

УДК 519.999

ОБНАРУЖЕНИЕ И ВЫДЕЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ЭКСТРАКТОВ ЛИЧИНОК *GALLERIA MELLONELLA*

© 2006 П.П. Пурыгин¹, Н.А. Кленова², Е.Г. Литвинова³, О.С. Срибная¹,
А.А. Никашина¹

В данной работе рассматриваются методы выделения, очистки и идентификации антибактериальных компонентов из экстрактов *Calleria Mellonella*.

Анализ белков, содержащихся в экстракте, проводили методом электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле. Показано, что белковые фракции, обладающие антибактериальной активностью, содержат индивидуальный белок.

Введение

В настоящее время насекомые привлекают к себе пристальное внимание исследователей как источники биологически активных веществ. В последние годы из насекомых выделено большое число антимикробных пептидов, которые по силе действия сопоставимы с антибиотиками и могут быть использованы для лечения бактериальных и грибковых инфекций [1–3].

Уникальным представителем мира насекомых является большая восковая моль *Galleria mellonella* L из семейства огневок (Pyralidae, Lepidoptera). Она уже несколько веков используется в народной медицине как средство для лечения туберкулеза и мужского бесплодия. Она получила свое название за чрезвычайно редкую для животных способность переваривать и усваивать пчелиный воск, благодаря наличию фермента церазы. Наличие этого фермента позволяет личинкам переваривать и воскоподобные оболочки туберкулезных бактерий. Другие бактерии уничтожаются благодаря

¹Пурыгин Петр Петрович, Срибная Олеся Сергеевна, Никашина Анна Анатольевна, кафедра органической химии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

²Кленова Наталья Анатольевна, кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

³Литвинова Елена Геннадьевна, лаборатория метаболической биохимии Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Россия, г. Пущино, ул. Институтская, 3.

наличие антибактериальных лизоцим-подобных белков и цекропин-подобных пептидов [4–6]. В гемолимфе иммунизированных личинок обнаружены неспецифические бактериолизины, представляющие собой основные белки, обладающие лизоцим-подобной активностью [4, 5, 7–9]. Аналогичные белки найдены в гемолимфе личинок других видов чешуекрылых [1–3, 10–12].

В последнее время во многих работах сообщается о выделении из личинок различных насекомых цекропин-подобных пептидов с антибактериальной активностью [13–16]. Получены рекомбинантные антибактериальные белки [17]. Имеются данные об использовании генных конструкций цекропина, включенных в липосомы для предотвращения рестеноза [1]. Известно, что мембранно-активные катионные пептиды проявляют и увеличивают цитотоксичность доксорубина в отношении к опухолевым клеткам [18].

Антибактериальные пептиды могут обладать побочным гемолитическим действием, что ограничивает их использование в качестве лечебных препаратов [13]. При разработке лекарственных препаратов на основе антибактериальных пептидов проводят их химическую модификацию с целью снижения токсического действия и предотвращения протеолитического расщепления в организме [13].

Целью данной работы являются выделение и идентификация антибактериальных пептидов из экстрактов личинок восковой моли.

1. Материалы и методы исследования

Для гель-хроматографии использовали колонку (1.2×83 см), заполненную сефадексом LH-20. Элюцию проводили 34% этанолом.

Концентрацию белка в полученных фракциях определяли по методу Лоури, используя калибровку по бычьему сывороточному альбумину ("Sigma"). Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре ЛОМО СФ-46.

Электрофорез проводили в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ) в щелочной буферной системе ($\text{pH} = 9.2$). Для электрофореза использовали универсальный источник питания УИП-1, реактивы и камеру фирмы "Reanal". Электрофореграммы окрашивали амидочерным В.

1.1. Личинки большой восковой моли

В работе использовались личинки большой восковой моли (*Galleria mellonella*), полученные из двух разных источников. Одни личинки выросли в Самарской области в природных условиях на естественном корме, другие выращивались в ИТЭБ РАН (г. Пущино) в лабораторных условиях на искусственной питательной среде (Патент РФ, №2038086). Для эксперимента были отобраны целые, подвижные особи, находившиеся в стадии развития, предшествующей окукливанию.

1.2. Получение ацетонового порошка из личинок восковой моли

Ацетоновый порошок готовили из личинок, выращенных в лабораторных условиях в ИТЭБ РАН, г. Пущино. Целые живые личинки большой восковой моли заливали несколькими объемами ацетона, предварительно охлажденного до -20°C , и растирали в фарфоровой ступке при 4°C 1–2 минуты. Полученный гомогенат быстро отфильтровывали на воронке Шотте. Осадок промывали охлажденным ацетоном, просушивали на воздухе при комнатной температуре и помещали в вакуумный эксикатор. Ацетоновый порошок хранили при 5°C .

1.3. Получение экстрактов личинок большой восковой моли

Спиртовые экстракты 1 и 2 получали из личинок, выращенных в естественной среде (Самарская обл.).

Для получения экстракта 1 проводили экстракцию биологически активных веществ (БАВ) из целых личинок без предварительной гомогенизации.

При получении экстракта 2 навеску личинок большой восковой моли предварительно растирали в фарфоровой ступке, из полученного гомогената экстрагировали БАВ. Экстракцию БАВ из личинок проводили 40% этанолом (450 мл 40% этанола на 100 г личинок) при комнатной температуре в темноте и в течение 20 дней по методу, применяемому в народной медицине и гомеопатии. Полученные экстракты хранили в темноте при 4°C .

Экстракт представлял собой биологически активную пищевую добавку "Натуральный экстракт доктора Мухина", производимую в ИТЭБ РАН г. Пущино. Данный препарат получают по запатентованной технологии спиртовой экстракцией личинок *Galleria mellonella*, выращиваемых в лабораторных условиях на искусственной питательной среде (Патент РФ №2038086). Экстракт хранили в темноте при 4°C . Полученные экстракты содержали этиловый спирт в концентрации 34%.

Экстракцию БАВ буферными растворами проводили из ацетонового порошка, полученного из личинок большой восковой моли, выращенных в ИТЭБ РАН. Навеску ацетонового порошка (2 г) заливали буфером (10 мл) и тщательно перемешивали в течение нескольких минут. После перемешивания смесь помещали в холодильник ($+10$; $+14^{\circ}\text{C}$) на неделю. Экстракцию БАВ осуществляли путем настаивания гомогената в соответствующей буферной системе с периодическим перемешиванием. По окончании экстракции суспензию отфильтровывали на воронке Шотте. Полученные экстракты хранили в темноте при 4°C .

Для экстракции БАВ из ацетонового порошка использовали буферные системы с разными значениями pH:

- 1) трис-глициновый буфер ($\text{pH } 8,3 \pm 0,02$),
- 2) фосфатный буфер ($\text{pH } 7,017 \pm 0,02$),

3) цитратный буфер ($\text{pH } 6,0 \pm 0,02$).

1.4. Определение антибактериальной активности

В качестве тестового микроорганизма использовались бактерии *Escherichia coli*. Суточный инокулят *E.coli*, выращивали на среде следующего состава (г/л): пептон — 5 г; глюкоза — 10 г; NaCl — 4,68 г; KCl — 1,49 г; NH_4Cl — 1,07 г; CaCl_2 — 0,44 г; трис — 6 г; K_2HPO_4 — 1,55 г; MgSO_4 — 5 г; $\text{pH } 7,0 \pm 0,02$. Далее проводили посев на чашки Петри, которые затем инкубировали при 37°C в течение суток. Стерильные бумажные диски (диаметр 0,6 см) пропитывали тестируемыми препаратами и помещали на свежие посевы во влажном состоянии. Количество повторов для каждой пробы равно 8. Контролем служили диски, пропитанные экстрагирующим раствором. Стерилизацию дисков осуществляли с помощью УФ-бактерицидных ламп. Антибактериальную активность экстрактов и фракционированных пептидов оценивали по размерам зон ограниченного роста *E.coli* (отсутствие колоний или наличие единичных точечных колоний) вокруг дисков. Достоверность результатов вычисляли с помощью критерия Фишера–Стьюдента.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Антибактериальная активность спиртовых экстрактов личинок восковой моли

В табл. 1 приведены результаты исследования антибактериальной активности спиртовых экстрактов личинок.

Таблица 1

Ширина зон задержки роста *E.coli* на плотной среде со спиртовыми экстрактами личинок большой восковой моли

Проба	Зона задержки роста, мм	Достоверность различий (к контролю)
Контроль(34% этиловый спирт)	$6,62 \pm 0,11$	
Экстракт №1 (изготовленный из целых личинок без гомогенизации)	$6,86 \pm 0,07$	Достоверных различий нет
Экстракт №2 (изготовленный из гомогенизированных личинок)	$7,48 \pm 0,18$	$p > 0,99$
Экстракт №3 ("Натуральный экстракт доктора Мухина")	$7,50 \pm 0,24$	$p > 0,99$

Расширение зоны задержки роста *E.coli* обнаруживается в спиртовых

экстрактах №2 и №3, что, возможно, свидетельствует о наличии в данных экстрактах компонентов, обладающих бактериостатическим действием.

2.2. Антибактериальная активность буферных экстрактов личинок восковой моли

Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Ширина зон задержки роста E.coli на плотной среде
в присутствии водорастворимых экстрактов
личинок большой восковой моли**

Проба	pH	Зона задержки роста, мм
Экстракт из ацетонового порошка на основе трис-глицинового буфера	$8,3 \pm 0,02$	$6,00 \pm 0,00$
Контроль (трис-глициновый буфер)	$8,3 \pm 0,02$	$5,83 \pm 0,17$
Экстракт из ацетонового порошка на основе фосфатного буфера	$7,17 \pm 0,02$	$6,86 \pm 0,60$
Контроль (фосфатный буфер)	$7,17 \pm 0,02$	$6,17 \pm 0,24$
Экстракт из ацетонового порошка на основе нитратного буфера	$6,0 \pm 0,02$	$6,00 \pm 0,00$
Контроль (цитратный буфер)	$6,0 \pm 0,02$	$6,67 \pm 0,29$

Исследование влияния водорастворимых экстрактов большой восковой моли на рост E.coli показало, что компоненты, обладающие бактериостатическим действием, скорее всего не поступают в экстракты, так как достоверных изменений зон задержки роста E.coli не обнаруживается. Возможно также, что антибактериальные компоненты разрушаются в процессе приготовления ацетонового порошка.

2.3. Выделение и очистка антибактериальных компонентов из препарата "Натуральный экстракт доктора Мухина"

На основании результатов, полученных в ходе экспериментов по экстракции БАВ из личинок большой восковой моли, представленных в табл. 1 и 2, было принято решение использовать для выделения антибактериальных компонентов препарат "Натуральный экстракт доктора Мухина", поскольку этот препарат проявил самую высокую антибактериальную активность. Нами была разработана методика биохимического разделения биологически активных компонентов экстракта.

С целью выделения фактора, отвечающего за антибактериальную активность, было проведено биохимическое фракционирование экстракта личинок большой восковой моли. Экстракт личинок большой восковой моли под-

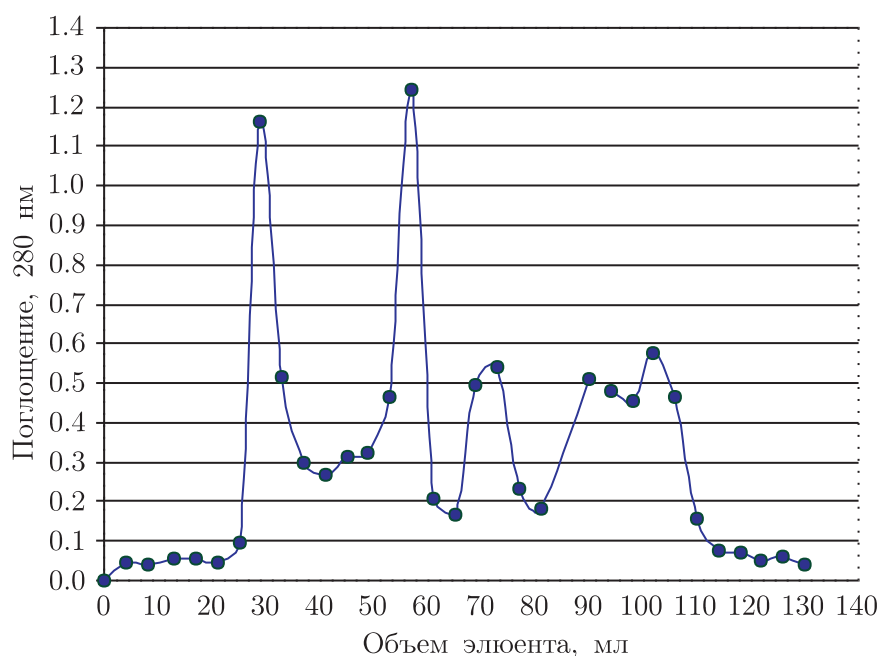


Рис. Гель-хроматография экстракта личинок большой восковой моли на колонке с сефадексом LH-20 (1,2 × 83 см). Элюцию проводили 34% этанолом. Заштрихованы фракции 7 и 14.

вергали гель-хроматографии на колонке с сефадексом LH-20 (1,2 × 83 см). Элюцию проводили 34% этанолом. На колонку наносили 2,5 мл экстракта личинок большой восковой моли. Было собрано 20 фракций по 4 мл. Тестирование всех фракций на спектрофотометре при длине волны 280 нм, показало, что фракции 7 и 14 обладают самой высокой оптической плотностью, 1,162 и 1,244, соответственно (рисунок).

2.4. Антибактериальная активность фракций

Антибактериальную активность определяли во фракциях 7 и 14. Результаты эксперимента представлены в табл. 3.

Расширение зоны задержки роста *E.coli* обнаруживается в спиртовых фракциях 7 и 14, что, возможно, свидетельствует о белковой природе бактериостатиков, предположительно входящих в состав данных фракций. Определение содержания белка во фракциях 7 и 14 проводили по методу Лоури. Для получения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин ("Sigma"). Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 3

**Ширина зон задержки роста *E.coli* на плотной среде
в присутствии спиртовых фракций 7 и 14**

Проба	Зона задержки роста, мм	Достоверность различий (к контролю)
Контроль (34% этиловый спирт)	$6,75 \pm 0,10$	
Фракция 7	$7,66 \pm 0,17$	$p > 0,99$
Фракция 14	$7,44 \pm 0,16$	$p > 0,99$

Таблица 4

Содержание белка во фракциях 7 и 14

Номер фракции	Содержание белка (мкг/мг)
7	204 ± 3
14	136 ± 2

3. Анализ белков, содержащихся во фракциях 7 и 14, электрофорезом в полиакриламидном геле

В результате проведения электрофореза в каждой из фракций 7 и 14 было обнаружено по одному белку. Белки различались по электрофоретической подвижности.

Данным исследованием продемонстрировано наличие антибактериальной активности в спиртовых экстрактах личинок восковой моли, наибольшая активность обнаружена в разработанном в ИТЭБ РАН препарате "Натуральный экстракт доктора Мухина". Известно, что препарат обладает противотуберкулезным, иммуностимулирующим и антиоксидантным действием а также эффективен при бронхитах, пневмониях, хронических бронхо-легочных заболеваниях [19–27]

Полученные нами данные свидетельствуют, что лечебный эффект препарата может также определяться наличием антибактериальной активности.

Нами выделены две белковые фракции с антибактериальной активностью, каждая из которых содержит индивидуальный белок. В дальнейшем мы предполагаем исследовать свойства полученных белков.

Белки с антибактериальной активностью из личинок *Galleria mellonella*, по-видимому, можно будет использовать для разработки на их основе новых лекарственных препаратов.

Работа выполнена при поддержке ОАО "ДИОД", Программы фундаментальных исследований Президиума Российской академии наук "Фундаментальные науки — медицине" и Программы российской академии Наук "Поддержка инноваций".

Литература

- [1] Prevention of restenosis using the gene for cecropin complexed with DOC-SPER liposomes under optimized conditions / S.Nikol [et al.] // Int. J. Angiol. – 2000. – V. 9. – No. 2. – P. 87–94.
- [2] Characterisation of antibacterial activity of peptides isolated from the fenomen of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae / S.Haeberli [et al.] // Toxicon. – 2000. – V. 38. – No. 3. – P. 373–380.
- [3] Sawa, T. Antimicrobial peptides/proteins—application to the therapy of sepsis / T.Sawa, K.Kurahashi // Masui. – 1999. – V. 48. – No. 11. – P. 1186–1193.
- [4] Powning, R.F. Studies on insect bacteriolytic enzymes—1. Lysozyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombex mory* / R.F.Powning, W.J.Davidson // Comp. Biochem. Phisiol. – 1972. – V. 45B. – P. 669–686
- [5] Jarosz, J. Active resistance of entomophagous rhabditid *Heterorhynchus* bacteriophora to insect immunity / J.Jarosz // Parasitology. – 1998. – V. 117. – No. 3. – P. 201–208.
- [6] Hoffmann, D. Insect immunity: *Galleria mellonella* and other lepidoptera have cecropin-like Factors active against Gram negative bacteria / D.Hoffmann, D.Hultmark, H.G.Boman // Insect Biochem. – 1981. – V. 11. – P. 537–548.
- [7] Jarosz, J. Simultaneous induction of protective immunity and selective Synthesis of hemolymph lysozyme protein in larvae of *Galleria mellonella* / J.Jarosz // Biol. Zbl. – 1979. – V. 98. – P. 459–471.
- [8] Phipps, D.J. Gallysin-1, an antibacterial protein isolated from hemolymph of *Galleria mellonella* / D.J.Phipps, J.S.Chadwick, W.P.Aston // Dev. Comp. Immunol. – 1994. – V. 18. – No. 1. – P. 13–23.
- [9] Virulence of *Candida albicans* mytants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae) / G.B.Dunphy [et al.] // Can. J. Microbiol. – 2003. – V. 49. – No. 8. – P. 514–524.
- [10] Ekengen, S. *Drosophila* cecropin as an antifungal agent / S.Ekengen, D.Hultmark // Insect Biochem Mol Biol. – 1999. – V. 29. – No. 11. –P. 965–972.
- [11] Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti* / C.Lowenberger [et al.] // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – P. 20092–20097.
- [12] *Drosophila* antibacterial protein, cecropin A, Differentially affects non-bacterial organisms such as *Leishmania* in a manner different from other amphipatic peptides / H.Akuffo. Int J Mol Med. – 1998. – V. 1. – No. 1. – P. 77–82.
- [13] Otvos, L. Antibacterial peptides isolated from insects / L.Otvos // J. Pept. Sci. – 2000. – V. 6. – No. 10. – P. 497–511.

- [14] Andra, J. Cecropins antibacterial peptides from insects and mammals, are potently fungicidal against *Candida albicans* / J. Andra, O. Berninghausen, M. Leippe // *Med. Microbial. Immunol (Berl.)* – 2001. – V. 189. – P. 169–173.
- [15] cDNA cloning and antibacterial activities of cecropin D-like peptides from *Agrius convolvuli* / K.R. Kim [et al.] // *Arch. Insect Biochem Physiol.* – 2000. – V. 45. – No. 4. – P. 149–155.
- [16] Effect of mono-dose intraperitoneal cecropins in experimental septic shock / A. Giacometti [et al.] // *Crit. Care Med.* – 2001. – V. 29. – P. 1666–1669.
- [17] Expression of the recombinant antibacterial peptide sarcotoxin IA in *Escherichia coli* cells / V.S. Skosyrev [et al.] // *Protein Expression and Purification.* – 2003. – V. 28. – P. 350–356.
- [18] In vitro characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides / S.A. Johnstone [et al.] // I. Peptide-mediated cytotoxicity and peptide enhanced cytotoxic activity of doxorubicin against wild-type and p-glycoprotein over-expressing tumor cell lines. *Anticancer Drug Des.* – 2000. – V. 15. – No. 2. – P. 151–160.
- [19] Spiridonov, N.A. On chemical composition of a biologically active preparation from *Galleria mellonella* / N.A. Spiridonov, E.V. Kashparova, B.P. Baskunov // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1992. – V. 102. – 1992. – P. 109.
- [20] Мухин, С.А. (1961) О некоторых вопросах гомеопатического лечения болезней сердца. В кн: Е. Величко. В поисках истины. – М.: Контур, 2005. – С. 225–264.
- [21] Antituberculosis and other curative effects of folk medicine from *Galleria mellonella*, "Doctor Mukhin Balsam" / A.A. Ovsepyan [et al.] // *Young doctors on the threshold of the third millennium, materials of the conference, Yerevan, Armenia, September 17–22, 2001.* – P. 103.
- [22] Возрождение противотуберкулезного сердечного и общеукрепляющего лечебного средства из личинок восковой моли / М.Н. Кондрашова [и др.] // *Труды конференции "От современной фундаментальной биологии к новым наукоемким технологиям"* 2001, Пущино. – С. 65–66.
- [23] Doctor Mukhin Balsam - new perspectives for pediatrics and mitochondrial disorders treatment Mitochondrion / E.G. Litvinova [et al.] // – 2002. – V. 1. – P. 523.
- [24] Патогенетическое обоснование применения спиртового экстракта большой восковой моли при бронхолегочных заболеваниях у детей / Н.В. Дмитриева [и др.] // *Апитерапия сегодня.* – Рыбное, 1993. – С. 59.
- [25] Коррекция эндокринной активности плаценты при угрожающем прерывании беременности биологически активными добавками к пище / Ю.К. Гусак [и др.] // *Проблемы эндокринологии в акушерстве и гинекологии.* – М., 1997. – С. 146.

- [26] Antioxidant and immunoprotective properties of the ancient remedy of folk medicine from *Galleria Mellonella* / E.G.Litvinova [et al.] // Intern. Symposium "Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Diagnostic, Preventive and Therapeutic Values" St. Petersburg-Kizhi-St. – Petersburg, 2002. – P. 126.
- [27] Исследования антиоксидантных свойств препарата народной медицины из личинок восковой моли *Galleria mellonella* / Т.В.Сирота [и др.] // Тезисы 6-й международной конференции "Биоантиоксидант". – М., 2002. – С. 528–530.

Поступила в редакцию 23/V/2006;
в окончательном варианте — 23/V/2006.

DETECTION AND ALLOCATION ANTIBACTERIAL PEPTIDES FROM EXTRACTS LARVAS GALLERIA MELLONELLA

© 2003 P.P. Purygin,⁴ N.A. Klyonova,⁵ E.G. Litvinova,⁶ O.S. Sribnaya,⁴
A.A. Nikacshina⁴

Methods of extraction, rectification and identification of antibacterial components from extracts of *Galleria Mellonella* are reviewed in this work. The analysis of the proteins contained in the extract was carried out in 7,5 per cent polyacrylamide gel using electrophoretic method. It is shown that protein fractions with antibacterial activity contain individual protein.

Paper received 23/V/2006.

Paper accepted 23/V/2006.

⁴Purygin Pyotr Petrovich, Sribnaya Olesya Sergeevna, Nikacshina Anna Anatoljevna, Dept. of Organic Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

⁵Klyonova Natalia Anatoljevna, Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

⁶Litvinova Elena Gennadjevna, Laboratory of Metabolic Biophysics Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russia.