

госпитализация в стационаре, реанимационном отделении, отсутствие естественного вскармливания и антибактериальная терапия способствуют контаминации толстой кишки ГОЭБ, которые сохраняются длительное время.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляева И.А., Бомбардинова Е.П., Турти Т.В., Митиш М.Д., Потехина Т.В. Кишечная микробиота у недоношенных детей — современное состояние проблемы (обзор литературы). Педиатрическая фармакология. 2015, 12 (3): 296-303.
2. Кафарская Л.И., Ефимов Б.А., Постникова Е.А., Донских Е.Е. Особенности становления микрофлоры у детей раннего возраста. Детские инфекции. 2006, 1: 6-11.
3. Лифшиц К., Захарова И.Н., Дмитриева Ю.А. Влияние кишечного микробиома в норме и патологии. Медицинский совет. 2017, 1: 155-159.
4. Макарова С.Г., Намазова-Баранова Л.С. Кишечная микробиота и использование пробиотиков в практике педиатра. Что нового? Педиатрическая фармакология. 2015, 12 (1): 38-45.
5. Малыгина О.Г., Бажукова Т.А. Влияние антибиотиков на формирование микроэкологии у недоношенных детей с низкой и экстремально низкой массой тела при рождении. Журн. микробиол. 2014, 1: 61-65.
6. Набока Ю.Л., Рымашевский А.Н., Свирава Э.Г., Брагина Л.Е. Формирование микрофлоры пищеварительного тракта новорожденных в динамике. Журн. микробиол. 2012, 3: 65-70.
7. Пахомовская Н.Л., Потапов А.С., Вольнец Г.В. Дисбактериоз кишечника. Медицинский совет. 2015, 6: 38-42.
8. Печуров Д.В., Турти Т.В., Беляева И.А., Тяжева А.А. Микробиота кишечника у детей: от профилактики нарушений становления к предупреждению неинфекционных заболеваний. Педиатрическая фармакология. 2016, 13 (4): 377-383.
9. Чаплин А.В., Ребриков Д.В., Болдырева М.Н. Микробиом человека. Вестник РГМУ. 2017, 2: 5-13.
10. Toscano M., De Grandi R., Grossi E. et al. Role of the human breast milk-associated microbiota on the newborns' immune system: a mini review. Front. Microbiol. 8:2100. DOI: 10.3389/fmicb. 2017.02100.

Поступила 06.03.18

Контактная информация: Малыгина Ольга Геннадьевна,
163000, Архангельск, пр. Троицкий, 51, р.т. (818)28-57-65

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.В.Цветкова^{1,2}, Г.М.Алешина², Л.Е.Леонова¹, О.В.Шамова^{1,2}, Е.В.Романовская¹, В.Н.Кокряков^{1,2}

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА θ -ДЕФЕНСИНОВ ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ГАМАДРИЛА *Papio hamadryas*

¹Санкт-Петербургский государственный университет, ²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

Цель. Изучение функциональных свойств катионных антимикробных пептидов θ -дефенсинов, выделенных из лейкоцитов крови гамадрила *Papio hamadryas*. *Материалы и методы.* θ -Дефенсины гамадрила были выделены из экстрактов лейкоцитарной массы методами ультрафильтрации, препаративного электрофореза и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве тестовых микроорганизмов использовали грамотрицательные бактерии *Escherichia coli*, грамположительные бактерии *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*, грибы *Candida albicans*. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) определяли, тестируя последовательные разведения исследуемых пептидов методом радиальной диффузии в агарозном геле. Микробоцидное действие оценивали методом подсчета выживших КОЕ после инкубации с пептидами. Влияние θ -дефенсинов на проницаемость мембран *E.coli* оценивали с помощью хромогенных маркеров о-нирофенил- β -D-галактопиранозида и нитроцефина. *Результаты.* Сравнительный анализ антимикробных свойств θ -дефенсинов гамадрила показал, что

они обнаруживают широкий спектр антимикробного действия, сопоставимый с θ -дефенсином макаки резус RTD-1 и проявляют бактерицидный и фунгицидный эффекты в микромолярных концентрациях. Изучено влияние различных условий среды (низкая и повышенная ионная сила, содержание в среде сыворотки крови) на антимикробную активность θ -дефенсинов. Показано, что θ -дефенсины обладают способностью увеличивать проницаемость наружной мембраны *E.coli*, однако в отличие от α -дефенсинов не оказывают заметного влияния на проницаемость внутренней мембраны. *Заключение.* Выделенные из лейкоцитов крови гамадрила θ -дефенсины являются эффективными антимикробными агентами с широким спектром микробицидного действия. θ -Дефенсины гамадрила в отличие от α -дефенсинов сохраняют антимикробную активность в средах с повышенной ионной силой. θ -Дефенсины увеличивают проницаемость наружной, но не цитоплазматической мембраны *E.coli*, что позволяет предположить механизм антимикробного воздействия этих пептидов, отличный от α -дефенсинов.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 66—73

Ключевые слова: врожденный иммунитет, антимикробные пептиды, θ -дефенсины, гамадрил *Papio hamadryas*

E.V.Tsvetkova^{1,2}, *G.M.Aleshina*², *L.E.Leonova*¹, *O.V.Shamova*^{1,2}, *E.V.Romanovskaya*¹, *V.N.Kokryakov*^{1,2}

FUNCTIONAL EFFECTS OF θ -DEFENSINS FROM BLOOD LEUKOCYTES OF BABOON *PAPIO HAMADRYAS*

¹Saint-Petersburg State University, ²Research Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

Aim. Study the functional properties of cationic antimicrobial peptides θ -defensins isolated from baboon *Papio hamadryas* blood leukocytes. *Materials and methods.* Baboon θ -defensins were extracted from leukocyte mass using ultrafiltration, preparative electrophoresis and reverse phase high performance liquid chromatography. The test microorganisms used were Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, Gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, and fungi *Candida albicans*. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by testing serial dilutions of the test peptides by radial diffusion in agarose gel. Microbicidal action was evaluated by counting surviving colony forming units after incubation microorganisms with the peptides. The θ -defensins influence on *E.coli* membrane permeability was assessed using chromogenic markers o-nitrofenil- β -D-galactopyranoside and nitrocefin. *Results.* The analysis of the θ -defensins antimicrobial properties showed that they produce antimicrobial activity against test microorganisms, exhibiting bactericidal and fungicidal effects at micromolar concentrations. We studied the influence of different environmental conditions (low and high ionic strength, blood serum in medium) for antimicrobial activity. It is shown that θ -defensins have the ability to increase the outer membrane of *E.coli* permeability, however, in contrast to α -defensins have no noticeable influence on the inner membrane permeability. *Conclusion.* Baboon θ -defensins isolated from blood leukocytes are effective antimicrobial agents with a broad spectrum of microbicidal action. θ -Defensins baboon unlike α -defensins exhibit antimicrobial activity in environments with high ionic strength. θ -Defensins increase the outer membrane of *E.coli* permeability but not the cytoplasmic membrane, suggesting that the mechanism of antimicrobial effect of these peptides other than α -defensins.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 66—73

Key words: innate immunity, antimicrobial peptides, θ -defensins, baboon *Papio hamadryas*

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря своей генетической и физиологической близости к человеку низшие узконосые обезьяны семейства мартышковых, представителем которых является гамадрил, широко используются в медицинских и биологических экспериментах, в том числе и при изучении различных патологических процессов и заболеваний человека инфекционной природы. Основой изучения инфекционных заболеваний в экспериментах

с использованием обезьян является создание и сравнительное исследование моделей инфекций, многие из которых не воспроизводятся на других лабораторных животных. При этом необходимо учитывать, что защитные факторы низших обезьян и, в частности, факторы врожденного иммунитета, к которым относятся антимикробные белки и пептиды лейкоцитов крови, могут отличаться от таковых человека, поэтому их сравнительное изучение представляет определенный интерес. Антимикробные пептиды (АМП) являются важнейшей составляющей врожденного иммунитета млекопитающих и представлены у них, главным образом, двумя семействами: кателицидинами и дефенсинами. Последние представляют небольшие амфипатические катионные пептиды с тремя внутримолекулярными дисульфидными связями, высоким содержанием аминокислотных остатков аргинина, лизина и аминокислот с гидрофобными боковыми радикалами [6]. Дефенсины приматов подразделяются на три подсемейства: α -дефенсины, выделенные из лейкоцитов и клеток Паннета в тонком кишечнике; β -дефенсины, найденные в эпителиях дыхательного, желудочно-кишечного и мочеполового трактов; и наконец, θ -дефенсины, которые выделены пока только из лейкоцитов низших узконосых обезьян макака резус *Macaca mulatta* [9] и павианов рода *Papio* [3,8]. θ -Дефенсины по своим структурным и функциональным свойствам существенно отличаются от других АМП млекопитающих, представляя единственные известные на настоящий момент макроциклические пептиды у животных. Три θ -дефенсина RTD 1-3 макаки резус проявляли широкий спектр антимикробной и противовирусной активности, в том числе, в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов, вирусов простого герпеса и иммунодефицита человека, при этом антибактериальная активность θ -дефенсинов, в отличие от таковой α - и β -дефенсинов, сохраняется при физиологических концентрациях хлорида натрия в среде *in vitro* [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Два θ -дефенсина RTD-1 и RTD-3 (*Papio theta defensin*) гамадрила были выделены из уксуснокислых экстрактов лейкоцитарной массы и очищены до гомогенного состояния методами ультрафильтрации, препаративного электрофореза в полиакриламидном геле и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, как описано в [8]. В качестве контрольных пептидов использовали α -дефенсин человека HNP-1, θ -дефенсин RTD-1 макаки резус и протегрин свиньи PG-1, первые два пептида были выделены нами из лейкоцитов человека и макаки резус, согласно описанным методикам [5]. Протегрин свиньи PG-1 был предоставлен R.I. Lehrer. Концентрации пептидов рассчитывали методом, предложенным Pace C.N. et al. [7]

В качестве тестовых микроорганизмов использовали грамотрицательные бактерии *E.coli*, штамм ML35p; грамположительные бактерии *L.monocytogenes*, штамм EGD и *S.aureus*, штамм MRSA ATCC 33591; грибы *Candida albicans*, штамм 820. Для определения антимикробной активности индивидуальных фракций использовали метод радиальной диффузии пептидов в агарозном геле, содержащем тестируемые микроорганизмы [5]. Микроорганизмы предварительно культивировали в течение 16 ч в среде, представляющей 3% раствор триптического гидролизата сои (для бактерий) (Sigma, США) и среды Сабуро (для *C. albicans*) (Sigma, США) при 37°C. Аликвоты культур переносили затем отдельно в свежеприготовленные среды и инкубировали при 37°C на водяной бане с шейкером в течение 2,5 ч для получения микроорганизмов, находящихся в середине логарифмической фазы роста. Количество клеток каждого из микроорганизмов оценивали, измеряя оптическую плотность суспензий на спектрофотометре при длине волны 620 нм. Считали, что оптическая плотность 1,0 соответствует концентрации $2,5 \times 10^8$ КОЕ/мл для бактерий и $2,86 \times 10^7$ КОЕ/мл для *C. albicans*. Аликвоты суспензий, содержащие 4×10^6 клеток микроорганизмов, перемешивали с 10 мл стерильной 1% агарозы в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 при температуре 42°C. Полученную смесь выливали в стерильные чашки Петри и оставляли при комнатной температуре до застывания. В лунки, сделанные аппликатором (диаметр 3 мм), вносили анализируемые образцы в объеме 5 мкл и инкубировали в воздушном термостате в течение 3 ч при 37°C. Затем чашки заливали 1% агарозой, содержащей 6% ТГС (для бактерий) или 6% среду Сабуро (для *C. albicans*) и

инкубировали в течение 18 часов при 37°C. Диаметр зоны ингибирования роста (зона вокруг лунки, свободная от микроорганизмов) измеряли, принимая за 1 условную единицу антимикробной активности 0,1 мм и вычитая из измеренного значения 30 условных единиц, соответствующих диаметру самой лунки. При изучении влияния на антимикробную активность пептидов повышенной ионной силы среды в агарозный гель добавляли NaCl в конечной концентрации от 0 до 0,2 М. Для изучения влияния на антимикробную активность сывороточных белков в агарозный гель, содержащий микроорганизмы, была добавлена стерильная жидкая сыворотка крови эмбрионов коров (Биолот, Россия) в конечных концентрациях 5, 10 и 15%.

Для определения минимальных ингибирующих рост микроорганизмов концентраций (МИК) антимикробную активность последовательных разведений исследуемых пептидов, начиная с 50 мкМ, анализировали методом радиальной диффузии. МИК определяли путем построения линейных регрессий зависимости антимикробной активности от концентрации пептидов. Точка пересечения графика регрессии с осью абсцисс принималась за МИК.

Микробоцидное действие выделенных пептидов оценивали методом подсчета колоний. Культуры микроорганизмов готовили, как описывалось выше. Аликвоты культур микроорганизмов (5 мкл) с концентрацией 2×10^6 КОЕ/мл помещали в эппендорфы с 5 мкл последовательных разведений пептидов (конечная концентрация от 5 до 0,625 мкМ). Инкубировали при 37°C на шейкере. Через 1 ч инкубационную смесь разводили 0,1 мМ натрий-фосфатным буфером, рН 7,4 до 0,5 мл и отбирали аликвоты 50 мкл. При изучении микробоцидного действия пептидов на *E.coli* ML35p в зависимости от времени инкубации концентрация микроорганизмов составляла 2×10^7 КОЕ/мл. Аликвоты культуры *E.coli* ML35p (5 мкл) помещали в эппендорфы с 5 мкл пептидов (конечная концентрация пептидов 2,5 мкМ). Инкубировали при 37°C на шейкере. Через определенные промежутки времени (2, 5, 10, 15, 30 мин) инкубационную смесь разводили в 1000 раз 0,1 мМ натрий-фосфатным буфером, рН 7,4, отбирали аликвоты 50 мкл. Отобранные аликвоты переносили на чашки Петри с 1% агарозой, содержащей 3% ТГС (для бактерий) или 3% среду Сабуро (для грибов) и равномерно распределяли по поверхности агарозы стеклянной палочкой. Чашки инкубировали при 37 °C в течение 16–18 ч, после чего визуально производили подсчет колоний. Одна выжившая КОЕ соответствовала 1000 КОЕ в исходной культуре микроорганизмов. При изучении микробоцидного действия пептидов на *E.coli* ML35p в зависимости от времени инкубации одна выжившая КОЕ соответствовала 10000 КОЕ в исходной культуре.

При изучении влияния пептидов на проницаемость внешней и цитоплазматической мембран грамотрицательной бактерии *E.coli* ML35p оценивали увеличение проницаемости мембран бактерии для хромогенных маркеров — о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида, субстрата для фермента β-галактозидазы, локализованного в цитоплазме бактерии и нитроцефина, субстрата для фермента β-лактамазы, находящегося в периплазматическом пространстве [4]. При нарушении целостности мембран они становятся проницаемыми для субстратов и продуктов ферментативных реакций. За ходом ферментативных реакций наблюдали спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при длине волны 420 нм для оценки проницаемости наружной мембраны бактерии и при длине волны 486 нм — для цитоплазматической.

Статистическую обработку результатов опытов проводили с использованием традиционных методов вариационной статистики. Представленные данные являются усредненными значениями, полученными в трех независимых экспериментах, каждый эксперимент проводили в трипликате. При обработке данных использовали пакет программ Statistica 6.0. и Sigma Plot 11.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты определения МИК выделенных из лейкоцитов крови гамадрила θ-дефенсинов (PTD-1 и PTD-3), и контрольных пептидов (α-дефенсин человека HNP-1, θ-дефенсин RTD-1 макаки резус и протегрин свиньи PG-1) в среде, не содержащей NaCl, и в присутствии 0,1 М NaCl представлены в табл. Их сравнительный анализ показал, что все пептиды проявляют антимикробную активность против всех четырех

Минимальные ингибирующие концентрации антимикробных пептидов (мкМ), определенные методом радиальной диффузии в среде, не содержащей NaCl и сыворотки крови, в присутствии 0,1 М NaCl и в присутствии сыворотки крови

Микроорганизмы	Среда	Пептиды				
		PTD-1	PTD-3	RTD-1	PG-1	HNP-1
<i>L.monocytogenes</i>	без NaCl и с.к.	1,4±0,3	1,3±0,5	1,2±0,3	1,2±0,2	1,7±0,2
	+ 0,1 М NaCl	1,4±0,5	1,4±0,5	1,3±0,5	1,0±0,3	1,9±0,6
	с с.к. 5%	1,3±0,2	1,5±0,3	1,1±0,2	1,1±0,2	3,4±0,8
	с с.к. 10%	1,5±0,4	1,5±0,5	1,7±0,5	1,2±0,2	7,6±1,8
	с с.к. 15%	3,8±0,8	3,9±0,9	4,3±0,9	1,6±0,9	>25
<i>E.coli</i>	без NaCl и с.к.	1,5±0,3	1,7±0,3	1,8±0,4	1,2±0,2	1,7±0,4
	+ 0,1 М NaCl	2,0±0,3	2,2±0,4	1,9±0,3	1,0±0,3	7,6±1,5
	с с.к. 5%	4,2±1,0	5,1±1,2	3,2±0,5	1,5±0,3	>25
	с с.к. 10%	15,2±3,2	10,5±3,7	12,6±2,4	2,3±0,7	>25
	с с.к. 15%	>25	>25	>25	3,7±1,2	>25
<i>C.albicans</i>	без NaCl и с.к.	1,6±0,4	1,4±0,2	1,7±0,3	1,1±0,2	2,6±0,8
	+ 0,1 М NaCl	6,5±1,5	7,4±2,0	3,9±0,9	1,5±0,3	>25
	с с.к. 5%	>25	>25	>25	не исслед.	>25
	с с.к. 10%	>25	>25	>25	не исслед.	>25
	с с.к. 15%	>25	>25	>25	не исслед.	>25
<i>S.aureus</i>	без NaCl и с.к.	2,5±0,6	1,7±0,3	2,1±0,5	1,2±0,3	4,1±1,2
	+ 0,1 М NaCl	3,6±1,2	4,5±1,0	2,8±0,8	1,1±0,2	>25
	с с.к. 5%	4,3±0,5	5,3±0,7	5,6±0,5	1,5±0,4	7,1±1,5
	с с.к. 10%	6,3±0,6	7,1±0,9	7,6±0,7	1,6±0,4	>25
	с с.к. 15%	7,9±0,9	8,8±1,0	9,8±1,1	2,1±0,6	>25

Примечание. с.к. — сыворотка крови.

тестируемых микроорганизмов в микромолярных концентрациях в среде, не содержащей NaCl, причем наибольшая антимикробная активность, которая сохранялась и при добавлении в среду 0,1 М NaCl, наблюдалась в отношении *L.monocytogenes*. В отношении *S.aureus* и *C.albicans* МИК θ -дефенсинов гамадрила PTD-1 и PTD-3 были сравнимы с МИК θ -дефенсина макаки резус RTD-1 и ниже, чем МИК α -дефенсина человека HNP-1. Добавление в агарозный гель 0,1 М NaCl приводило к сохранению антимикробного действия RTD-1 в отношении *S.aureus*, антимикробное действие PTD-1 и PTD-3 несколько снижалось. Еще более выраженное снижение антимикробной активности PTD-1 и PTD-3 в среде с повышенной ионной силой наблюдалось в отношении *C.albicans*. В то же время, антимикробная активность α -дефенсина человека HNP-1 в отношении этих двух микроорганизмов в данных условиях полностью ингибировалась. В отношении *E.coli* исследуемые и контрольные пептиды продемонстрировали схожую антимикробную активность в среде, не содержащей NaCl. При добавлении в агарозный гель 0,1 М NaCl МИК PTD-1, PTD-3 и RTD-1 практически не изменились, в то время как МИК HNP-1 в этих условиях заметно увеличилась. На антимикробную активность протегрина свиньи PG-1 в отношении всех четырех тестируемых микроорганизмов повышение ионной силы среды влияния не оказывало.

Результаты изучения влияния на антимикробное действие выделенных пептидов компонентов сыворотки крови в конечных концентрациях 5, 10 и 15% представлены в табл. Наибольшее влияние добавление сыворотки крови оказывало на антимикробную активность исследуемых пептидов в отношении грибов *C.albicans*, которая полностью ингибировалась уже при 5% концентрации сыворотки в среде. По сравнению с α -дефенсином человека HNP-1, для которого наблюдалось практически полное ингибирование антимикробной активности в отношении *E.coli* уже при 5% концентрации сыворотки в среде, снижение антимикробной активности θ -дефенсинов в отношении этого микроба становилось заметным при концентрациях свыше 5%. В отношении *S.aureus* добавление сыворотки оказывало заметное ингибирующее действие на антимикробную активность как α -дефенсина HNP-1

человека, так и θ -дефенсинов гамадрила и макаки резус, при этом, также как и в экспериментах с *E.coli*, ингибирующий эффект был более выражен для α -дефенсина. Наименьшее воздействие добавление сыворотки оказывало на антимикробную активность θ -дефенсинов в отношении *L.monocytogenes*, для α -дефенсина HNP-1 человека это воздействие было более выраженным — при 15% концентрации сыворотки крови наблюдалось полное ингибирование антимикробной активности.

Микробоцидное действие θ -дефенсинов гамадрила и контрольных пептидов оценивали методом подсчета выживших КОЕ после инкубации с тестируемыми микроорганизмами. Обнаружено, что все пептиды проявляют бактерицидную и фунгицидную активность в отношении всех 4 тестируемых микроорганизмов в микромолярных концентрациях, при этом по своему воздействию РТD-1 и РТD-3 наиболее схожи с РТD-1. Инкубация микроорганизмов с этими пептидами в концентрациях от 2,5 мкМ приводила к 100% гибели *L.monocytogenes*, *E.coli* и *S.albicans*. 100% гибель *S.aureus* наблюдалась при более высокой концентрации пептидов (5 мкМ), хотя МИК этих пептидов в отношении всех тестируемых микроорганизмов примерно одинаковы.

Повреждающее воздействие РТD-1 на наружную и цитоплазматическую мембраны грамотрицательной бактерии *E.coli* ML35p оценивали с помощью хромогенных маркеров — продуктов ферментативных реакций, как описано в разделе «Материалы и методы». В качестве контрольного пептида использовали протегрин свиньи РG-1, обладающий сильно выраженной мембранолитической активностью. Результаты показали процесс увеличения проницаемости наружной мембраны бактерий для нитроцефина при воздействии исследуемых пептидов. Как оказалось, действие РТD-1 гамадрила, также как и РТD-1 макаки резус, в концентрациях 5 мкМ на наружную мембрану бактерий было гораздо менее выражено, чем у протегрина, хотя они тоже обладали способностью повышать ее проницаемость. Из этого следует, что на проницаемость цитоплазматической мембраны бактерии пептиды действуют по-разному: протегрин в течение первых 10 минут эксперимента вызывал выраженное увеличение её проницаемости, в то время как РТD-1 гамадрила, также как и РТD-1 макаки резус в этот же период времени не оказывали заметного влияния на проницаемость цитоплазматической мембраны. Чтобы определить промежуток времени, когда наступала гибель *E.coli*, изучали зависимость бактерицидного действия РТD-1 гамадрила и РТD-1 макаки резус от времени их инкубации с бактерией. Обнаружено, что эти пептиды в концентрации 2,5 мкМ в первые 15 мин инкубации вызывают уменьшение количества жизнеспособных КОЕ на три порядка, в то же время как заметного увеличения проницаемости цитоплазматической мембраны *E.coli* не наблюдается.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе представлены данные по сравнительному изучению антимикробных свойств пептидов РТD-1 и РТD-3, выделенных нами из лейкоцитов крови гамадрила и отнесенных к классу θ -дефенсинов. Первый представитель θ -дефенсинов РТD-1, который также как и θ -дефенсины гамадрила, содержит 18 аминокислотных остатков, был найден у макаки резус в 1999 году, и большинство знаний о функциональных свойствах этих пептидов получены при его исследовании [9]. Наличие пептидной связи между первым и восемнадцатым аминокислотными остатками обуславливает циклическую структуру θ -дефенсинов (иногда используют термин «макроциклическая», чтобы подчеркнуть отличие от α -дефенсинов, циклическая структура которых обусловлена внутримолекулярными дисульфидными связями). Определенное сходство с РТD-1 в структурной организации молекулы имеет протегрин свиньи РG-1, который также состоит из восемнадцати аминокислотных остатков, но имеет в составе молекулы две дисульфидные связи, поэтому при сравнительном изучении антимикробных свойств пептидов гамадрила РТD-1 и РТD-3 использовали θ -дефенсин РТD-1 макаки резус, протегрин свиньи РG-1 и α -дефенсин человека HNP-1 в качестве контроля. При анализе антимикробных свойств θ -дефенсинов прежде всего обращает на себя внимание сохранение или незначительное снижение их антимикробной активности в условиях повышенной ионной силы среды в отличие от α -дефенсинов, чья активность в этих условиях ингибируется практи-

чески полностью. Это явление, характерное, в той или иной степени, для большинства изученных α -дефенсинов, может объясняться ослаблением сорбции пептидов на мембранах микроорганизмов в условиях повышенной ионной силы среды. Также известно, что ациклическая форма RTD-1 в 3 раза менее активна в отношении *S.aureus* и *E.coli*, чем нативный RTD-1, при этом уменьшение активности связывают, скорее, не с изменением конформации пептида, а с появлением дополнительного отрицательного заряда на С-конце молекулы, что способствует ухудшению сорбции ациклического RTD-1 на поверхности мембран микроорганизмов [1]. Из литературных данных известно, α -дефенсины могут связываться с различными сывороточными белками, что приводит к уменьшению антимикробной активности при добавлении в среду сыворотки крови. Так, добавление сыворотки крови человека в концентрации 1 мг сывороточных белков на мл среды вызывало уменьшение антимикробной активности α -дефенсина человека HNP-1 в отношении *E.coli* в два раза и полностью ингибировало активность в отношении *S.aureus* [13]. В то же время, установлено, что антимикробная активность PG-1 в этих условиях не изменялась или изменялась незначительно. Как показали наши исследования, θ -дефенсины в этих условиях проявляют большее сходство с α -дефенсинами, чем с протегрином. Несмотря на некоторое сходство θ -дефенсинов в характере антимикробного воздействия как с PG-1 (сохранение антибактериальной активности при добавлении в среду NaCl), так и с α -дефенсинами его механизмы у этих пептидов, по-видимому, различаются. На это, в частности, указывают эксперименты по исследованию проницаемости наружной и внутренней (цитоплазматической) мембран *E.coli* ML35p под воздействием изучаемых и контрольных антимикробных пептидов. Ранее нами было показано, что α -дефенсины гамадрила, также как α -дефенсины других животных и протегрин PG-1 в концентрациях 5 мкМ проявляли выраженное действие на наружную и внутреннюю мембраны бактерий уже в первые несколько минут эксперимента [12]. Это позволяет предположить, что основной мишенью для поражающего действия α -дефенсинов и протегрина является именно цитоплазматическая мембрана. В то же время, θ -дефенсин RTD-1 макаки резус и θ -дефенсин PTD-1 гамадрила в концентрациях, вдвое превышающих бактерицидные, не оказывали выраженного действия на проницаемость цитоплазматической мембраны. Изучение взаимодействия RTD-1 и PG-1 с липидными бислоями различного состава методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) показало, что эти пептиды взаимодействуют с ними по-разному. Так, степень разрушения липидного бислоя при взаимодействии с PG-1 зависит от его толщины, тогда как RTD-1 вызывает нарушение ориентации бислоя вне зависимости от длины ацильных цепей составляющих его жирных кислот. PG-1, по-видимому, полностью «прошивает» бислой, тогда как RTD-1, скорее всего, связывается с его поверхностью, вызывая образование так называемых липидных цилиндров [2,15]. Если разрушение мембран при взаимодействии с PG-1 можно объяснить его встраиванием в бислой с последующим образованием пор, то в случае с RTD-1 неясно, как происходит разрушение самой мембраны. Данные ЯМР свидетельствуют лишь о менее выраженном воздействии на мембрану RTD-1 по сравнению с PG-1, что согласуется с нашими данными по проницаемости мембраны *E.coli*. Эти различия большинство авторов связывают с отсутствием амфипатических свойств у молекулы RTD-1, присутствующих большинству АМП. Предполагают, что на начальном этапе происходит взаимодействие положительно заряженных аргининовых остатков RTD-1 с отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидов мембран с образованием пептид-липидных кластеров [1]. Это предположение подтверждается экспериментальными данными, подтверждающими существование двух состояний RTD-1 при его связывании с бислоями [14]. В одном, соответствующем начальному электростатическому взаимодействию, RTD-1 ориентирует плоскость своего кольца параллельно бислою. Второе состояние не было полностью определено, но отличалось от первого. Возможно, гидрофобные аминокислотные остатки RTD-1 взаимодействовали с углеводородными цепями жирных кислот в составе фосфолипидов, что могло приводить к последующему разрушению мембраны. Точные механизмы этого взаимодействия пока остаются невыясненными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abuja P.M., Zenz A., Trabi M. et al. The cyclic antimicrobial peptide RTD-1 induces stabilized lipid-peptide domains more efficiently than its open-chain analogue. *FEBS Letters*. 2004, 566: 301-306.
2. Buffy J.J., McCormick M.J., Wi S. et al. Solid-state NMR investigation of selective perturbation of lipid bilayers by cyclic antimicrobial peptide RTD-1. *Biochemistry*. 2004, 43: 9800-9812.
3. Garcia A.E., Цсары G., Tran P.A. et al. Isolation, synthesis, and antimicrobial activities of naturally occurring θ -defensin isoforms from baboon leukocytes. *Infect. Immun*. 2008, 76: 5883-5891.
4. Lehrer R., Barton A., Daher K. et al. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin. Invest*. 1989, 84: 553-561.
5. Lehrer R.I., Rosenman M., Harwig S.S.L. et al. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods*. 1991, 137:167-173.
6. Lehrer R.I., Lu W. α -Defensins in human innate immunity. *Immunol. Rev*. 2012, 245: 84-112.
7. Pace C.N., Vajdos F., Fee L. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*. 1995, 4: 2411-2423.
8. Stegemann C., Tsvetkova E.V., Aleshina G.M. et al. De novo sequencing of two new cyclic theta-defensins from baboon (*Papio hamadryas*) leukocytes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2010, 24:599-604.
9. Tang Y.Q., Yuan J., Osapay G. et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*. 1999, 286: 498-502.
10. Tran D., Tran P., Roberts K. et al. Microbicidal properties and cytotoxic selectivity of rhesus macaque theta defensins. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008, 52: 944-953.
11. Tsvetkova E.V., Aleshina G.M., Shamova O.V. et al. α -Defensins from blood leukocytes of the monkey *Papio hamadryas*. *Biochemistry (Moscow)*. 2006, 71: 879-883.
12. Tsvetkova E.V., Leonova L.E., Aleshina G.M. et al. Antimicrobial effects of α -defensins from leukocytes of the hamadryas baboon *Papio hamadryas*. *J. Evolutionary Biochemistry Physiology*. 2016, 52(2): 133-140.
13. Varkey J., Nagaraj R. Antibacterial activity of human neutrophil defensin HNP-1 analogs without cysteines. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005, 49: 4561-4566.
14. Weiss T.M., Yang L., Ding L. et al. Two states of cyclic antimicrobial peptide RTD-1 in lipid bilayers. *Biochemistry*. 2002, 41: 10070-10076.
15. Yamaguchi S., Hong T., Waring A. et al. Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a β -sheet antimicrobial peptide, protegrin. *Biochemistry*. 2002, 41: 9852-9862.

Поступила 06.03.18

Контактная информация: Цветкова Елена Викторовна, к.б.н.,
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9, р.т. (812)328-21-82

© Т.А.ЧЕКАНОВА, С.Н.ШПЫНОВ, И.В.ТАРАСЕВИЧ, 2018

Т.А.Чеканова, С.Н.Шпынов, И.В.Тарасевич

АВИДНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IGG К RICKETTSIA PROWAZEKII КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ КРИТЕРИЙ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО СЫПНОГО ТИФА И ЕГО РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ФОРМЫ — БОЛЕЗНИ БРИЛЛЯ-ЦИНССЕРА

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Исследование диагностической значимости индекса авидности (ИА) антител класса G к *R. prowazekii* наряду с определением специфических IgG и IgM. *Материалы и методы.* В ИФА определяли IgG/IgM к *R. prowazekii*, их титры и ИА IgG в 112 образцах сывороток крови (47 сывороток от вакцинированных против сыпного тифа лиц и 65 образцов от больных и/или переболевших эпидемическим сыпным тифом и/или болезнью