка носовой полости, 4- слизистая оболочка прямой кишки  
Окраска КумассиG-250. Пунктирными прямоугольниками показаны зоны расположения высокомолекулярной белковой фракции (Мм>30 кДа) – розовый, среднемoleкулярной белковой фракции (Мм=5-30 кДа) – зеленый низкомoleкулярной пептидной фракции (Мм <5 кДа) – синий.

Анализ пептидного профиля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии показал, что экстракты слизистых оболочек ротовой и носовой полостей, языка и прямой кишки обладают высокой тканевой специфичностью, характеризующейся наличием пептидного пула (молекулярная масса до 2000Да) отличного от пула мышечной ткани свиньи (рисунки 3–7).

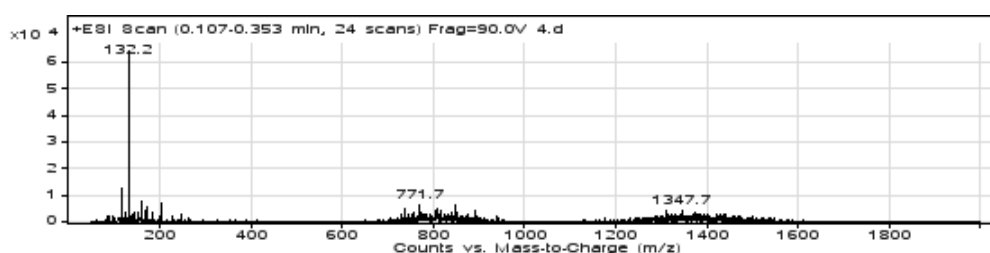


Рис. 3. Пептидный профиль мышечной ткани свиньи

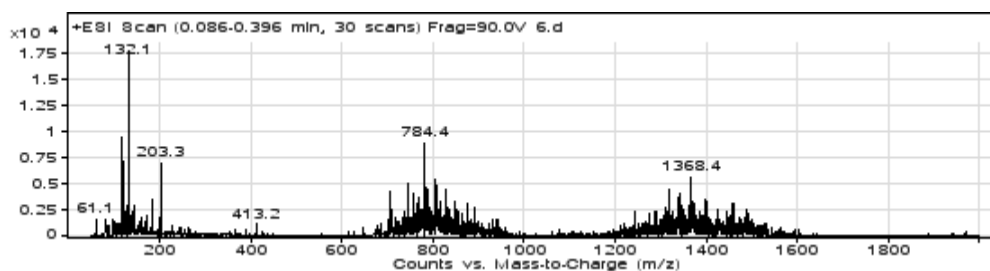


Рис. 4. Пептидный профиль слизистой оболочки ротовой полости

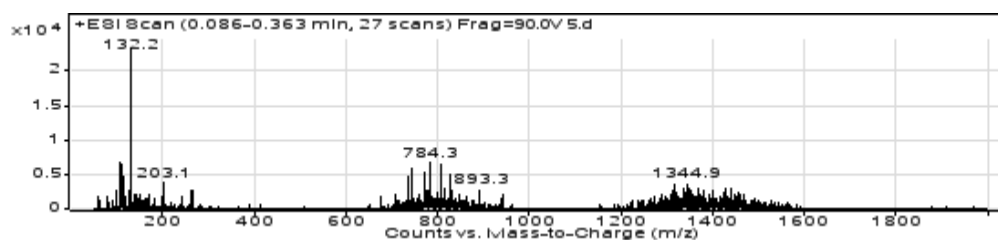


Рис. 5. Пептидный профиль слизистой оболочки носовой полости

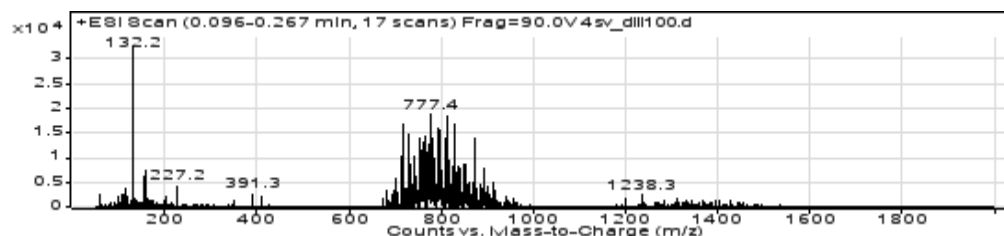


Рис. 6. Пептидный профиль слизистой оболочки языка

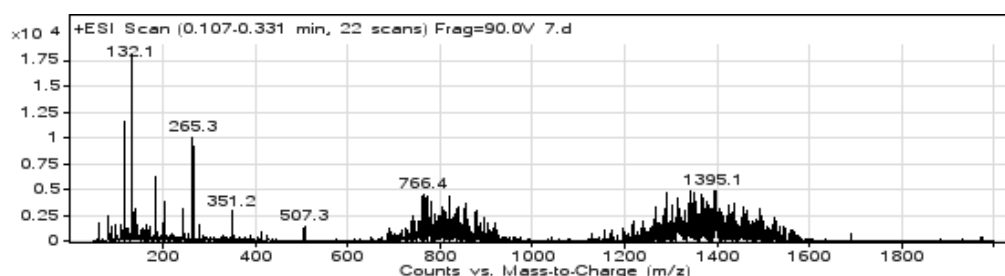


Рис. 7. Пептидный профиль слизистой оболочки прямой кишки

Ряд идентичных пептидов в диапазоне от 130 до 170 Да был отмечен в спектрах пептидного пула слизистых оболочек ротовой и носовой полостей, идентичность в этой области наблюдалась также в отношении слизистых оболочек языка и прямой кишки. В диапазоне от 680 до 880 Да идентичные пептиды были обнаружены в экстрактах слизистых оболочек ротовой полости и языка, схожесть наблюдалась также в слизистых оболочках носовой полости и прямой кишки. Идентичные пептиды также были обнаружены в диапазоне от 1258 до 1395 Да в экстрактах слизистых оболочек ротовой и носовой полостей, прямой кишки.

В экстракте слизистой оболочки ротовой полости было обнаружено 47 тканеспецифичных пептидов, в экстракте слизистой оболочки носовой полости – 23, в экстракте слизистой оболочки прямой кишки – около 31 пептида. Ряд специфичных пептидов наблюдался в экстракте слизистой оболочки ротовой полости в диапазонах от 1530,9 до 1244,2 Да, 899,8 - 827,8 Да и 802,9 - 703,2 Да, в экстракте слизистой оболочки прямой кишки – в диапазонах от 1537,0 до 1241,0 Да и 887,6 - 825,1 Да и слизистой носовой полости – в диапазонах 1494,9 - 1247,3 Да и 731,3 - 709,9 Да. В экстракте слизистой оболочки языка тканеспецифичных пептидов в диапазоне до 2000 Да обнаружено не было.

Исследование антимикробной активности показало наличие специфической активности у всех исследуемых образцов. В концентрации 0,1 г/мл наибольшие зоны подавления роста обнаруживались вокруг дисков, смоченных в ультрафильтратах экстракта слизистых носовой полости с молекулярной мас-

сой белковых и белково-пептидных веществ < 5 кДа (7 мм.), 5 - 30 кДа (4,5 мм.), > 30 кДа (3 мм.) и в высокомолекулярном ультрафильтрате экстракта языка (4мм) (рисунок 8).

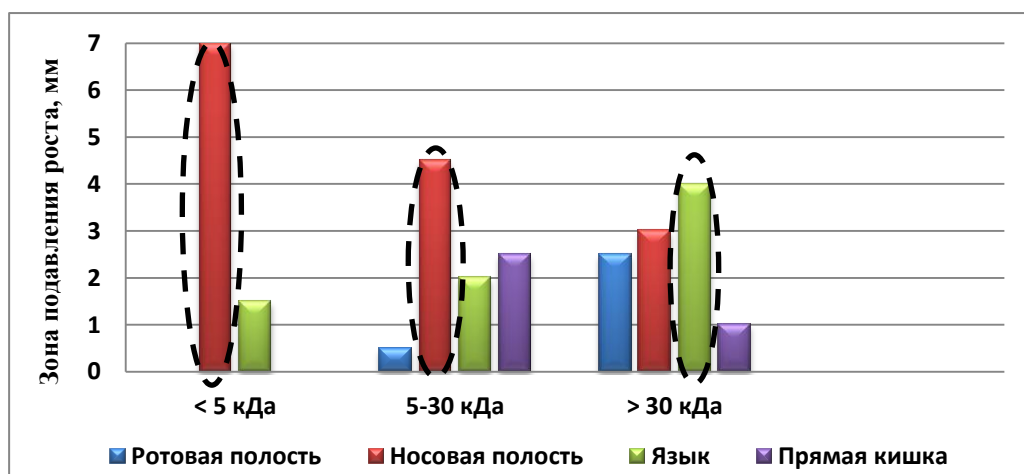


Рис. 8. Антибактериальная активность исследуемых образцов (концентрация 0,1 г/мл)

При использовании концентрации 0,05 г/мл наибольшую активность показали ультрафильтраты носовой полости (<5 кДа и >30 кДа): зоны подавления роста составили 2,0-2,5 мм. В среднеммолекулярном диапазоне наибольший эффект был отмечен у ультрафильтрата экстракта слизистой ротовой полости: зона подавления роста – 2 мм (рисунок 9).

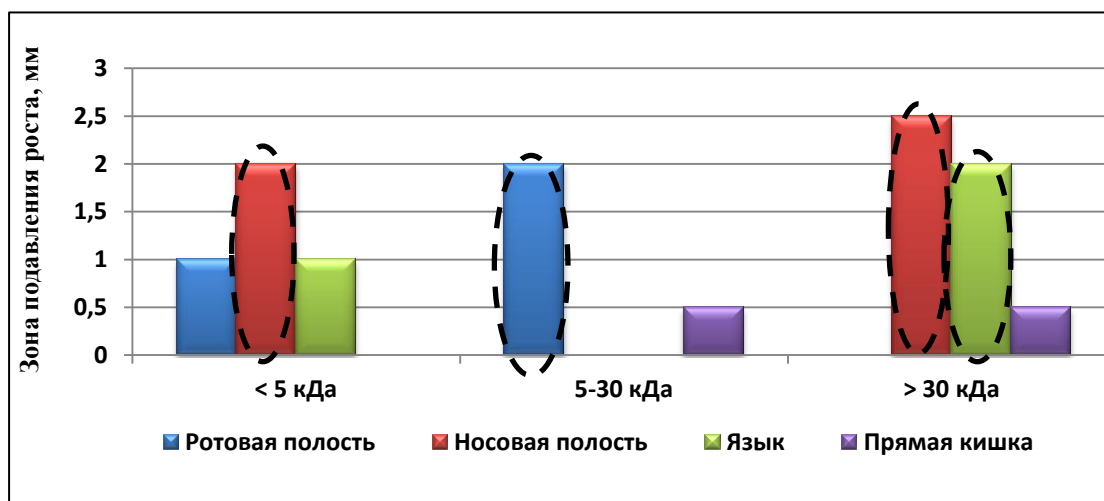


Рис. 9. Антибактериальная активность исследуемых образцов (концентрация 0,05 г/мл)

При снижении концентрации исследуемых веществ до 0,025 г/мл сохранение антибактериальной активности наблюдалось преимущественно у высокомолекулярных ультрафильтратов экстрактов носовой полости и языка: зоны подавления роста составили 7,5 мм и 5,0 мм, соответственно (рисунок 10).

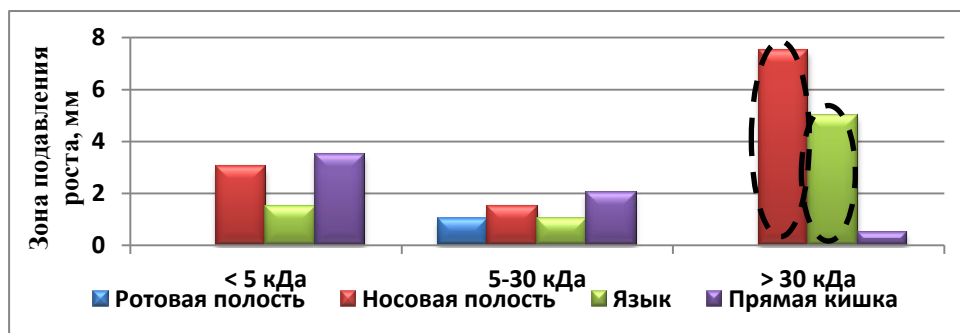


Рис. 10. Антибактериальная активность исследуемых образцов (концентрация 0,025 г/мл)

В концентрации 0,012 г/мл антибактериальная активность проявлялась у низкомолекулярного ультрафильтрата экстракта ротовой полости и высокомолекулярного ультрафильтрата экстракта языка: зоны подавления роста составили 4,5 мм и 6,0 мм, соответственно (рисунок 11).

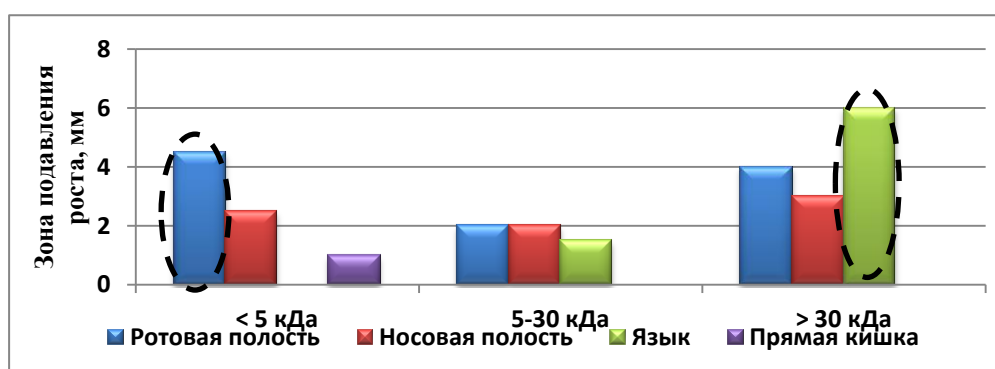


Рис. 11. Антибактериальная активность исследуемых образцов (концентрация 0,012 г/мл)

### Выводы

Исследование протеомного профиля экстрактов слизистых оболочек не выявило существенных отличий в высокомолекулярной области, однако качественные и количественные отличия наблюдались в средне- и низкомолекулярных областях. При общем сохранении аналогичности треков исследуемых образцов наблюдались следующие различия: в треке слизистой оболочки носовой полости в области от 18 до 30кДа была отмечена белковая фракция, соответствующая молекулярной массе 19-20 кДа; в экстракте ротовой полости белковая смесь с молекулярной массой 10-11 кДа присутствовала в большем количестве, чем у остальных образцов; во всех образцах прослеживалась фракция с молекулярной массой 14кДа за исключением экстракта прямой кишки; в слизистой оболочке языка обнаружено количественное увеличение фракции с молекулярной массой <5кДа.

В экстрактах слизистых оболочек выявлены тканеспецифичные вещества пептидной природы: в ротовой полости - 47 пептидов (Мм 1537,0 - 1241,0 Да и

802,9 - 703,2 Да), в носовой полости – 23 (731,3 - 709,9 Да), в прямой кишке – около 31 пептида (899,8 - 825,1 Да).

Наибольшей антибактериальной активностью обладали высокомолекулярные ультрафильтраты слизистой оболочки носовой полости и языка в концентрациях 0,025 г/мл и 0,012 г/мл, а также низкомолекулярный ультрафильтрат экстракта слизистых носовой полости. Зоны подавления роста достигали 7,0 мм. Предположительно активность высокомолекулярных ультрафильтратов обеспечивается литическими ферментами, тогда как активность в низкомолекулярной области обеспечивается присутствием АМП.

Таким образом, слизистые оболочки, являясь пограничными зонами, содержат большое количество высокоспецифичных белков и пептидов, обладающих выраженной антимикробной направленностью. Результаты работы открывают перспективу для разработки альтернативных антибиотических препаратов животного происхождения, оказывающих минимальное негативное воздействие на макроорганизм. Наиболее перспективными для выделения и дальнейшего изучения биологически активных веществ являются слизистые оболочки ротовой и носовой полостей.

## Литература

1. Абатуров А.Е. Катионные антимикробные пептиды системы неспецифической защиты респираторного тракта: дефензины и кателицидины / А. Е. Абатуров // Здоровье ребенка. – 2011. – Т. 7.
2. Большенкова Д.А., Сысуев Е.Б. Пищевые добавки. Влияние на организм человека/ Д.А. Большенкова, Е.Б. Сысуев// Успехи современного естествознания. – 2013. - № 9. – С. 91.
3. Ильяшенко, М. Г. / Эндогенные антимикробные пептиды и их клинко-патогенетическая значимость при воспалительных заболеваниях кишечника / М.Г. Ильяшенко, Г.Н. Тарасова, А.И. Гусева // Медицинские науки. – 2012. – №2.
4. Марков И.С. Осторожно, антибиотики: оранжевый сигнал тревоги! // Издательство «АртЭк», 2012. – 32 с.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский // Новая Волна, – 2002, – С. 540.
6. Маюрникова Л.А., Куракин М.С. Пищевые и биологически активные добавки: учебное пособие / Л.А. Маюрникова, М.С. Куракин. – Кемерово, 2006 –124с.
7. Федулова Л.В. О продлении сроков хранения мясного сырья / И.М. Чернуха, А.Н. Макаренко, Л.В. Федулова, Г.С. Толмачева // Мясная индустрия.– 2012. – 10. – С.12-15 .
8. Bamdad F. , Sun X. ,Guan L. L. , Chen L. Preparation and characterization of antimicrobial cationized peptides from barley (*Hordeumvulgare* L.) proteins /F. Bamdad, X. Sun, L. L. Guan,L. Chen // LWT - Food Science and Technology. –V. 63, –I. 1, – 2015. –P. 29–36.



9. Bea S. R., Petraglia F.A., Luque Johnson E. L. Synthesis, antimicrobial activity and toxicity of analogs of the scorpion venom BmKn peptides / R. S. Bea, A.F. Petraglia, L. E. Luque Johnson // *Toxicon*. – V. 101, – 2015, – P. 79–84.
10. Dunshea F.R., D'Souza D.N., Jensen B.B., Engberg R.M.F.R. Dunshea / Meat, animal, poultry and fish production and management / , D.N. D'Souza, B.B. Jensen, R.M. Engberg // *Encyclopedia of Meat Sciences*. – 2014. – P. 172–176.
11. Holden W. M. , Reinert L. K. , Hanlon S.M. , Parris M. J. , Rollins-Smith L. A. Development of antimicrobial peptide defenses of southern leopard frogs, *Ranas phenocephala*, against the pathogenic chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*/ W. M. Holden, L. K. Reinert, S.M. Hanlon, M. J. Parris, L. A. Rollins-Smith // *Developmental & Comparative Immunology*. – , – 2015. – V. 48, I. 1. – P. 65–75.
12. McDonald M., Mannion M., Pike D., Lewis K. , Flynn A. , Brannan A. M. , Browne M.J. , Jackman D. , Madera L. , Power Coombs M. R. , Hoskin D. W. , Rise M. L. , Booth V. Structure–function relationships in histidine-rich antimicrobial peptides from Atlantic cod *Biochimica et Biophysica Acta* / M. McDonald, M. Mannion. D. Pike, K. Lewis, A. Flynn, A. M. Brannan, M.J. Browne, D. Jackman, L. Madera. M. R. Power Coombs, D. W. Hoskin, M. L. Rise, V. Booth // (BBA) - *Biomembranes*. – – 2015. – V. 1848, I. 7. – P. 1451–1461.
13. Sebastian G.B. Amyes, Benjamin A. Evans / Chapter 33 Molecular Epidemiology of Antibiotic Resistance in Humans and Animals // *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. – 2015. – P. 599–609.
14. Stanton T. B. A call for antibiotic alternatives research / B. T. Stanton // *Trends Microbio*–2013. – № 21(3). – P. 111–113.
15. UniProt Protein database [электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.uniprot.org/>.