

СОВМЕСТНОЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ *IN VITRO* ПРОЛИН-БОГАТОГО ПЕПТИДА СЛЮНЫ ЧЕЛОВЕКА P-F (43-61) И КАТИОННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

Жаркова М.С.¹, Макарова Т.О.², Орлов Д.С.¹, Копейкин П.М.¹, Орлов С.Б.³, Шамова О.В.¹

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, e-mail: oshamova@yandex.ru;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург;

³ ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, e-mail: sb-orlov@yandex.ru

Слюна является многокомпонентной биологической жидкостью, в состав которой входят разнообразные белковые молекулы. Одна из основных функций слюны – защита от проникающих в ротовую полость патогенных бактерий. Известно, что антимикробные пептиды (АМП) врожденного иммунитета играют важную роль в обеспечении противоиных свойств слюны. Однако концентрация этих пептидов в слюне невысока, в то время как одним из мажорных ее компонентов являются секретлируемые околоушными железами пролин-богатые белки и фрагменты их протеолитического расщепления – пептиды. Функция пролин-богатых белков и пептидов слюны остается малоизученной, а роль их в антимикробной защите не ясна. Можно предположить, что функции этих соединений в ротовой полости реализуются при взаимодействии с другими компонентами слюны, например АМП. Целью данной работы было изучение совместного антимикробного действия фрагмента одного из катионных пролин-богатых белков – P-F (43-61) – и АМП врожденного иммунитета – кателицидина LL-37 и гистатина 5 – *in vitro*. Нами был проведен химический синтез пептида P-F (43-61). С применением метода серийных разведений в жидкой питательной среде и титрования по схеме «шахматной доски» показано, что хотя пептид P-F (43-61) проявляет низкую антимикробную активность, но при его совместном применении с LL-37 наблюдаются синергетические эффекты антимикробного действия в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* (индексы фракционных ингибирующих концентраций (иФИК) – 0.31 для обеих бактерий), а с гистатином 5 – в отношении *Staphylococcus aureus* (иФИК = 0.31). Полученные данные позволяют предположить, что пролин-богатые пептиды слюны человека могут участвовать в обеспечении антимикробной защиты ротовой полости, повышая эффективность действия антимикробных пептидов врожденного иммунитета.

Ключевые слова: слюна, пролин-богатые пептиды, антимикробные пептиды, врожденный иммунитет

COMBINED ANTIBACTERIAL EFFECT *IN VITRO* OF HUMAN SALIVARY PROLINE-RICH PEPTIDE P-F (43-61) AND CATIONIC ANTIMICROBIAL PEPTIDES

Zharkova M.S.¹, Makarova T.O.², Orlov D.S.¹, Kopeykin P.M.¹, Orlov S.B.³, Shamova O.V.¹

¹ Institute of Experimental medicine, St-Petersburg, e-mail: oshamova@yandex.ru ;

² St-Petersburg State University, St-Petersburg;

³ Saratov State Medical University, Saratov, e-mail: oshamova@yandex.ru

Saliva is a multicomponent biological fluid, which includes a variety of protein molecules. One of the main functions of saliva is protection against pathogenic bacteria penetrating into oral cavity. It is known that antimicrobial peptides (AMPs) of innate immunity play an important role in implementation of the anti-infectious properties of saliva. However, the concentration of these peptides in saliva is quite low, while ones of its major components are proline-rich proteins and fragments of their proteolytic cleavage – peptides, secreted by parotid glands. The function of salivary proline-rich proteins and peptides remains poorly understood, and their role in antimicrobial protection is not clear. It can be assumed that functions of these compounds in the oral cavity are realized in interaction with other components of saliva, for example, AMPs. The aim of this work was an investigation of the combined antimicrobial action of a fragment of one of cationic proline-rich proteins – P-F (43-61) – and AMPs of the innate immunity – cathelicidin LL-37 and histatin 5 – *in vitro*. We carried out the chemical synthesis of P-F (43-61) peptide. Using the broth microdilution assay and Checkerboard titration approach we have shown that despite the peptide P-F (43-61) exhibits a low antimicrobial activity, it exerts synergistic antibacterial effects in combination with LL-37 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (the fractional inhibitory concentration index (FICI) is 0.31 for both bacteria), and in combination with histatin 5 against *Staphylococcus aureus* (FICI = 0.31). The obtained data suggest that proline-rich peptides of human saliva can contribute to the antimicrobial protection of oral cavity, increasing the effectiveness of antimicrobial

peptides of innate immunity.

Keywords: saliva, proline-rich peptides, antimicrobial peptides, innate immunity

Известно, что слюна обладает противомикробными, противовирусными и антимикотическими свойствами и представляет основной барьер для проникновения патогенных микроорганизмов в пищеварительный тракт [1, 2]. Противои инфекционные свойства слюны обеспечиваются за счет присутствия в ней набора защитных молекул, в том числе катионных антимикробных пептидов (АМП) врожденного иммунитета (альфа- и бета-дефенсины, кателицидин, гистатины и др.). В состав слюны также входит большое количество вырабатываемых околоушными железами пролин-богатых белков. Эти белки в смешанной слюне являются мажорными компонентами и представлены тремя группами: катионные, анионные и гликозилированные пролин-богатые белки [3]. К числу катионных молекул относятся белки IB-1, IB-4, IB-6, IB-9, P-B, P-H, P-D, P-F и другие, имеющие молекулярные массы от 10 до 40 кДа. При попадании в ротовую полость эти белки подвергаются протеолитическому расщеплению до фрагментов 8–25 аминокислотных остатков. Большинство протеаз, осуществляющих это превращение, имеют бактериальное происхождение. Интересно, что катионные пролин-богатые пептиды (ПБП) содержатся в фагоцитах некоторых видов животных и играют роль основных противомикробных факторов. У человека ПБП отсутствуют в фагоцитирующих клетках, но составляют мажорный компонент слюны. При этом функции ПБП слюны остаются малоизученными. Известно, что они способны связывать танины пищи и таким образом защищают слизистую полости рта от их негативного действия. Помимо этого, предполагается, что присутствие белков данной группы в высокой концентрации определяет вязкость и эластичность слюны [4]. Участие пролин-богатых белков в обеспечении противомикробной защиты остается невыясненным. Для одного из ПБП – пептида p1932 – установлено, что он проявляет антивирусную активность и может проникать в эукариотические клетки [5], для большинства других информация об антимикробной активности практически отсутствует. При этом хорошо известно, что участки белковых молекул, имеющие высокое содержание остатков пролина, легко вступают в белок-белковые взаимодействия. Можно предположить, что функции ПБП ротовой полости реализуются при взаимодействии с другими компонентами слюны, например АМП.

Целью работы явилось исследование антимикробной активности фрагмента пролин-богатого белка слюны человека P-F при его совместном действии с антимикробными пептидами – кателицидином LL-37 и гистатином 5.

Основным объектом исследования стал фрагмент белка P-F, относящегося к катионным пролин-богатым белкам слюны. P-F содержит 61 аминокислотный остаток, причем в состав

его молекулы входят три повторяющихся мотива из 13 аминокислот – PPGKPPQGG. Нами был выбран для исследования С-концевой фрагмент белка P-F с 43-го по 61-й аминокислотный остаток, PPGKPPQGGSKSRSA, содержащий этот мотив и включающий три остатка положительно заряженных аминокислот – лизина и аргинина.

Исследуемые антимикробные пептиды врожденного иммунитета – гистатин 5 и кателицидин LL-37 – присутствуют в слюне. Гистатины представляют собой обогащенные гистидином антибактериальные, а также фунгицидные катионные пептиды, состоящие из 7–38 аминокислотных остатков, и секретируются околоушными и подчелюстными железами. Кателицидин LL-37 является единственным представителем АМП семейства кателицидинов у человека, он широко представлен в различных клетках и тканях – фагоцитах, эпителии дыхательных путей, слюне и других биологических жидкостях.

В задачи работы входили химический синтез фрагмента 43-61 пролин-богатого белка P-F; оценка его антибиотической активности и активности исследуемых АМП – кателицидина LL-37 и гистатина 5 – против грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ML-35p и грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* SG511 путем установления минимальных ингибирующих рост бактерий концентраций; а также характеристика совместного антибактериального действия фрагмента P-F (43-61) и АМП.

Изучение биологической активности пролин-богатых белков и пептидов слюны человека, в том числе при их совместном действии с АМП, является актуальной задачей биомедицины, так как поможет понять биологическую значимость этих соединений и получить новую информацию о молекулярных факторах, обеспечивающих антимикробную защиту ротовой полости человека.

Материалы и методы. Фрагмент белка P-F (43-61) был синтезирован твердофазным методом с использованием Fmoc/tBu-стратегии [6]. Нарастивание аминокислотной последовательности проводилось в автоматическом пептидном синтезаторе Symphony X, Protein Technologies, США. Активация проводилась *in situ* под действием гидроксibenзотриазола с диизопропилкарбодиимидом в среде диметилформаида. Снятие пептида со смолы проводилось под действием трифторуксусной кислоты с добавками H₂O и триизопропилсилана. При этом происходило полное деблокирование всех постоянных защитных групп. Пептид был очищен с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии и лиофилизирован. Чистота полученного препарата пептида была не менее 95%, что подтверждалось с помощью аналитического электрофореза, обратно-фазовой жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией, Ultraflextreme, Bruker, USA. Масс-спектрометрия MALDI

ТОФ выполнялась в ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», данные масс-спектрометрического анализа любезно предоставлены д.х.н. Б.Л. Мильманом.

Химически синтезированные пептиды гистатин 5 и кателицидин LL-37 были произведены фирмой Anaspec Inc., США.

Антимикробную активность изучали в отношении грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ML35p (данный штамм был любезно предоставлен проф. Р. Лерером, Калифорнийский университет, Лос-Анжелес, США) и грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* SG511 (любезно предоставлен проф. Х.Г. Салом, Университет г. Бонна, Германия). Для определения минимальных ингибирующих рост бактерий концентраций антимикробных пептидов был использован метод серийных разведений в жидкой питательной среде [7]. Серийные двукратные разведения пептидов проводили в стерильных микрокамерах Теракаки в 0.01 М натрий-фосфатном буфере, содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина. В лунки микрокамер, содержащие пептиды или буфер (контрольные пробы), вносили суспензии микроорганизмов в 2,1%-ном бульоне Мюллера–Хинтона M391 (HiMedia, Индия). Микрокамеры инкубировали в течение 20 ч при 37°C. Значение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для пептидов определяли по лункам, где визуально не наблюдался (ингибировался) рост микроорганизмов. Результаты рассчитывались как выборочные медианы на основании данных не менее 3 независимых экспериментов, в каждом из которых имелось по три параллели опытных и 3–6 параллелей контрольных проб.

Оценка характера совместного антимикробного действия пептидов проводилась методом серийных разведений по схеме «шахматной доски» («Checkerboard titrations») [7]. Исследуемые пептиды вносили в лунки микрокамер так, чтобы серийные разведения одного из двух пептидов (А) проводились по горизонтали, а второго (В) – по вертикали. В лунках микрокамеры, таким образом, получали определенную комбинацию различных концентраций препаратов А и В. При этом крайние «строка» и «столбец» содержали только одно из пары исследуемых веществ, что позволяло получить показатели их МИК в ходе каждого проводимого опыта. Для характеристики совместного действия использовали индекс фракционной ингибирующей концентрации (ФИК). Его значение вычисляли по формуле: $\text{ФИК индекс} = \text{ФИК А} + \text{ФИК В} = [A]/[\text{МИК А}] + [B]/[\text{МИК В}]$, где [А] и [В] – концентрации пептидов А и В соответственно в их смеси (комбинации), ингибирующей рост бактерии, такой, что при понижении концентрации хотя бы одного из компонентов антимикробный эффект не наблюдается. В зависимости от величины индекса ФИК (иФИК) выделяют четыре случая [7]:

1) иФИК $\leq 0,5$ – синергизм: препараты усиливают антимикробный эффект друг друга;

- 2) $0,5 < \text{иФИК} \leq 1$ – аддитивное действие: антимикробный эффект препаратов аддитивно складывается;
- 3) $1 < \text{иФИК} \leq 2$ – индифферентное (независимое) действие: эффект одного вещества никак не зависит от присутствия другого;
- 4) $\text{иФИК} > 2$ – антагонистическое действие: эффект веществ в комбинации слабее, чем если бы они в тех же концентрациях применялись по отдельности.

Значения минимальных ингибирующих концентраций и индексов фракционных ингибирующих концентраций препаратов представлены как медианы, полученные по данным трех-пяти независимых экспериментов, в каждом из которых использовались две-три параллельные пробы.

Результаты исследования. Прежде чем изучить совместное антимикробное действие пептидов, которые по данным литературы присутствуют в ротовой полости человека: фрагмента белка слюны P-F в комбинации с антимикробным пептидом кателицидином или гистатином 5, – была проведена оценка антимикробной активности индивидуальных препаратов этих пептидов в отношении грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ML35p и грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* SG 511. Результаты определения минимальных ингибирующих концентраций исследуемых соединений методом серийных разведений в жидкой питательной среде представлены в таблице 1.

Таблица 1

Антибактериальная активность пептидов слюны человека – фрагмента пролин-богатого белка P-F (43-61), кателицидина LL-37 и гистатина 5

Вещество	МИК*, мкМ	
	<i>S. aureus</i> SG-511	<i>E. coli</i> ML-35p
Гистатин 5	16	16
Кателицидин LL-37	16	8
P-F (43-61)	256	256

* – Минимальная ингибирующая концентрация; данные представлены как медианы, полученные в трех-пяти независимых экспериментах, в которых имелось по три параллели для каждой концентрации пептида.

Из таблицы видно, что фрагмент белка P-F (43-61) проявляет низкую антимикробную активность по сравнению с антимикробными пептидами системы врожденного иммунитета.

Далее нами было исследовано совместное антибактериальное действие этого пролин-богатого пептида в комбинации с кателицидином LL-37 или гистатином 5. Результаты

определения индексов фракционных ингибирующих концентраций (иФИК), полученные методом «шахматной доски», приведены в таблице 2.

Таблица 2

Индексы фракционной ингибирующей концентрации (иФИК), рассчитанные для сочетанного антимикробного действия пептида слюны человека P-F (43–61) с кателицидином LL-37 или гистатином 5

Комбинации	иФИК*	
	<i>S. aureus</i> SG511	<i>E. coli</i> ML35p
LL-37 + P-F (43-61)	0,31	0,31
Гистатин 5 + P-F (43-61)	0,31	0,56

* – Представлены медианы, полученные по данным трех независимых экспериментов.

Значения иФИК ниже 0,5 указывают на наличие синергетического эффекта антимикробного действия при использовании комбинации исследуемых соединений. Такие показатели наблюдаются для трех комбинаций анализируемых веществ из четырех исследованных комбинаций. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что при сочетанном антимикробном действии кателицидина и фрагмента белка P-F (43-61) наблюдаются синергетические эффекты в отношении *E. coli* ML 35p и *S. aureus* SG 511, а при сочетанном действии гистатина 5 и фрагмента P-F – в отношении *S. aureus* SG 511. Таким образом, установлено, что в присутствии пролин-богатого пептида слюны, обладающего низкой антимикробной активностью, существенно повышается активность защитных молекул ротовой полости.

Обсуждение результатов исследования. Антимикробные пептиды системы врожденного иммунитета продуцируются как в виде семейств структурно родственных веществ, так и в виде спектра соединений различной структуры, содержащихся в клетках. Первые наблюдения синергетического совместного действия АМП, принадлежащих к одному структурному семейству – магейнинов (пептиды кожи лягушки *Xenopus laevis*), были сделаны относительно давно [8]. Выполнено множество работ, посвященных анализу совместного действия комбинаций, в состав которых входили пептиды разных видов животных, или пептидов и применяемых в клинической практике антибиотиков [9]. Однако подобный выбор сочетаний накладывает ограничение в интерпретации данных с точки зрения биологического значения наблюдаемого явления. Кроме того, в силу методического алгоритма получения АМП из натуральных источников, основанного на выделении прежде всего высокоактивных соединений, совместное антимикробное действие пептидов с

невыраженными антибиотическими свойствами, принадлежащих одному биологическому виду и имеющих сходную локализацию в организме, остается малоизученным. К таким соединениям относится и пролин-богатый белок Р-Ф. Защитные реакции, опосредованные пептидами и белками врожденного иммунитета и другими полипептидами слюны, реализуются в ротовой полости при их комплексном действии. Проведенный нами анализ сочетанного антимикробного действия синтетических аналогов пептидов, которые по данным литературы присутствуют в слюне человека, показал, что при применении комбинации Р-Ф и кателицидина или гистатина 5 наблюдаются синергетические эффекты в отношении исследованных бактерий. Механизм синергетических антимикробных эффектов может быть связан с тем, что рассматриваемые пептиды принадлежат к различным структурным семействам и по-разному воздействуют на бактериальные клетки. Для альфа-спиральных кателицидинов характерна способность быстро нарушать барьерную функцию бактериальных мембран, для пролин-богатых пептидов, многие из которых имеют конформацию полипролиновой спирали, установлены низкая мембранолитическая активность и наличие внутриклеточных мишеней антибиотического действия [10]. Взаимодополняющие механизмы биологической активности, возможно, и обуславливают синергетический характер антибиотического действия при совместном применении. Полученные данные свидетельствуют в пользу точки зрения, что наличие пролин-богатых пептидов, хотя и не обладающих собственной значимой антимикробной активностью, необходимо для осуществления барьерных функций в ротовой полости.

Заключение. На основе полученных данных можно предположить, что одним из важных факторов, обеспечивающих антимикробную защиту ротовой полости, является совместное действие ряда антимикробных пептидов системы врожденного иммунитета и пролин-богатых катионных белков слюны. Для использованных в данной работе АМП описаны не только антибактериальные свойства: кателицидин LL-37 обладает широким спектром биологической активности (например, разрушает оболочку вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши [11]), а гистатины способны модулировать процессы клеточной адгезии в ротовой полости, в том числе повышают адгезию клеток к поверхности титановых имплантов [12]. Таким образом, с практической точки зрения результаты проведенной нами работы могут иметь значение при создании комплексных средств профилактики и терапии различных видов патологии ротовой полости, в которых отдельные компоненты проявляют лечебный эффект, дополняя друг друга.

Работа проводилась при финансовой поддержке РФФИ: гранты № 17-04-02177а и № 18-315-00333.

Список литературы

1. Pfaffe T., Cooper-White J., Beyerlein P., Kostner K., Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin. Chem.* 2011. Vol. 57. P. 675–687.
2. Castagnola M., Cabras T., Iavarone F., Fanali C., Nemolato S., Peluso G., Bosello S.L., Faa G., Ferraccioli G., Messina I. The human salivary proteome: a critical overview of the results obtained by different proteomic platforms. *Expert Rev. Proteomics.* 2012. Vol. 9. No 1. P. 33-46.
3. Carpenter G. The secretion, components, and properties of saliva. *Ann. Rev. Food Sci. Technol.* 2013. Vol. 4. P. 267–276.
4. Вавилова Т. П., Янушев О.О., Островская И. Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. М.: Издательство БИНОМ. 2014. 312 с.
5. Fabian T., Hermann P., Beck A., Fejerdy F., Fabian G. Salivary Defense Proteins: Their Network and Role in Innate and Acquired Oral Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13. No 4. P. 4295–4320.
6. Merrifield R.B., Barany G. Solid-phase peptide synthesis In: *The peptides: analysis, synthesis, biology.* 1980. New York: Academic Press. No 2. P. 3-284.
7. Shafer W.M., Ed. *Antibacterial peptides Protocols. Methods in Molecular Biology.* Vol. 78. Humana press. New Jersey. 1997. 265 p.
8. Westerhoff H., Zasloff M., Rosner J., Hendler R., De Waal A., Jongasma P., Riethorst A., Juretić D. Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes. *Eur. J. Biochem.* 1995. Vol. 228. No 2. P. 257-264.
9. Cassone M., Otvos L. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2010. Vol. 8. No 6. P. 703-716.
10. Ciociola T., Giovati L., Giovannelli A., Conti S., Castagnola M., Vitali A. The activity of a mammalian proline-rich peptide against Gram-negative bacteria, including drug-resistant strains, relies on a nonmembranolytic mode of action. *Infect. Drug Resist.* 2018. Vol. 11. P. 969-979.
11. Brice D.C., Toth, Z., Diamond G., LL-37 disrupts the Kaposi's sarcoma associated herpes virus envelope and inhibits infection in oral epithelial cells. *Antiviral Research.* 2018. Vol. 158. P. 25-33.
12. Van Dijk I.A., Beker A.F., Jellema W., Nazmi K., Wu G., Wismeijer D., Krawczyk P.M., Bolscher J.G.M., Veerman E.C.I., Stap J. Histatin 1 enhances cell adhesion to titanium in an implant integration model. *J. Dent. Res.* 2017. Vol. 96. P. 430–436.