

## ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ГЕМОЛИМФЫ ЛИЧИНОК *GALLERIA MELLONELLA* НА АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ *E. COLI*

© 2013 Д.А. Костина, Н.А. Кленова<sup>1</sup>, Е.Г. Литвинова<sup>2</sup>

Изучено влияние малых концентраций пептидных соединений гемолимфы личинок восковой моли на кинетические характеристики щелочной фосфатазы *E.coli*. Обнаружено активирующее действие компонентов одной из полученных хроматографических фракций гемолимфы на скорость фосфатазной реакции через 2–4 минуты после добавления субстрата. Предполагается, что пептидные соединения в малых дозах могут оказывать регулирующее воздействие на активность ферментов *E.coli*.

**Ключевые слова:** антибактериальные пептиды; *Galleria mellonella*; личинки, щелочная фосфатаза.

### Введение

В настоящее время идет интенсивный поиск более эффективных антибактериальных средств. Рядом ученых, а также проведенными нами исследованиями в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* были обнаружены белковые компоненты, которые проявляли значительную бактериостатическую активность по отношению к *E.coli* [1–3]. Изучение механизмов антибиотического действия пептидных соединений на бактериальные клетки показало, что гибель бактериальной клетки связана с формированием определенного, выше критического, количества каналов, нарушающих целостность клеток [4]. При этом нельзя исключить возможность проникновения части пептидов внутрь бактериальных клеток. Как показали наши исследования, низкие концентрации данных соединений оказывают лишь бактериостатическое действие, ограничивая рост *E.coli* в зоне воздействия. Механизм бактериостатического действия пептидных соединений в настоящее время остается малоизученным. Возможно, это связано с воздействием пептидов на активность ферментов, определяющих течение основных метаболических процессов. Действительно, нами получены данные о модуляции под действием низких концентраций пептидных компонентов гемолимфы личинок восковой моли общей

<sup>1</sup>Костина Динара Александровна (din.kostina@yandex.ru), Кленова Наталья Анатольевна (kln.ssu@rambler.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

<sup>2</sup>Литвинова Елена Геннадьевна (litvinova@rambler.ru), Институт экспериментальной и теоретической биофизики РАН, 142290, Российская Федерация, г. Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3.

дегидрогеназной активности *E.coli*, а также активности каталазы и сукцинатдегидрогеназы [5]. Представляет интерес дальнейшее изучение влияния пептидных соединений на метаболические процессы *E.coli*.

Целью данного исследования стало изучение влияния пептидных компонентов гемолимфы личинок восковой моли на активность щелочной фосфатазы *E.coli*.

## Материалы и методы исследования

**1. Получение гемолимфы.** В работе использованы личинки восковой моли, выращенные из отложенных яиц на восковых сотах в термостате при температуре 30°C. Использовали 30 личинок, находившихся в стадии развития, предшествующей окукливанию, средний вес личинок составил  $100 \pm 20$  мг. У живых личинок, предварительно охлажденных на льду, пипеткой собирали гемолимфу в пробирку, содержащую кристаллы фенилтиомочевины и 20 мкл ингибитора протеаз (2 мг/мл). Затем в полученную гемолимфу добавляли в равном объеме антикоагулянт, содержащий 0,04М цитратный буфер pH 4,5; 0,186М хлорид натрия, 0,017М ЭДТА. Клетки и дебрис осаждали центрифугированием при 100 g в течение 10 минут. Супернатант повторно центрифугировали 30 минут при 2300 g. Делипидизацию проводили добавлением равного объема гексана. После центрифугирования в режиме 100 g 15 минут гексановую фракцию удаляли, добавляли равный объем ацетилацетата и после центрифугирования в том же режиме фракцию с этилацетатом удаляли. Для осаждения белков к полученному раствору добавляли 5 мл смеси "метанол — ледяная уксусная кислота — вода" (90:1:9, по объему) и центрифугировали при 20000 g в течение 20 минут. Супернатант подвергали обращено-фазовой твердофазной хроматографии с использованием картриджа Wakerbond spe C-18. Элюцию проводили 0,1 М Na-фосфатным буфером, pH 7,2. Были получены 4 фракции по 1,5 мл различающиеся временем элюции. Во фракциях определяли содержание пептидов методом Лоури. Спектры пептидных соединений снимали на регистрирующем спектрофлуориметре Solar CM-2330 (Белоруссия) в интервале длин волн от 200–300 нм. Перед снятием спектров пробы разводили дистиллированной водой в 2 раза.

Воздействие пептидных компонентов на метаболические процессы изучали добавлением 200 мкл исследуемой фракции с содержанием пептидов в пределах 5–10 мкг в 10 мл суточного инокулята *E.coli*. В контрольные пробы добавляли соответствующее количество 0,1 М фосфатного буфера pH 7,2. Инкубировали 24 часа при 37 °С, после чего определяли ферментативную активность.

**2. Подготовка ферментного препарата из клеток *E.coli* [6].** 10 мл инокулята *E. coli* отмывали в 0,1М фосфатном буфере pH 7,2, (10 мин, 650g). Суспендировали осадок в 80 частях 0,5М сахарозы, затем осаждали клетки, нагруженные сахарозой при 650g 10 мин. После чего быстро осаждали клетки в холодном  $5 \cdot 10^{-4}$ М растворе  $MgCl_2$  и исследовали активность щелочной фосфатазы в надосадочной жидкости.

**3. Определение активности щелочной фосфатазы.** Использовали стандартный набор для определения активности щелочной фосфатазы оптимизированным кинетическим методом (щелочная фосфатаза-03-ВИТАЛ). Фотометрировали в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см при  $\lambda = 405$  нм. Повторно измеряли экстинкцию через 2 и 4 минуты инкубации.

## Результаты исследования и их обсуждение

Содержание пептидных компонентов в 4-х полученных с помощью обращенно-фазовой хроматографии фракциях колебалось от 25 до 48 мкг/мл (см. таблицу).

Таблица  
Содержание пептидных компонентов во фракциях обращенно-фазовой хроматографии образцов гемолимфы личинок восковой моли, мкг/мл

Пептидные компоненты, мкг/мл			
Фракция 1	Фракция 2	Фракция 3	Фракция 4
25,16 ± 0,15	40,36 ± 0,32	36,26 ± 0,29	48,10 ± 0,26

Фракции № 1 и № 2 отличаются высоким уровнем поглощения в области 280–290 нм, что характерно для белков и олигопептидов, имеющих в своем составе ароматические группировки (рис. 1). Во фракции № 3 содержание олигопептидов и белков, поглощающих в области 280–290 нм, снижается. Во фракции № 4, напротив, снова происходит их увеличение (рис. 2). Детальный анализ области поглощения белков от 280–290 нм показал, что во фракции № 1 имеется 3 пика различной величины. Самое большое поглощение (0,87 ед.) наблюдается в виде пика на 288 нм (0,63 ед.) и еще маленький пик при длине волны 284 нм (0,35 ед.). Во фракции № 2 наблюдается три пика на тех же длинах волн и примерно той же величины (рис. 1). Фракция № 3 также характеризуется наличием 3-х пиков, но меньших по интенсивности. Во фракции № 4 на длине волны 288 нм наблюдается пик, составляющий 0,95 ед., два других пика совпадают с пиками фракции № 2 и № 3.

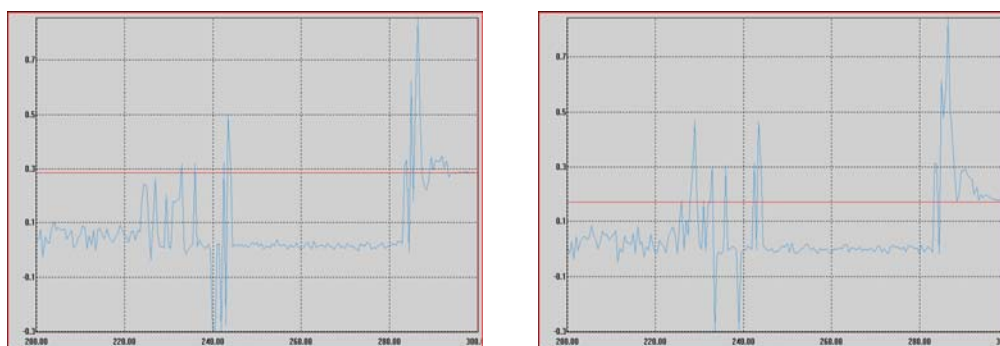


Рис. 1. Спектры <sup>а</sup> поглощения фракций гемолимфы личинок восковой моли:  
<sup>б</sup>  
*а* — фракция № 1, *б* — фракция № 2

Поглощение, характерное только для пептидных групп без учета ароматических группировок, может характеризовать присутствие пептидов, в состав которых не входят остатки ароматических аминокислот (200–230 нм). Фракция № 1 характеризуется наличием 3-х пиков небольшой величины в диапазоне 220–228 нм. Во фракции № 2 появляется более существенный пик, поглощающий на 228 нм, который может быть характерен для определенных олигопептидов, его величина составляет около 0,48 ед. ОП. Во фракции № 3 этот пик исчезает, что указывает на отсутствие данных олигопептидов в этой фракции. В спектре фракции № 4

наблюдается пик низкой интенсивности при 228 нм, но появляется значительный пик примерно в той же области (226 нм).

Добавление в инкубационную среду фракций № 1–4 гемолимфы личинок *Galleria mellonella* оказывало влияние на кинетические параметры активности щелочной фосфатазы *E.coli* (рис. 3).

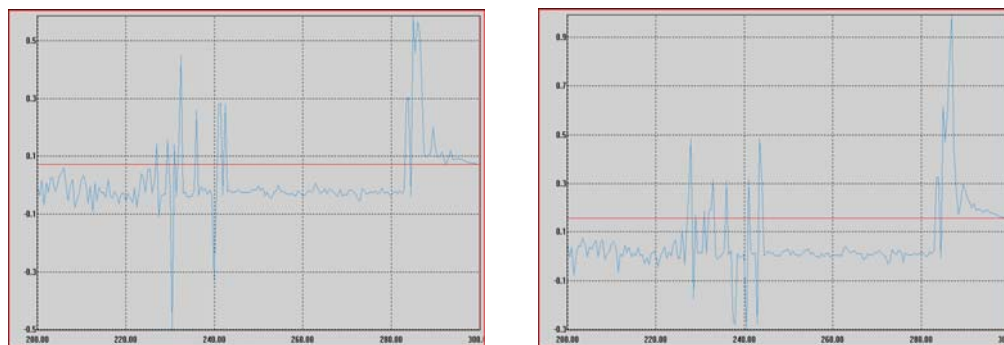


Рис. 2. Спектры поглощения фракций гемолимфы личинок восковой моли:  
а — фракция № 3, б — фракция № 4

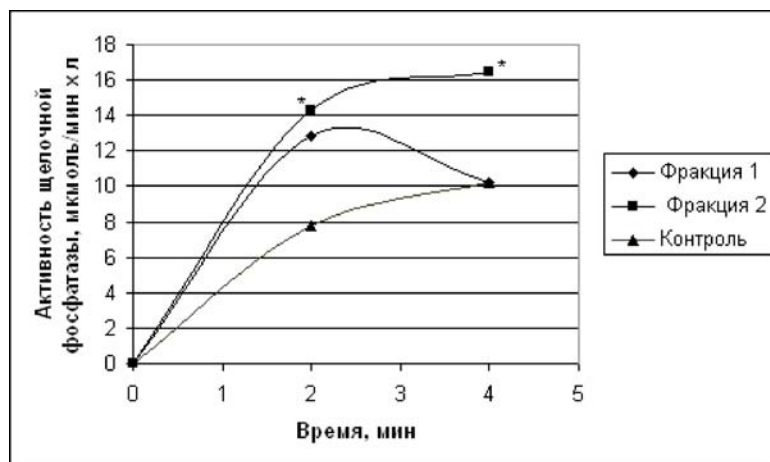


Рис. 3. Кинетическая характеристика активности щелочной фосфатазы *E.coli* при воздействии фракций № 1 и № 2 гемолимфы личинок *Galleria mellonella*

Олигопептиды, оказывающие активирующее действие на щелочную фосфатазу *E.coli*, обнаруживаются в составе фракции № 2. Данная фракция отличается достаточно высоким содержанием белковых компонентов (см. таблицу). Возможно, что они поглощают в области 225–230 нм, так как в спектре данной фракции обнаруживаются три хорошо различимых пика в этой области.

При воздействии пептидными компонентами фракции № 4 наблюдается лишь тенденция к увеличению скорости реакции, катализируемой щелочной фосфатазой только к 4-й минуте кинетической кривой.

Щелочная фосфатаза *E.coli*, локализованная в периплазматическом пространстве, проявляет высокую устойчивость к инактивации и деградации, может служить маркером состояния процессов метаболизма и, в частности, фосфатного об-

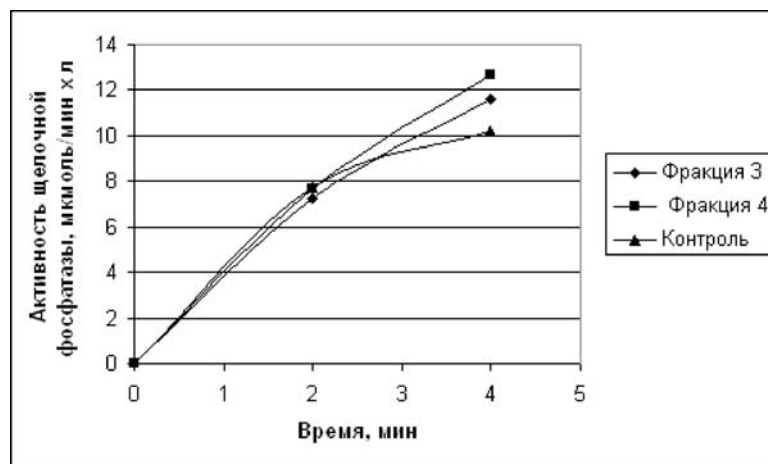


Рис. 4. Активность щелочной фосфатазы *E.coli* при воздействии фракций № 3 и № 4 гемолимфы личинок *Galleria mellonella*

мена бактериальных клеток [7]. Активация данного фермента, которая обнаруживается даже в условиях неоптимального для фермента значения рН (7,2), может свидетельствовать о напряжении метаболизма *E.coli* (рис. 4).

Таким образом, действительно, малые концентрации пептидных компонентов гемолимфы личинок восковой моли могут оказывать бактериостатическое действие, модулируя активность ключевых ферментов бактерий.

## Литература

- [1] Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph / M. Cytrynska [et al.] // Peptides Rev. 2007. V. 285. P. 533–546.
- [2] The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella* / S. Brown [et al.] // Insect Biochemistry and Molecular Biology Rev. 2008. V. 38. P. 201–212.
- [3] Study of Peptide Fractions from Hemolymph of *Galleria mellonella* / O.S. Sribnaya [et al.] // Biochemistry. 2010. V. 75(9). P. 1165–1172.
- [4] Bulet P., Stocklin R., Menin L. Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates // Immunol. Rev. 2004. V. 198. P. 169–184.
- [5] Костина Д.А., Кленова Н.А., Литвинова Е.Г. Влияние пептидных фракций гемолимфы *Galleria mellonella larvae* на ферментативную активность *Escherichia coli*: материалы 12-й международной конфер. Самара, 2012. Ч. 4. С. 39–42.
- [6] Метаболизм микроорганизмов / под ред. М.С. Егорова. М.: Изд-во МГУ, 1986. 256 с.
- [7] Coleman J.E. Structure and Mechanism of Alkaline Phosphatase // Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1992. P. 441–483.

Поступила в редакцию 5/IV/2013;  
в окончательном варианте — 5/IV/2013.

THE EFFECT OF BIOLOGICALLY ACTIVE  
COMPONENTS OF HEMOLIMPH OF LARVAE *GALLERIA*  
*MELLONELLA* ON THE ACTIVITY OF ALKALINE  
PHOSPHATASE OF *E. COLI*

© 2013 D.A. Kostina, N.A. Klenova<sup>3</sup> E.G. Litvinova<sup>4</sup>

The effect of low concentrations of peptide compounds of hemolymph of wax moth larvae on the kinetic characteristics of alkaline phosphatase of *E.coli* is studied. Activating effect of one of the components of chromatographic fractions of hemolymph on the rate of phosphatase reaction after 2–4 minutes after the addition of substrate is disclosed. It is assumed that peptide compounds in small doses can have a regulatory effect on the activity of enzymes of *E.coli*.

**Key words:** antimicrobial peptides; *Galleria mellonella*; larvae, alkaline phosphatase.

Paper received 5/IV/2013.

Paper accepted 5/IV/2013.

---

<sup>3</sup>Kostina Dinara Alexandrovna ([din.kostina@yandex.ru](mailto:din.kostina@yandex.ru)), Klenova Natalya Anatolyevna ([kl.n.ssu@rambler.ru](mailto:kl.n.ssu@rambler.ru)), the Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.

<sup>4</sup>Litvinova Elena Gennadievna ([litvinova@rambler.ru](mailto:litvinova@rambler.ru)), the Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russian Federation.