

В. А. Юхнев, М. А. Шартукова, Н. В. Луговкина, В. Н. Кокряков, О. В. Шамова

ПОИСК НОВЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ СЕМЕЙСТВА КАТЕЛИЦИДИНОВ И ДЕФЕНСИНОВ В ЛЕЙКОЦИТАХ ЛОСЯ (*ALCES ALCES*)*

Антимикробные пептиды (АМП) животного происхождения являются катионными молекулами, играющими важную роль в системе врожденного иммунитета. Изучение новых АМП важно для развития фундаментальных знаний о молекулярных механизмах врожденного иммунитета в ходе эволюции, а также для получения новых структур, на основе которых могут быть разработаны антибиотические лекарственные препараты. Целью настоящей работы было изучение физико-химических свойств и биологической активности АМП из лейкоцитов лося (*Alces alces*). С использованием методов ультрафильтрации и высокоэффективной жидкостной хроматографии из лейкоцитов лося было выделено и охарактеризовано 5 высокоочищенных препаратов пептидов (АП-2–6) с молекулярной массой 1849, 3696, 2418, 2003 и 2858 Да. Также был получен препарат АП-1, содержащий пептид, сходный по массе с β -дефенсином быка (молекулярная масса 4658 Да). Наибольшей электрофоретической подвижностью в кислой среде по направлению к катоду обладал пептид АП-5. Пептиды АП-2, АП-3, АП-4, АП-6 представляли собой линейные молекулы, в то время как в составе молекул пептидов АП-1 и АП-5 присутствовали дисульфидные мостики. Полученные пептиды лося проявляли антимикробную активность в отношении грамотрицательной бактерии *E. coli* ML-35p и грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes* EGD, но не вызывали гемолиза эритроцитов человека в концентрациях, превышающих МИК в пять раз. Библиогр. 23 назв. Ил. 5. Табл. 1.

Ключевые слова: система врожденного иммунитета, антимикробные пептиды, кателицидины.

SEARCH OF NOVEL ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF THE CATHELICIDINS AND DEFENSINS FAMILIES IN MOOSE (*ALCES ALCES*) LEUCOCYTES

V. A. Yuhnev¹, M. A. Shartukova², N. V. Lugovkina^{1,3}, V. N. Kokryakov^{1,4}, O. V. Shamova^{1,4}

¹ Institute of Experimental medicine NWB RAMS, ul. akad. Pavlova, 12, St. Petersburg, 197376, Russian Federation; yuk-vladimir@yandex.ru, lugovkina50@mail.ru, kokryak@VK5270.spb.edu, oshamova@yandex.ru

² Ministry of Healthcare of the Russian Federation Research Institute of Influenza WHO National Centre of Russia, ul. prof. Popova, 15/17, St. Petersburg, 197376, Russian Federation; rodomar@yandex.ru

³ Federal State Institution of Science «Institute of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency», ul. Bekhtereva, 1, St. Petersburg, 192019, Russian Federation; lugovkina50@mail.ru

⁴ St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russian Federation; kokryak@VK5270.spb.edu, oshamova@yandex.ru

Antimicrobial peptides (AMPs) of animal origin are cationic molecules that play an important role in the innate immune defense. An investigation of new AMPs is important for the development of fundamental knowledge on the molecular mechanisms of innate immunity in the course of evolution, as well as for the

В. А. Юхнев (yuk-vladimir@yandex.ru): ФГБУ НИИ Экспериментальной медицины СЗО РАМН, Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12; М. А. Шартукова (rodomar@yandex.ru): ФГБУ «НИИ Гриппа» Министерства здравоохранения, Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова 15/17; Н. В. Луговкина (lugovkina50@mail.ru): ФГБУ НИИ Экспериментальной медицины СЗО РАМН, Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12; Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Российская Федерация, 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1; В. Н. Кокряков (kokryak@VK5270.spb.edu): ФГБУ НИИ Экспериментальной медицины СЗО РАМН, Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12; Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9; О. В. Шамова (oshamova@yandex.ru): ФГБУ НИИ Экспериментальной медицины СЗО РАМН, Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12; Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.

*Работа поддержана грантами РФФИ № 13-04-02102а и 12-04-01573а.

production of novel structures, which may serve as templates for the design of new antibiotic drugs. The purpose of the present work is to investigate physicochemical properties and biological activity of antimicrobial peptides from the moose (*Alces alces*) leukocytes. By using a preparative procedure containing an ultrafiltration and reverse-phase HPLC we have isolated and characterized five highly purified preparations of peptides (AP 2–6) with the molecular masses of 1849, 3696, 2418, 2003 and 2858 Da. The preparation AP-1 included a peptide with a molecular mass of 4658 Da, similar to that of bovine β -defensin. The peptide AP-5 possessed the highest electrophoretic mobility in the acidic environment toward a cathode. The peptides AP-2, AP-3, AP-4, AP-6 appeared to be linear molecules, while the peptides AP-1 and AP-5 contained S-S bridges. The obtained peptides showed antimicrobial activity against gram-negative bacteria *Escherichia coli* ML-35p and gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes* EGD, but did not lyse human red blood cells in concentrations five times exceeded MIC values. Refs 23. Figs 5. Tables 1.

Keywords: innate immune system, antimicrobial peptides, cathelicidins.

Введение

Катионные антимикробные пептиды (АМП), содержащиеся в нейтрофилах человека и животных, являются важными факторами системы врожденного иммунитета, обеспечивающими противoinфекционную защиту. Изучение антимикробных пептидов разных видов животных важно для развития фундаментальных знаний о молекулярных механизмах иммунных реакций, а также для получения информации о новых структурах пептидов, которые в дальнейшем могут быть использованы в качестве моделей для создания антибиотических препаратов нового поколения. Эти новые лекарственные средства перспективны для решения проблем, связанных с устойчивостью патогенных микроорганизмов к применяемым в клинике антибиотикам.

К настоящему времени открыто большое число антимикробных пептидов (АМП), выделенных из клеток крови, барьерных эпителиев и других клеток и тканей человека и животных. Одними из наиболее активных в отношении микроорганизмов АМП являются пептиды из семейства кателицидинов, выделенные из лейкоцитов животных отряда парнокопытных (свиньи, коровы, овцы, козы). К этим пептидам относятся протегрины свиньи [1], пролин-богатые пептиды — бактенецины коровы [2], козы [3–5] и овцы [6], PR-39 [7] и профенины [8]; α -спиральные пептиды ВМАР 27, 28 [9] коровы, МАР 34 козы, SМАР 29 овцы, додекапептид [10] и индолицидин коровы [11]. Перечисленные АМП сразу после их открытия стали предметом пристального внимания многих научных коллективов, так как пептиды каждой структурной группы обладают уникальными биологическими свойствами, как в отношении микробных, так и эукариотических клеток [12–15]. В настоящее время ведутся работы по созданию лекарственных препаратов на основе структур протегринов, бактенецинов, PR-39, додекапептида, индолицидина. Хотя некоторые АМП животных из отряда парнокопытных имеют структурную гомологию у разных представителей этой таксономической группы, есть и пептиды, обнаруженные только у животных одного вида, как, например, бактенецин ChVac3,4 козы или индолицидин коровы. Бета-дефенсины присутствуют в лейкоцитах коровы, но отсутствуют в лейкоцитах козы [16]. У большинства млекопитающих бета-дефенсины обнаружены главным образом не в лейкоцитах, а в эпителиальных клетках. По этой причине для установления биологического значения локализации данных пептидов в лейкоцитах важно выявить их в этих клетках крови у разных видов животных. Таким образом, изучение и сравнительная характеристика АМП других, ранее не исследованных в этом направлении, животных отряда парнокопытных представляются интересными как с точки зрения эволюционных исследований, так и возможности

обнаружения новых биологически-активных молекул, в частности, пептидов из семейства кателицидинов, которые могут иметь практическое применение в медицине.

Данная работа посвящена изучению физико-химических свойств и биологической активности антимикробных пептидов из лейкоцитов лося (*Alces alces*), которые ранее не исследовались. В задачи работы входили поиск, выделение и очистка новых антимикробных пептидов; характеристика их физико-химических свойств (электрофоретической подвижности по направлению к катоду в кислой среде, молекулярной массы, наличия дисульфидных связей); изучение антимикробной активности пептидов; оценка их влияния на проницаемость мембран *E. coli* ML-35p в сравнении с мембраноактивным пептидом протегрином-1 (PG-1); изучение гемолитической активности пептидов в отношении эритроцитов человека.

Материалы и методы исследования

Экстракция катионных белков и пептидов из лейкоцитарных клеток лося.

Лейкоцитарную массу, обогащенную нейтрофильными гранулоцитами лося, получали из крови животных, стабилизированной раствором ЭДТА. К крови добавляли 4 объема 0,83%-ного раствора NH_4Cl для гемолиза эритроцитов и выдерживали 15 мин. Лейкоциты осаждали центрифугированием при 350 g в течение 10 мин. Супернатант удаляли, а полученный лейкоцитарный осадок ресуспендировали в воде и добавляли 4 объема 0,02M Na-ацетатного буфера, pH 4,5 с 0,3%-ным цетилтриметиламмонийбромидом (ЦТАБ). Проводили гомогенизирование клеток в гомогенизаторе «стекло-тефлон» и дальнейшую экстракцию катионных белков и пептидов в течение 3 ч на холоде (4–5 °C) на магнитной мешалке. Далее экстракты центрифугировали при 15 000 g 1 ч, супернатант отбирали; проводили повторную экстракцию белков, содержащихся в осадках, как описано выше. Процедуру экстракции повторяли четыре раза, полученные супернатанты объединяли и подвергали ультрафильтрации через фильтр YM-10 (мембрана, состоящая из полых волокон, пропускающая молекулы с молекулярной массой не более 10 кДа, т.е. с номинально отсекаемой молекулярной массой (НОММ) 10 кДа) фирмы Millipore. Ультрафильтрат далее концентрировали с использованием фильтра Millipore YM-0,5 (НОММ 0,5 кДа).

Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография. Сконцентрированную низкомолекулярную белковую фракцию, содержащую пептиды с молекулярными массами от 0,5 до 10 кДа, подвергали высокоэффективной жидкостной хроматографии на установке фирмы Beckman с использованием в качестве хроматографических носителей Vydac C-18 на колонках 25 × 1 см и 25 × 0,46 см. Проводили несколько циклов хроматографии, элюируя пептиды в различных условиях: меняя величины градиентов концентрации ацетонитрила и противоионы (0,1%-ная трифторуксусная кислота или 0,13%-ная гептафтормасляная кислота). Полученные фракции анализировали с помощью электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, проводили оценку антимикробной активности.

Электрофорез в кислой среде в присутствии мочевины. Электрофорез в кислой среде в присутствии мочевины [17] проводили в пластинах полиакриламидного геля 75 мм и толщиной 1 мм при напряжении 20 В на 1 см длины пластины геля на приборе фирмы Hoeffer (США). Гель содержал 12,5% акриламида (Sigma, США), 0,325% N,N-метилен-бис-акриламида (Sigma, США), 37,56% мочевины (Sigma, США) и 7,8%

уксусной кислоты (Вектон, Россия). Время полимеризации геля составляло около 60 мин. В качестве электродного буфера использовали 5%-ный раствор уксусной кислоты (рН 2,2). Длительность как преэлектрофореза, так и электрофореза составляла 1 ч. В качестве раствора для проб использовали 3М мочевины в 5%-ном растворе уксусной кислоты. На дорожку наносили 1–5 мкг белка в 10 мкл указанного раствора для проб.

Диск-электрофорез белков в присутствии додецилсульфата натрия. Диск-электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия [18] проводили в пластинах полиакриламидного геля на приборе фирмы Hoeffer (США). Разделяющий гель содержал 16% акриламида (Sigma, США) и 0,53% N,N-метилден-бис-акриламида (Sigma, США), а также 0,1% додецилсульфата натрия (Sigma, США). Концентрирующий гель содержал 3% акриламида, 0,1% N,N-метилден-бис-акриламида и 0,1% Дс-На. Раствор для проб включал в себя 2% Дс-На, 5% β-меркаптоэтанола (Sigma, США), 0,001% бромфенолового синего. В качестве катодного буфера использовали 0,24М глицин — 0,025М трис (рН 8,3) буфер с 0,1% Дс-На, анодного — 0,2М трис-НСl буфер (рН 8,9). Напряженность электрического поля при электрофорезе составляла 10 В/см.

Определение молекулярной массы пептидов с помощью масс-спектрометрии MALDI TOF. Масс-спектрометрический анализ пептидов проводили на приборе UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF фирмы Bruker Daltonics, Германия — времяпролетном масс-спектрометре с ионизацией МАЛДИ (MALDI — Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation). В качестве матрицы использовали α-циано-4-оксикоричную кислоту; раствор концентрацией 15 мг/мл в смеси вода—ацетонитрил (70%), содержащий 0,1% трифторуксусной кислоты. Условия регистрации масс-спектров стандартные.

Выявление дисульфидных связей в молекулах пептидов. Наличие дисульфидных связей в катионных белках определяли, окисляя их надмуравьиной кислотой [19]. При окислительном расщеплении S-S групп в цистине образуется цистеиновая кислота, что приводит к снижению положительного заряда белковой молекулы. Надмуравьиную кислоту готовили путем добавления 50 мл 30%-ной перекиси водорода к 450 мл муравьиной кислоты. О наличии дисульфидных связей свидетельствовало изменение электрофоретической подвижности пептидов, обработанных надмуравьиной кислотой по сравнению с контрольными, необработанными пробами при проведении аналитического электрофореза в кислой буферной системе, как было описано выше.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка в полученных очищенных препаратах определяли спектрофотометрически по методу П. Вольфа [20]. Измеряли оптическую плотность водного раствора пептида на спектрофотометре Beckman при длине волны 215 и 225 нм и рассчитывали концентрацию пептида (С) по формуле: $(A_{215} - A_{225})144 = C$ (мкг/мл). Данный метод удобен для определения концентрации белка в очищенных белковых препаратах, которые не содержат примеси других компонентов, имеющих поглощение при указанных длинах волн, не содержащих в растворе солей или кислот, дающих высокий фон при измерении оптической плотности.

Оценка антимикробной активности пептидов методом радиальной диффузии в агарозных гелях. Антибиотическое действие пептидов определяли по методу, предложенному Р.И. Лерером и соавторами [21]. Использовали культуры следующих микроорганизмов: *Escherichia coli*, штамм ML-35p (грамотрицательная бактерия); *Listeria monocytogenes*, штамм EGD (грамположительная бактерия).

Микроорганизмы культивировали в течение 16–18 ч в среде, содержащей 3%-ный раствор триптического гидролизата сои (ТГС) (Sigma, США) при 37 °С. Затем аликвоту

суспензии бактерий отбирали и переносили в свежеприготовленную среду ТГС, после чего ее инкубировали при 37 °С в течение 2,5 ч для получения микроорганизмов, находящихся в логарифмической фазе роста. Полученную суспензию микробов центрифугировали при 600 g в течение 10 мин, осадок дважды промывали в 10мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,4) и ресуспендировали в 3 мл того же буфера. Количество клеток каждого из микроорганизмов оценивали, измеряя оптическую плотность суспензий на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 620 нм (величина оптической плотности 0,2 соответствовала $5 \cdot 10^7$ микробных клеток в 1 мл [21]). Для приготовления агарозных гелей, содержащих микроорганизмы, аликвоту суспензии, включающую $4 \cdot 10^6$ клеток перемешивали с 8 мл стерильного 1%-ного раствора агарозы (Sigma, США, А6013) в 10мМ натрий-фосфатном буфере при температуре 43 °С. Полученную смесь вносили в стерильную пластиковую чашку Петри диаметром 90 мм, где смесь застывала с образованием агарозного геля. Приготавливали серийные двукратные разведения пептидов в 0,01%-ном водном растворе уксусной кислоты. В агарозном геле проделывали отверстия диаметром 2 мм. В лунки вносили анализируемые образцы, содержащие пептид, и инкубировали в течение 3 ч при 37 °С. При инкубировании пептиды диффундировали из лунок в агарозу. Затем на поверхность агарозного геля наносили 1%-ный раствор агарозы, содержащий 6%-ный ТГС; после чего чашки инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. Для количественной оценки антибиотического действия пептидов измеряли диаметр зон, где не отмечался рост микроорганизмов, принимая за единицу активности 0,1 мм, и вычитая из измеренного значения 20 единиц, соответствующих диаметру лунки. Для каждого пептида определяли минимальную концентрацию (МИК), ингибирующую рост микробов. Для этого строили графики зависимости антимикробной активности пептидов от их концентрации. За МИК принимали значение, полученное для точки пересечения графика линейной регрессии каждого пептида с осью абсцисс (концентрация пептидов в мкМ).

Выявление белков и пептидов, обладающих антимикробной активностью, в полиакриламидных гелях после проведения электрофореза в кислой среде («метод наложения гелей»). Приготовление агарозных гелей, содержащих микроорганизмы, проводили с использованием процедуры, описанной выше. Полиакриламидные гели (ПААГ) после проведения электрофореза анализируемых препаратов в кислой буферной системе промывали дважды в 10мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,4) по 15 мин. Затем ПААГ помещали на поверхность агарозного геля, содержащего микроорганизмы, и инкубировали в течение 3 ч при температуре 37 °С. При инкубировании пептиды диффундировали из ПААГ в агарозу. По окончании инкубирования полиакриламидные гели снимали, а на поверхность агарозного геля наносили 1%-ный раствор агарозы, содержащий 6%-ный триптический гидролизат сои. Затем чашки инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. После инкубации на чашках наблюдались зоны, где происходило ингибирование роста микробов. Эти зоны сравнивали с соответствующими белковыми полосами в полиакриламидных гелях, окрашенных Кумасси и получали информацию об электрофоретической подвижности белков и пептидов, обладающих антимикробной активностью.

Анализ гемолитической активности пептидов. Для определения гемолитической активности пептидов использовали эритроциты человека. Кровь здоровых доноров собирали в пластиковые пробирки, в которые предварительно добавляли гепарин из расчета 10 мкл гепарина на 1 мл крови (5000 Ед / мл). Затем кровь центрифугировали

в течение 10 мин при 350 g и 4 °С. Супернатант удаляли, к осадку добавляли 10 мл охлажденного забуференного физиологического раствора (ЗФР) (рН 7,4) с 4мМ ЭДТА, перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин в тех же условиях. Надосадочную жидкость удаляли, доводили оставшийся объем до 10 мл добавлением ЗФР и центрифугировали. Процедуру отмывания эритроцитов повторяли три раза. Из полученного осадка эритроцитов (условно принималось, что в осадке содержание эритроцитов — 100%) отбирали 280 мкл, доводили объем суспензии до 10 мл охлажденным ЗФР. Таким образом, получали 2,8%-ную суспензию эритроцитов. Эту суспензию использовали для приготовления проб, в которых проводили анализ гемолитической активности пептидов. Пробы состояли из 27 мкл 2,8%-ной суспензии эритроцитов и 3 мкл анализируемого пептида. После добавления пептидов получали 2,5%-ную суспензию эритроцитов. Серийные двукратные разведения анализируемых пептидов производили в 0,01%-ном растворе уксусной кислоты (УК). Положительным контролем (100%-ный лизис эритроцитов) служили пробы, в которых к 27 мкл раствора эритроцитов добавляли 3 мкл детергента (10% Triton X-100 в 0,01%-ной УК). Для получения негативного контроля (0%-ный лизис эритроцитов) к 27 мкл раствора эритроцитов добавляли 3 мкл 0,01%-ной УК. Анализируемые растворы инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. После инкубации реакцию останавливали добавлением 75 мкл охлажденного ЗФБ, затем пробы центрифугировали при 8000 g в течение 4 мин. Супернатант отбирали и вносили в ячейки 96-луночного планшета (Costar, Corning Inc.).

Измерение оптической плотности проб при длине волны 540 нм производили на спектрофотометре SpectraMax 250 (Molecular Devices, США). Показатели гемолиза эритроцитов выражали в процентах, рассчитывая по формуле:

$$\text{Гемолиз (\%)} = \frac{OD_{540}(\text{образца}) - OD_{540}(\% \text{ лизис})}{OD_{540}(100\% \text{ лизис}) - OD_{540}(0\% \text{ лизис})} 100.$$

Изучение влияния пептидов на проницаемость наружной и цитоплазматической мембран *E. coli* ML-35р для хромогенных маркеров. Принцип метода и особенности штамма *E. coli* ML-35р описаны ранее [22, 23]. О состоянии цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35р судили по ее проницаемости для хромогенного маркера — о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида (ONPG), являющегося субстратом для фермента β-галактозидазы, а также для продукта этой ферментативной реакции. Используемый в данном методе штамм *E. coli* ML35р отличается отсутствием пермеазы лактозы (фермента, осуществляющего транспорт лактозы в клетку), причем синтез β-галактозидазы в цитоплазме этой бактерии не индуцибельный, как у большинства бактерий, а конститутивный. При наличии в среде, окружающей бактерию, субстрата для β-галактозидазы ферментативная реакция с участием этого субстрата может происходить только в том случае, если он способен проникать через мембраны бактерии, т.е. пока целостность мембран бактерий не нарушена, реакция не протекает. Если же под действием какого-либо повреждающего агента, например, антимикробного пептида, цитоплазматическая (и также наружная) мембрана бактерии становится проницаемой для ONPG, хромогенный продукт его гидролиза внутриклеточным ферментом выходит в инкубационную среду. Оптическая плотность среды при длине волны 420 нм (максимум поглощения хромогенного продукта) увеличивается, что позволяет наблюдать за процессом повреждения внутренней мембраны бактерии под действием антимикробного агента в режиме

реального времени. Состав проб (100 мкл): 2,5мМ ONPG (Sigma, США); $2,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл бактерии; 0,01М Na-фосфатный буфер (pH 7,4) с 100мМ NaCl; 0,03%-ный триптический гидролизат сои; пептиды в различных концентрациях. Пептиды разводили в 0,01%-ной уксусной кислоте. Контрольные пробы содержали вместо препаратов равные объемы 0,01%-ного раствора уксусной кислоты. Пробы вносили в лунки 96-луночного планшета и проводили измерение оптической плотности раствора при длине волны 420 нм с помощью спектрофотометра SpectraMax 250 фирмы Molecular Devices при температуре 37°C и периодическом встряхивании планшетов в течение двух часов. Данные обрабатывали в программе Sigma Plot9.

Результаты исследований

Экстракты белков и пептидов, полученные из лейкоцитов крови лося, анализировали с помощью электрофореза в кислой среде в присутствии мочевины (рис. 1, а, в). В гелях после проведения электрофореза белки и пептиды, обладающие антимикробной активностью в отношении грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* и грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes*, были выявлены с помощью метода «наложения гелей» (рис. 1, б, г). В качестве стандарта использовали экстракт из лейкоцитов кролика, в котором содержатся дефенсины, проявляющие выраженную антимикробную активность. На рис. 1, б, г соответствующие зоны ингибирования роста бактерий указаны стрелками. Как видно из рис. 1–2, в экстрактах из лейкоцитов лося содержатся

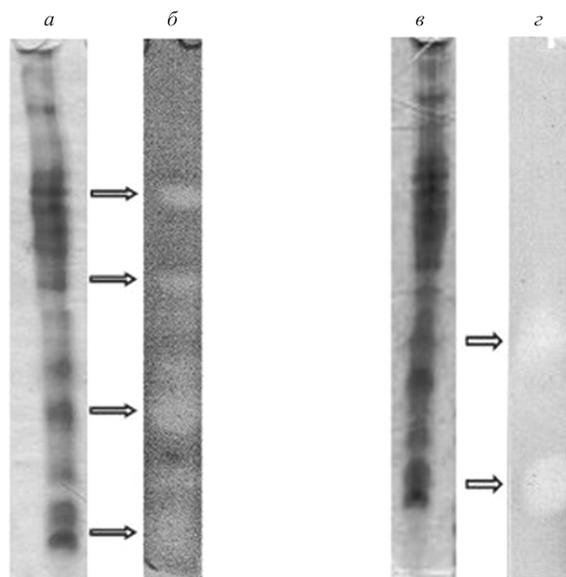


Рис. 1. Выявление пептидов, обладающих антимикробной активностью против *Escherichia coli* (б) и *Listeria monocytogenes* (г), методом наложения гелей:

а, в — блоки полиакриламидного геля (ПААГ) после электрофореза в кислой среде в присутствии мочевины общих белков экстракта лейкоцитов лося; б, г — блоки агарозного геля, содержащие бактерию *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes* соответственно.

белковые компоненты, проявляющие антимикробную активность (отмечены серыми стрелками).

По данным диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия в ПААГ в состав экстракта входили белки и пептиды с молекулярными массами от 3 до 17 кДа и выше.

Для выделения пептидов, имеющих молекулярную массу от 3 до 8 кДа и обладающих антимикробной активностью, была использована процедура, включающая ультрафильтрацию и обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

На рис. 2, а представлен профиль элюции пептидов с хроматографической колонки после нанесения на нее пробы, содержащей пептиды с массами от 0,5 до 10 кДа, полученной после проведения ультрафильтрации через мембрану УМ-10 и сконцентрированной при ультрафильтрации материала и использованием мембраны УМ-0,5 (ВЭЖХ 1). Для каждой из полученных после проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии проб осуществляли анализ антимикробной активности в отношении *E. coli* ML-35p и *Listeria monocytogenes* EGD методом радиальной диффузии в агарозных гелях и электрофоретический анализ с помощью диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия. В результате проведенного анализа проб было установлено, что пептиды, имеющие антимикробную активность, содержатся во фракциях, выходящих с колонки на 34–48-й минуте. Однако в большинстве фракций содержалось несколько пептидов, и лишь для фракции № 48 на электрофореграмме присутствовала одна белковая полоса (эту пробу обозначили АП-1 (антимикробный пептид 1)).

Чтобы обеспечить лучшее разделение данных пептидов использовали более «пологий» градиент концентрации ацетонитрила. На рис. 2, б представлен профиль элюции, полученный после хроматографии пробы того же состава, но в 4 раза большего объема с использованием указанных на рисунке условий разделения (ВЭЖХ 2). В полученных после ВЭЖХ фракциях осуществляли анализ антимикробной активности в отношении *E. coli* ML-35p и *Listeria monocytogenes* EGD и электрофоретический анализ (ЭФ) в присутствии додецилсульфата натрия. Было установлено, что в пробе № 53 содержится пептид, обладающий антимикробной активностью в отношении обоих исследуемых штаммов бактерий и представленный одной полосой на электрофореграмме. По данным масс-спектрометрического анализа в этой фракции содержится высокоочищенный пептид с молекулярной массой 1849 Да (средняя молекулярная масса), названный нами АП-2.

В целом изменение условий хроматографии позволило несколько улучшить разделение пептидных фракций — они представляли собой не такие гетерогенные смеси, как в случае предыдущего хроматографического разделения (ВЭЖХ 1). Однако в большинстве фракций, кроме преобладающего компонента, содержалось и некоторое количество примесей. Для получения индивидуальных фракций антимикробных пептидов эти пробы подвергли рехроматографии, используя в качестве противоиона не трифторуксусную кислоту, а гептафтормасляную (ГФМК). Фракции первого и второго хроматографического разделения, имеющие по данным масс-спектрометрии сходный состав, объединили. Профили элюции пептидов при рехроматографии различных проб, полученных на предыдущем этапе очистки, представлены на рис. 3, а, б, в, г.

В результате оценки антимикробной активности и электрофоретического анализа пептидных фракций установлено, что в пробах № 35 (пептид АП-3, ВЭЖХ 4), № 38 (АП-4, ВЭЖХ 5), № 33 (АП-5, ВЭЖХ 6) содержатся пептиды, обладающие антимикроб-

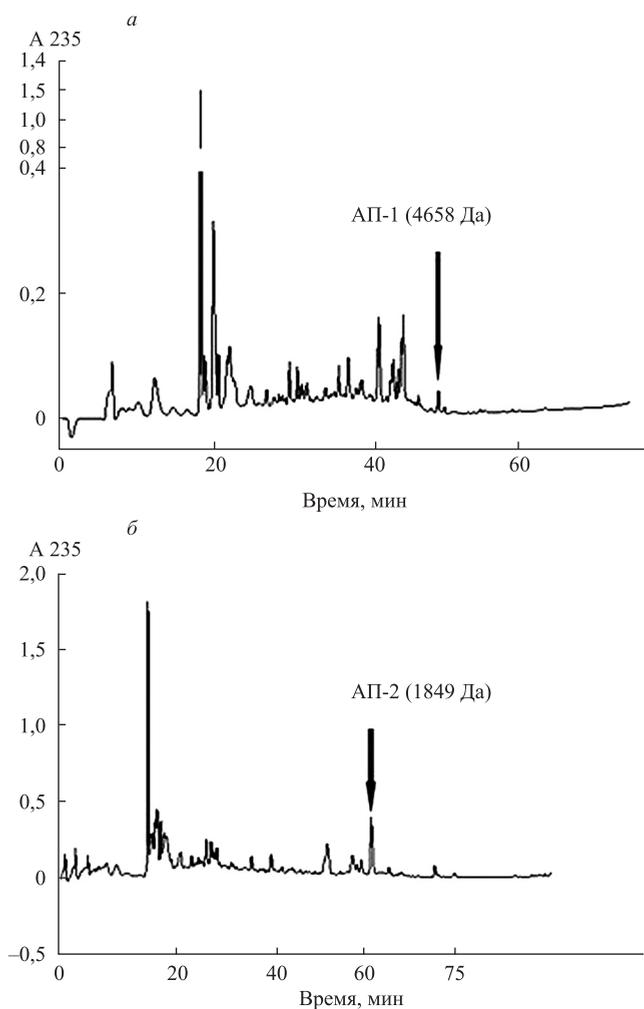


Рис. 2. Профиль элюции белков с колонки при проведении обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии низкомолекулярной белковой фракции экстракта из лейкоцитов (1 мл) на колонке Vydac C-18, 25 × 1 см в разных условиях:

а — с использованием линейного градиента концентраций вода—ацетонитрил с 0,1%-ной ТФУ от 0 до 60% за 60 мин; скорость потока 1,5 мл/мин, нанесен 1 мл пробы (ВЭЖХ 1); *б* — градиент концентраций вода—ацетонитрил с 0,1%-ной ТФУ: от 0 до 20% за 20 мин; от 20 до 40% за 60 мин; от 40 до 60% за 20 мин и от 60 до 100% за 15 мин; 1,5 мл/мин, нанесено 4 мл пробы (ВЭЖХ 2).

ной активностью в отношении обоих исследуемых бактерий, а в пробе № 28 (АП-6, ВЭЖХ 3) — пептид, действующий только против *E. coli* ML-35p. Каждый из этих пептидов был представлен одной полосой на электрофореграмме. Пробы анализировали с помощью масс-спектрометрического анализа, который показал, что в вышеперечисленных пробах содержатся высокоочищенные пептиды с молекулярными массами 3696 Да (АП-3), 2418 Да (АП-4), 2003 Да (АП-5), 2858 Да (АП-6) соответственно.

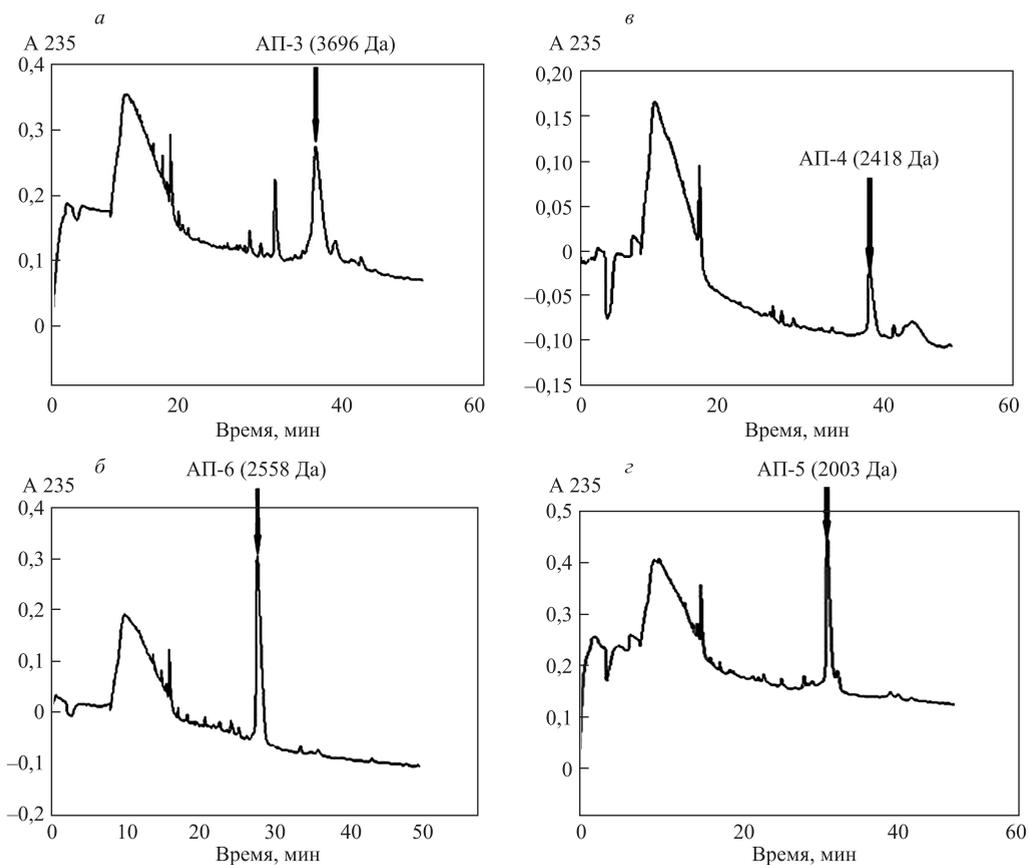


Рис. 3. Профиль элюции белков с колонки при проведении высокоэффективной жидкостной хроматографии фракций, полученных после ВЭЖХ 1 и ВЭЖХ 2:

а — ВЭЖХ 3 проб № 41, 42 (ВЭЖХ 1), объединенных с пробами № 58, 59 (ВЭЖХ 2); б — ВЭЖХ 4 пробы № 36 (ВЭЖХ 1), объединенной с пробой № 42 (ВЭЖХ 2); в — ВЭЖХ 5 проб № 44, 45 (ВЭЖХ 1), объединенных с пробами № 65, 66 (ВЭЖХ 2); з — ВЭЖХ 6 пробы № 62 (ВЭЖХ 2). Разделение проводили на колонке Yudas C-18, 25×0,46 см) с использованием градиента концентраций вода—ацетонитрил с 0,13 %-ной ГФМК: от 0 до 25% за 10 мин; от 25 до 35% за 10 мин; от 35 до 55% за 60 мин; от 55 до 70% за 10 мин и от 70 до 100% за 15 мин, 1 мл/мин.

Таким образом, в результате рехроматографии было получено 4 индивидуальных фракции антимикробных пептидов. Кроме того, как уже упоминалось выше, в результате проведения ВЭЖХ 1 была получена фракция, содержащая пептид с молекулярной массой 4658 Да (АП-1), а в результате проведения ВЭЖХ 2 был получен высокоочищенный препарат пептида с молекулярной массой 1849 Да (АП-2).

Были изучены некоторые физико-химические свойства полученных пептидов АП-1–6. Электрофоретическую подвижность по направлению к катоду в кислой среде изучали, сравнивая ее с подвижностью бактенецинов козы ChVac5, ChVac3,4 и miniChVac7,5Na, так как можно было предположить, что в лейкоцитах лося могут содержаться молекулы со сходными структурами. Показано, что наибольшей электрофоретической подвижностью в кислой среде по направлению к катоду обладает пептид АП-5 и его подвижность сходна с таковой miniChVac7,5Na. Сходной под-

вижностью обладают и наиболее катионные дефенсины кролика, и протегрины. Электрофоретическая подвижность пептида АП-6 близка к подвижности ChVac3,4.

Для выявления дисульфидных связей в молекулах исследуемых пептидов проведено окисление образцов надмуравьиной кислотой с последующим электрофоретическим анализом. При окислении белков надмуравьиной кислотой происходит разрыв дисульфидных связей и образование остатков цистеиновой кислоты, вследствие чего электрофоретическая подвижность в кислой среде по направлению к катоду меняется. Пептиды АП-2, АП-3, АП-4, АП-6 не изменили электрофоретической подвижности, это позволяет сделать заключение об отсутствии дисульфидных связей в их молекулах. Пептиды АП-1 и АП-5 изменили свою электрофоретическую подвижность, что свидетельствует о наличии дисульфидных мостиков.

Антимикробная активность полученных пептидов изучена в отношении грамотрицательной бактерии *E. coli* ML-35р и грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes* EGD с помощью метода радиальной диффузии. Чтобы получить более полную информацию об антимикробных свойствах исследуемых пептидных препаратов, их активность изучали в разных условиях: в среде, содержащей только 0,01М натрий-фосфатный буфер без добавления солей (таблица), и в той же среде, но с 150мМ хлорида натрия (физиологическая концентрация NaCl в крови). Показано, что АП-1, АП-2, АП-3, АП-4, АП-5 обладают антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. При этом активность пептида АП-1 против *E. coli* в присутствии NaCl несколько снижается, в то время как активность пептидов АП-2, АП-3, АП-4, АП-5, напротив, увеличивается. Пептид АП-6 эффективен лишь в отношении *E. coli*, при этом в среде с 150мМ NaCl он не проявляет антимикробной активности. Пептиды АП-1, АП-3, АП-4, АП-5 активны против *Listeria monocytogenes*, но только в отсутствие NaCl. Активность АП-2 против *Listeria monocytogenes* сохраняется и при повышении ионной силы среды, хотя и значительно падает.

Минимальные концентрации пептидов (мкг/мл), ингибирующие рост микроорганизмов (определялись по методу Лерера)

	МИК, мкг/мл			
	<i>E. coli</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
	без NaCl	с NaCl	без NaCl	с NaCl
АП-1	0,4±0,05	0,5±0,1	2,7±0,3	–
АП-2	2,2±0,3	1,5±0,2	4,7±0,5	10,6±1,4
АП-3	5,7±0,7	1,6±0,3	3,6±0,5	–
АП-4	1,9±0,2	0,07±0,01	2,9±0,2	–
АП-5	3,4±0,5	0,2±0,03	0,6±0,1	–
АП-6	8,2±0,4	–	–	–

Примечание. «–» — отсутствие активности.

Для получения информации о механизме антимикробного действия исследуемых пептидов, проведен ряд экспериментов по изучению их влияния на проницаемость цитоплазматической мембраны специального лабораторного штамма *E. coli* ML-35р. Для сравнения использовали протегрин-1 (мембраноактивный пептид PG-1), вызывающий заметное повреждение мембраны уже через несколько минут после добавления этого

пептида к бактерии). О повреждающем действии пептидов на цитоплазматическую мембрану бактерии судили по увеличению ее проницаемости для хромогенного маркера — ортонитрофенил-галактопиранозида (ONPG), который добавляли в инкубационную среду. Этот маркер является субстратом фермента β -галактозидазы, находящейся в цитоплазме бактерии, причем самопроизвольно через мембрану данного штамма бактерии, лишенной пермеазы лактозы, ONPG не проникает. Таким образом, ферментативная реакция с образованием окрашенного продукта возможна лишь при нарушении целостности наружной и внутренней мембран бактерии. За процессом увеличения кон-

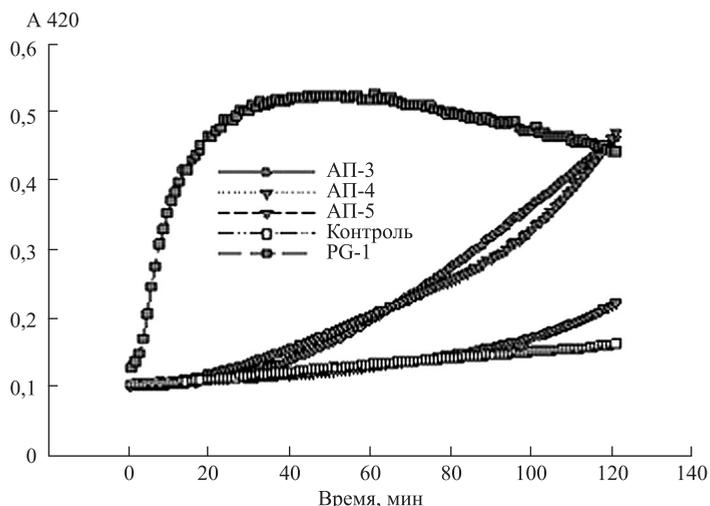
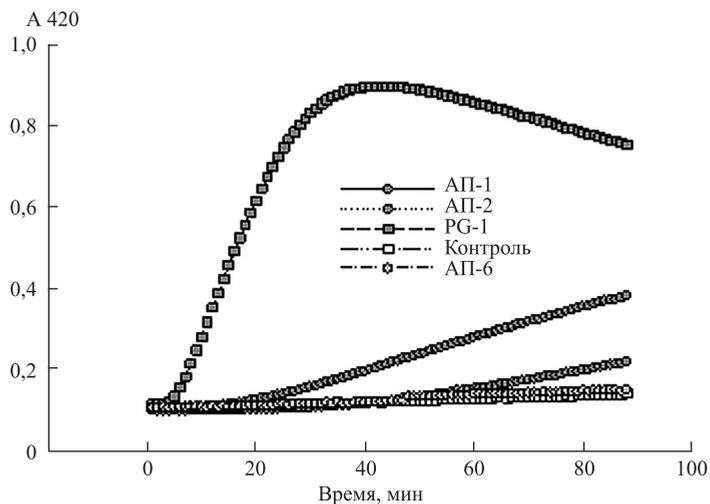


Рис. 4. Кинетика изменения проницаемости цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35r для хромогенного маркера при действии различных антимикробных пептидов, взятых в концентрациях, в два раза превышающих их МИК

По оси абсцисс — время инкубации пептидов с бактерией; по оси ординат — оптическая плотность раствора, содержащего продукт гидролиза маркера проницаемости ONPG. Контролем послужили пробы, включающие бактерию без обработки пептидами.

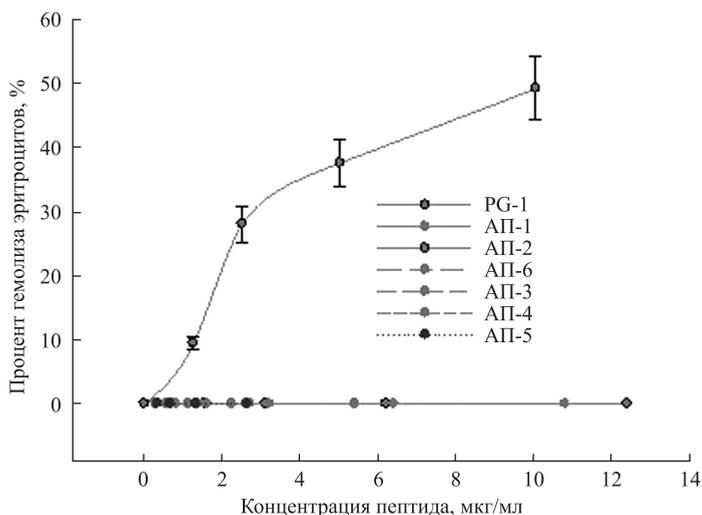


Рис. 5. График зависимости показателя гемолита эритроцитов (в %) от концентрации пептидов

По оси ординат — процент гемолита эритроцитов (за 100% принимали величину, полученную при действии на эритроциты Тритона X-100 (1%-ного раствора)).

центрации окрашенного продукта в реакционной смеси следили, измеряя поглощение света раствором при длине волны, соответствующей максимуму поглощения продукта ферментативной реакции. Мембраноактивный пептид (PG-1), взятый в качестве стандарта, вызывает быстрое и выраженное действие на цитоплазматические мембраны уже через 2–3 мин после начала эксперимента (рис. 4). Действие АП-2 проявляется через 20 мин, АП-3 и АП-4 примерно через 40 мин, а АП-1 только после часа инкубации (сходные эффекты описаны для бактенецина ChVac5). Пептиды АП-5 и АП-6 практически не оказывают действия на цитоплазматическую мембрану *E. coli*.

Для выяснения возможности повреждения мембран животных клеток после обработки их исследуемыми пептидами, изучена гемолитическая активность АП-1–6 в отношении эритроцитов человека. В качестве стандарта также использовали PG-1, обладающий высокой гемолитической активностью. Показано, что пептиды лося не вызывали гемолита эритроцитов человека в концентрациях, превышающих МИК в пять раз (рис. 5). Тенденция увеличения процента гемолита при повышении концентрации пептидов также не прослеживается, что позволяет предположить отсутствие выраженной гемолитической активности и для более высоких концентраций исследуемых пептидов.

Обсуждение результатов исследования

В литературе имеется информация о следующих антимикробных пептидах животных из отряда парнокопытных: протегринах [1], PR-39 [7], профенинах свиньи [6], бета-дефенсинах, индолицидине [15], додекапептиде [8], бактенецинах коровы [2], козы [3–5] и овцы [6], α-спиральных пептидах ВМАР-28 и ВМАР-29 коровы [9], МАР-34 козы, SМАР овцы. Как уже отмечалось, в отличие от лейкоцитов коровы в соответствующих клетках козы не содержится дефенсинов, в основном антимикробные

пептиды представлены пролин-богатыми бактенецинами [16]. В свою очередь, в лейкоцитах козы есть бактенецин 3,4 (ChVac3,4), которого нет у коровы [5]. Учитывая, что и лось, и корова, и коза принадлежат к разным семействам, можно предположить, что в лейкоцитах лося содержатся пептиды, отличающиеся от таковых, обнаруженных у коров и коз, хотя вполне возможно имеются и гомологичные молекулы. Не исключено присутствие в лейкоцитах лося и антимикробных пептидов, сходных с пептидами свиньи, являющейся представителем другого семейства и другого подотряда, но тоже относящейся к отряду парнокопытных.

Необходимо отметить, что большая часть пептидов, содержащихся в лейкоцитах коровы и козы, относятся к семейству кателицидинов и представлены как молекулы-предшественницы, которые нуждаются в протеолитическом расщеплении ферментом эластазой для высвобождения зрелого активного пептида. Для более эффективного выделения таких молекул из лейкоцитов лося нами была использована экстракция белков лейкоцитарной массы с использованием детергента цетилтриметиламмоний-бромид в 0,02М Na-ацетатном буфере, pH 4,5. Хотя pH этого буфера и отличается от оптимального для функционирования эндогенной эластазы, но как было показано итальянскими исследователями [2], фермент в этих условиях сохраняет некоторую активность и может успешно осуществлять процессинг предшественников кателицидинов, чего не происходит при использовании для экстракции 10–20%-ной уксусной кислоты, которую часто применяют для выделения и очистки дефенсинов и некоторых других АМП.

Для выделения и очистки индивидуальных фракций пептидов была использована процедура, включающая ультрафильтрацию и несколько последовательных циклов обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Из данной схемы очистки мы исключили этап, предполагающий использование препаративного электрофореза, традиционно применяемого при выделении АМП, но после проведения которого обычно имеются некоторые потери материала.

Методы ультрафильтрации позволили успешно отделить высокомолекулярную фракцию белков экстракта, провести обессоливание и получить материал, обогащенный пептидами, проявляющими антимикробную активность. Успешное разделение пептидов с помощью ВЭЖХ достигалось путем подбора наиболее целесообразных условий разделения, в том числе применения различных противоионов. Как известно, время удерживания пептидов на колонке может несколько меняться при смене противоиона. Так, замена трифторуксусной кислоты (ТФУ) на несколько более гидрофобную гептафтормасляную (ГФМК) обычно приводит к увеличению времени удерживания белков на колонке, причем для разных пептидов это время может изменяться в различной степени, что позволяет разделить вещества, которые имеют сходное время удерживания на колонке при использовании ТФУ. В результате применения ВЭЖХ были получены пять высокоочищенных препаратов пептидов: АП-2 (молекулярная масса 1849 Да); АП-3 (3696 Да); АП-4 (2418 Да); АП-5 (2003 Да); АП-6 (2858 Да).

Чтобы сделать предположения, к каким из известных структурных классов АМП принадлежат выделенные пептиды, исследовали их некоторые физико-химические свойства, в том числе электрофоретическую подвижность к катоду в кислой среде в сравнении с бактенецинами козы ChVac5, ChVac3,4 и miniChVac7,5Na, наличие ди-сульфидных мостиков в составе молекул. Исходя из полученных данных, можно предположить, что выделенные пептиды могут иметь структурное сходство со следу-

ющими описанными в литературе пептидами-кателицидинами животных из отряда парнокопытных: АП-2 — с индолицидином быка, линейным пептидом с молекулярной массой 1906 Да; АП-3 и АП-6 — с линейными пептидами ВМАР быка (3074 Да), МАР34 козы (3899,6 Да), бактенецином ChVac3,4 козы (3376 Да). Сделать предположение о принадлежности пептидов АП-4 и АП-5 к какой-либо группе АМП пока трудно. Интересно отметить, что из лейкоцитов лося нами был получен и препарат АП-1, содержащий пептид, сходный по массе с β -дефенсином быка (молекулярная масса 4658 Да) и, как и этот пептид, имеющий дисульфидные связи.

Антимикробную активность выделенных пептидов исследовали в разных условиях: в среде с низкой ионной силой и в среде с физиологической концентрацией NaCl. Из литературы известно, что антимикробная активность бактенецинов в отношении грамотрицательных бактерий не зависит от ионной силы среды, а в отношении грамположительных снижается в присутствии 100–150мМ хлорида натрия [2, 4, 5]. Активность дефенсинов, наоборот, обычно снижается при повышении ионной силы среды в отношении *E. coli*, а не *Listeria monocytogenes*, активность индолицидина менее зависит от ионной силы среды [11]. Таким образом, по характеру антимикробной активности АП-2 близок к индолицидину, АП-3, АП-4 и АП-5 — к бактенецинам. АП-6 проявляет относительно низкую антимикробную активность и возможно является фрагментом большого белка, например, гистона. Можно предположить, что АП-1 является дефенсином, так как имеет сходную массу и содержит дисульфидные мостики, хотя снижение активности против листерий достаточно нехарактерно для дефенсинов.

В экспериментах по изучению влияния полученных АМП на проницаемость цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35p для маркерных молекул показано, что пептид АП-2 оказывает действие на мембрану бактерии, сходное с таковым, описанным для индолицидина быка [11]. Пептиды АП-3 и АП-4 по данному виду активности близки к бактенецинам, т.е. оказывают отсроченное действие на внутреннюю мембрану грамотрицательной бактерии [5, 15].

Хотя на основании полученных данных можно предположить, что пептид АП-2 имеет структурное сходство с индолицидином быка, а АП-3 — с бактенецином ChVac3,4 козы, окончательный ответ на вопрос о принадлежности этих пептидов, так же как и АП-1, -4, -5, -6, к какому-либо классу АМП будет получен только после определения их первичной структуры.

Таким образом, нами впервые были выделены и очищены пептиды из лейкоцитов лося, обладающие антимикробной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также изучены их свойства. После определения первичной структуры полученных пептидов эти молекулы могут стать одними из кандидатов на роль антибиотиков нового поколения для применения в медицинской практике.

Литература

1. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides combine features of corticostatic defensins and tachyplesins / Kokryakov V.N., Harwig S.S., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.M., Shamova O.V., Korneva H.A., Lehrer R.I. // FEBS Lett. 1993. Vol. 327, N 2. P. 231–236.
2. Gennaro R., Skerlavaj B., Romeo D. Purification, composition, and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils // Infect. Immun. 1989. Vol. 57. P. 3142–3146.

3. Выделение и некоторые физико-химические свойства антимикробного белка из лейкоцитов козы / Шамова О. В., Кокряков В. Н., Дорош М. Ю., Курицина Н. А., Протасов Е. А., Узбеков В. А., Аleshina Г. М., Стефанов В. Е. // Вестн. С.-Петерб. ун-та. 1997. Вып. 3, № 17. С. 88–95.
4. Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes / Shamova O., Brogden R. A., Zhao C., Nguen T., Kokryakov V. N., Lehrer R. I. // *Infect. Immun.* 1999. Vol. 67, N 8. P. 4106–4111.
5. ChBac3,4: a novel proline-rich antimicrobial peptide from goat leukocytes / Shamova O., Orlov D., Stegemann C., Czihal P., Hoffmann R., Brogden K., Kolodkin N., Sakuta G., Tossi A., Sahl H.-G., Kokryakov V., Lehrer R. I. // *Inter. J. Peptide Research and Therapeutics.* 2009. Vol. 15, N 1. P. 31–35.
6. Localization and genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes / Huttner K. M., Lambeth M. R., Burkin H. R., Burkin D. J., Broad T. E. // *Gene.* 1998. Vol. 206. P. 85–91.
7. Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antimicrobial peptides / Agerbert B., Lee J. Y., Bergman T., Carlquist M., Boman H. G., Mutt V. O. L., Jörnvall H. // *Eur. J. Biochem.* 1991. Vol. 202. P. 849–854.
8. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes / Harwig S. S., Kokryakov V. N., Swiderek K. M., Aleshina G. M., Zhao C., Lehrer R. I. // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 362. P. 65–69.
9. Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities / Skerlavaj B., Gennaro R., Bagella L., Merluzzi L., Risso A., Zanetti M. // *J. Biol. Chem.* 1996. N 271. P. 28375–28381.
10. Romeo D., Skerlavaj B., Bolognesi M., Gennaro R. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils // *J. Biol. Chem.* 1988. N 263. P. 9573–9575.
11. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils / Selsted M. E., Novotny M. J., Morris W. L., Tang Y. Q., Smith W., Cullor J. S. // *J. Biol. Chem.* 1992. № 267. P. 4292–4295.
12. Interleukin 1 and defensins in thermoregulation, stress and immunity / Korneva E. A., Rybakina E. G., Kokryakov V. N., Orlov D. S., Shamova O. V., Shanin S. N. // *Annals of NY Acad. Sci.* 1997. Vol. 81. P. 465–474.
13. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре / Шамова О. В., Сакута Г. А., Орлов Д. С., Зенин В. В., Штейн Г. И., Колодкин Н. И., Афонина И. Н., Кокряков В. Н. // *Цитология.* 2007. Т. 49, № 12. С. 1000–1010.
14. Влияние антимикробного пептида бактенецина-5 и его укороченных фрагментов на пролиферацию фибробластов кожи человека, и на процесс заживления ран у экспериментальных животных / Ямщикова Е. В., Орлов Д. С., Пазина Т. Ю., Трулев А. С., Орлов С. Б., Григорьев А. В., Колодкин Н. И., Кокряков В. Н., Шамова О. В. // *Современные проблемы науки и образования.* 2012. № 3. С. 103–127.
15. Биологическая активность обогащенных пролином защитных пептидов системы врожденного иммунитета / Ямщикова Е. В., Орлов Д. С., Колодкин Н. И., Жаркова М. С., Пазина Т. Ю., Сакута Г. А., Трулев А. С., Кокряков В. Н., Шамова О. В. // *Цитокины и воспаление.* 2012. Т. 11, № 2. С. 100–106.
16. Differential expression of Caprine beta-defensin in digestive and respiratory tissues / Zhao C., Nguyen T., Liu L., Shamova O., Brogden K., Lehrer R. I. // *Infect. Immun.* 1999. N 67. P. 6221–6224.
17. Panyim S., Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones // *Arch. Biochem. Biophys.* 1969. N 130. P. 337–346.
18. Schagger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 166. P. 368–379.
19. Торчинский Ю. М. Сера в белках. М., 1977. 123 с.
20. Wolf P. A critical reappraisal of Waddell's technique for ultraviolet spectrophotometric protein estimation // *Anal. Biochem.* 1983. Vol. 129. P. 145–155.
21. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides / Lehrer R. I., Rosenman M., Harwig S. S., Jackson R., Eisenhauer P. // *J. Immunol. Methods.* 1991. Vol. 137. P. 167–173.
22. Concurrent assessment of inner and outer membrane permeabilization and bacteriolysis in *E. coli* by multiple-wavelength spectrophotometry / Lehrer R., Barton A., Ganz T. // *J. Immunol. Methods.* 1988. Vol. 108. P. 153–158.
23. Артамонов А. Ю., Шамова О. В., Кокряков В. Н., Орлов Д. С. Фото- и флюориметрические методы оценки проницаемости мембран *E. coli* ML-35p // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 3: Биология. 2008. Вып. 2. С. 139–142.

Статья поступила в редакцию 14 октября 2013 г.

Сведения об авторах

Юхнев Владимир Александрович — аспирант
Шартукова Мария Александровна — младший научный сотрудник
Луговкина Наталья Владимировна — научный сотрудник
Кокряков Владимир Николаевич — профессор
Шамова Ольга Валерьевна — доцент

Yuhnev Vladimir A. — Post-graduate student
Shartukova Maria A. — Junior Researcher
Lugovkina Natalya V. — Researcher
Kokryakov Vladimir N. — Professor
Shamova Olga V. — Associate Professor