

УДК 519.999

©Коллектив авторов

## СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОЛИМФЫ ИММУНИЗИРОВАННЫХ И НЕИММУНИЗИРОВАННЫХ ЛИЧИНОК *GALLERIA MELLONELLA*

А.К. Буряк<sup>1</sup>, П.П. Пурыгин<sup>2</sup>, О.С. Срибная<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119991, Москва, Ленинский проспект, 31, корп. 4

<sup>2</sup>Самарский государственный университет, 443011, Самара, ул. Акад. Павлова, 1; тел.: 8(846)3345459; факс: 8(846)3345417; эл. почта: [elektromodel@mail.ru](mailto:elektromodel@mail.ru)

Исследована антибактериальная активность гемолимф иммунизированных и неиммунизированных личинок *Galleria mellonella*. С помощью ионообменной хроматографии и гель-электрофореза из гемолимф выделены белковые фракции с антибактериальной активностью. Масс-спектрометрический анализ фракций показал присутствие пептида с массой 5627 Да. По-видимому, данный пептид и определяет антибактериальную активность гемолимф.

**Ключевые слова:** антибактериальные пептиды, гемолимфа, личинки большой восковой моли *Galleria mellonella*.

**ВВЕДЕНИЕ.** В последние годы в научной литературе активно обсуждаются перспективы создания новых фармацевтических препаратов на основе природных антибактериальных пептидов. Это направление несет новую перспективу – использовать для лечения бактериальных и грибковых инфекций механизмы естественного иммунитета насекомых [1-3].

Основная функция кровеносной системы насекомых – перенос питательных, регуляторных веществ и продуктов метаболизма, а также защитная функция. Кровеносная система насекомых незамкнута. Текущая по ней жидкость называется гемолимфой. Гемолимфа насекомых – жидкость, состоящая из гемоцитов (клеток крови) и лимфы. У насекомых гемолимфа циркулирует в открытой системе, то есть благодаря сокращениям сердца она свободно движется во всех пространствах между тканями. Клетки крови свободно циркулируют в жидкости гемолимфы (странствующие гемоциты), а также клетки крови могут оседать на поверхности внутренних органов или соединяться с ними (связанные гемоциты), а затем переходить для увеличения защитных свойств крови в подвижное состояние.

У насекомых, в отличие от человека, отсутствует приобретенный иммунитет. Вместо этого с высокой точностью работают механизмы естественного, врожденного иммунитета: в ответ на внешний раздражитель в их организме образуется целый букет разнообразных веществ, которые немедленно нейтрализуют бактерии, грибки или вирусы. Таким образом, антибактериальная эффективность гемолимфы насекомых очевидна – к смеси разнообразных защитных веществ, обладающих широким спектром действия, бактерии и вирусы приспособиться не могут.

\* - адресат для переписки

К настоящему времени из личинок различных насекомых исследователями были выделены цекропин-подобные пептиды, обладающие антибактериальной активностью [4-7].

С целью поиска нового природного антибактериального пептида, объектом нашего исследования стали личинки большой восковой моли *Galleria mellonella* из семейства огневок (*Pyrallidae*, *Lepidoptera*).

**МЕТОДИКА.** Для ионообменной хроматографии использовали колонку (15×0,7 см), заполненную сефадексом CM-50. Подготовку колонки осуществляли, промывая её цитрат-фосфатным буфером сначала с pH 7,2, затем pH 5,1 (0,15 М). Элюирование осуществляли, используя градиент концентраций цитрат-фосфатного буфера (pH 5,1) 0,15 М – 1 М.

Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре ЛОМО СФ-46. Количественное определение содержания белка во всех фракциях, собранных с колонки, проводили по методу Варбурга и Кристиана [8].

В качестве тестового микроорганизма использовался суточный инокулят *E. coli* М – 17, выращенный на среде следующего состава: (г/л) пептон – 5 г; глюкоза – 10 г; NaCl – 4,68 г; KCl – 1,49 г; NH<sub>4</sub>Cl – 1,07 г; CaCl<sub>2</sub> – 0,44 г; трис – 6 г (pH 7,0); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,55 г; MgSO<sub>4</sub> – 5 г.

Электрофорез проводили в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ) в щелочной боратной буферной системе (pH 9,2). Для электрофореза использовали реактивы и камеру фирмы “Reanal” и универсальный источник питания УИП-1. В качестве маркерного красителя в верхний буфер добавлен бромтимоловый синий. Первые 30 минут электрофорез проводили при силе тока 100 мА, затем следующие 30 минут при 200 мА. Электрофореграммы окрашивали 0,5% амидочерным В в течение 7 мин и отмывали от избытка красителя 7% уксусной кислотой в течение 28 дней, меняя кислоту каждые 4 дня.

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре MALDI TOF Ultraflex фирмы “Bruker Daltonics” (азотный лазер с длиной волны 337 нм и частотой импульса до 20 Гц).

Для исследования использовали личинки большой восковой моли *Galleria mellonella*, выращенные в лабораторных условиях в ИТЭБ РАН, г. Пущино. Для выделения гемолимфы отбирали личинки, находившиеся в стадии развития, предшествующей окукливанию. Средний вес личинок составлял 100±20 мг, длина личинок 1,5±0,3 см.

Провели две серии экспериментов с двумя партиями личинок по выделению гемолимфы и в каждой серии получали гемолимфы неиммунизированных и иммунизированных личинок *Galleria mellonella*.

Гемолимфу личинок получали, протыкая иглой верхнюю часть брюшка и надавливая на брюшную полость. В собранную гемолимфу помещали кристаллик тиомочевины, используемый в качестве протеазного ингибитора.

Иммунизировали личинок двух партий. Каждой личинке была произведена инъекция 5 мкл 1000 – кратно разведенной суспензии обработанных нагреванием бактерий *Pseudomonas aeruginosa* [9]. Далее личинки 48 часов выдерживали в термостате при температуре 28°C.

Для дальнейшего исследования к каждой из гемолимф, выделенных из первой партии неиммунизированных и иммунизированных личинок *Galleria mellonella*, добавляли 0,7 мл 0,15 М цитрат-фосфатного буфера (pH 5,1±0,02). Далее к 2 мл полученных растворов гемолимф добавляли по 10 мкл твина.

Для дальнейшего исследования к каждой из гемолимф, выделенных из второй партии неиммунизированных и иммунизированных личинок *Galleria mellonella*, добавляли 6 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,2±0,02). Полученные растворы хранили при температуре -18°C.

Ионообменную хроматографию гемолимф личинок первой партии проводили на колонке с сефадексом CM-50. На колонку наносили по 2 мл полученных растворов гемолимф иммунизированных и неиммунизированных личинок и проводили фракционирование.

В случае фракционирования гемолимфы иммунизированных личинок с катионообменной колонки собрали 17 фракций по 2,5 мл (рис. 1).

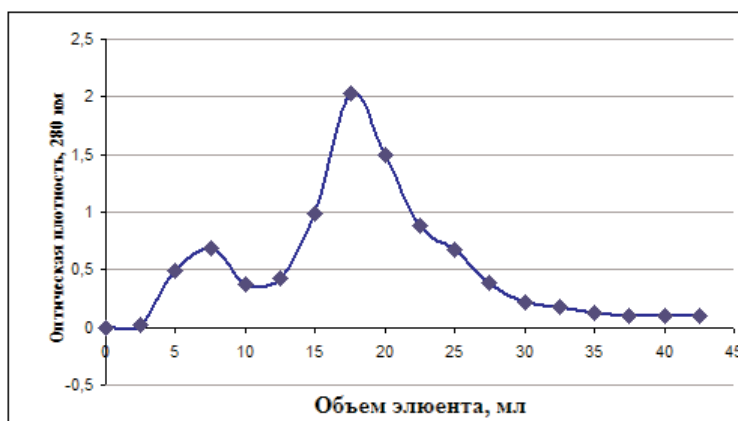


Рисунок 1.

Ионообменная хроматография гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella* на колонке (15×0,7 см) с сефадексом CM-50.

В случае фракционирования гемолимфы неиммунизированных личинок с катионообменной колонки собрали 14 фракций по 2,5 мл (рис. 2).

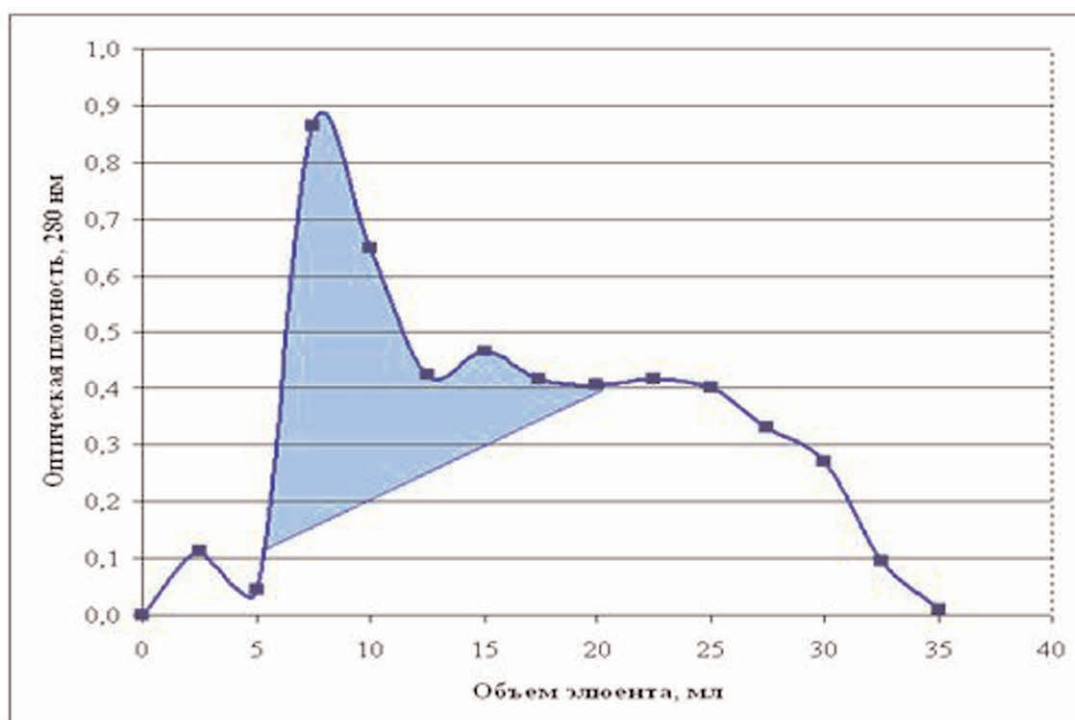


Рисунок 2.

Ионообменная хроматография раствора гемолимфы неиммунизированных личинок *Galleria mellonella* на колонке с сефадексом CM-50 (15×0,7 см). Заштрихованы фракции №3, №4, №5, №6, №7, №8.

## ПЕПТИДЫ ГЕМОЛИФЫ ЛИЧИНОК ВОСКОВОЙ МОЛИ

В каждой фракции измеряли оптическую плотность при 280 и 260 нм. Используя результаты данных измерений определяли концентрацию белка во фракциях. Полученные данные представлены в виде хроматограмм.

Для проведения микробиологического тестирования отбирали 5 фракций гемолимфы иммунизированных личинок первой партии с концентрацией белка превышающей 0,7 мг/мл, и 6 фракций гемолимфы неиммунизированных личинок первой партии с концентрацией белка превышающей 0,3 мг/мл.

Бумажные диски  $d = 0,6$  см (8 дисков для каждого образца) пропитывали анализируемыми фракциями и помещали на свежие посеvy *E. coli* во влажном состоянии. Перед посевом бактерий диски стерилизовали с помощью УФ–бактерицидных ламп. Антибактериальную активность определяли по размерам зон ограниченного роста *E. coli* М – 17 (наличие единичных точечных колоний или отсутствие колоний) вокруг дисков, пропитанных фракциями гемолимфы. В качестве образцов сравнения для фракций гемолимфы иммунизированных личинок первой партии использовали диски, пропитанные 0,15 М цитрат-фосфатным буфером (рН 5,1), а для раствора гемолимфы иммунизированных личинок второй партии – диски, пропитанные 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,2). Посев проводили в микробиологическом боксе на чашки Петри по методу, представленному в [10]. Чашки Петри помещали в термостат на двое суток при 37°C. Результаты обрабатывали методами математической статистики.

По результатам микробиологического тестирования из 5 фракций гемолимфы иммунизированных личинок первой партии для электрофореза были выбраны 2 фракции (№3 и №6), обладающие наибольшей антибактериальной активностью, а из 6 фракций гемолимфы неиммунизированных личинок первой партии для электрофореза были выбраны 4 фракции (№3, №4, №7 и №8), обладающие наибольшей антибактериальной активностью.

Для проведения электрофореза растворов гемолимф неиммунизированных и иммунизированных личинок второй партии, 0,5 мл каждого раствора центрифугировали при 850 g в течение 5 минут, осадки отбрасывали и использовали только центрифугат.

В каждую электрофоретическую ячейку помещали сверху на гель по 0,5 мл пробы, полученной смешением 0,5 мл каждого исследуемого раствора белка с 0,5 мл 40% раствора сахарозы.

Для каждой фракции гемолимфы личинок первой партии получали по 2 электрофореграммы, а для раствора гемолимфы личинок второй партии по 3 электрофореграммы.

Из полученных электрофореграмм вырезали фрагменты геля размером 3×4 мм, содержащие анализируемый белок, и растирали их в гомогенизаторе. Белки из измельченного геля экстрагировали дистиллированной водой (1,5 мл) в течение суток при 40°C. После окончания экстракции гель удаляли центрифугированием.

Полученные растворы белков анализировали методом масс-спектрометрии MALDI TOF. Чтобы определить уровень шумов, проводили холостой опыт. Для этого повторяли описанную выше процедуру экстракции из равного фрагмента геля, не содержащего белка. В качестве матрицы использовали раствор  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты в изопропанолe с концентрацией 10 мг/мл.

Раствор матрицы (0,5–2 мкл) наносили на специальную подложку, затем после испарения растворителя матрицы сверху наносили анализируемый раствор белка. Интервал детектируемых масс составлял 4000–100000 Да. Использовали режим детектирования положительных ионов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** При росте бактерий *E. coli* на питательной среде вокруг фильтров, пропитанных гемолимфами иммунизированных и неиммунизированных личинок, наблюдали зону отсутствия роста (отсутствие колоний) и зону ограниченного роста (наличие единичных точечных колоний). Исследование антибактериальной активности показало, что обе гемолимфы

обладали выраженной антибактериальной активностью, что обнаруживалось по достоверному увеличению ширины зон задержки роста *E. coli* по сравнению с контрольными фильтрами, пропитанными буферным раствором, не содержащим бактерицидных компонентов (табл. 1).

Таблица 1. Значения зон задержки роста *E. coli* на плотной среде вокруг дисков, пропитанных раствором гемолимфы.

Проба	Зона ограничения роста, мм	Зона отсутствия роста, мм	Достоверность различий (к контролю)
<b>Гемолимфа иммунизированных личинок</b>	<b>10,10 ± 0,53</b>	<b>6,9 ± 0,06</b>	<b>p &lt; 0,01</b>
<b>Гемолимфа неиммунизированных личинок</b>	<b>7,80 ± 0,18</b>	<b>6,70 ± 0,10</b>	<b>p &lt; 0,01</b>
<b>0,1 М фосфатный буфер pH 7,2 ± 0,02</b>	<b>5,0 ± 0,80</b>		

Из таблицы 1 видно, что обе гемолимфы проявляли выраженную антибактериальную активность, однако поскольку ширина зоны ограничения роста больше в случае гемолимфы иммунизированных личинок, то, по-видимому, она содержит большее количество антимикробных компонентов.

С целью выделения факторов, отвечающих за антибактериальную активность гемолимфы личинок *Galleria mellonella*, провели фракционирование растворов гемолимфы.

В процессе ионообменной хроматографии произошло разделение гемолимфы иммунизированных личинок на две белковые фракции: высокомолекулярную и среднемолекулярную, а гемолимфа неиммунизированных личинок разделилась на высокомолекулярную и слабо выраженную среднемолекулярную фракции.

Данные хроматографического анализа представлены на рисунках 1 и 2.

Из рисунка 1 видно, что большая часть белковых компонентов гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella* обладает среднемолекулярным весом.

Используя методику Варбурга и Кристиана, проведён расчёт количественного содержания белков в каждой из 14 и 17 фракций, полученных методом ионообменной хроматографии раствора гемолимфы *Galleria mellonella*.

Результаты расчета представлены в таблице 2.

Из данных таблицы 2 следует, что гемолимфа иммунизированных личинок, по-видимому, содержит белковых компонентов в три раза больше, чем гемолимфа неиммунизированных личинок.

В процессе микробиологического тестирования на наличие антибактериальной активности у гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella* были получены достоверные расширения зон задержки роста бактерии *E. coli* в присутствии белковых фракций гемолимфы иммунизированных личинок № 3, 6, 9 (табл. 3). На основании этого сделано предположение о наличии в данных фракциях компонентов, обладающих бактериостатическим действием.

# ПЕПТИДЫ ГЕМОЛИФЫ ЛИЧИНОК ВОСКОВОЙ МОЛИ

Таблица 2. Содержание белка во фракциях.

Номер фракции	Концентрация белка (мг/мл)	
	Фракции из гемолимфы неиммунизированных личинок	Фракции из гемолимфы иммунизированных личинок
1	0,06644	0,04185
2	0,01962	0,52101
3	0,71071	0,72981
4	0,52414	0,36167
5	0,32584	0,36545
6	0,36431	1,09501
7	0,33241	2,73321
8	0,32153	1,87861
9	0,32937	0,97202
10	0,31831	0,60475
11	0,21966	0,37033
12	0,1411	0,46913
13	0,0469	0,19449
14	0,04001	0,17019
15		0,11946
16		0,12676
17		0,13661
Общее количество полученных белков	3,76035	10,89036

Таблица 3. Значения зон задержки роста *E. coli* на плотной среде вокруг дисков, пропитанных фракциями гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella*.

№ фракции	Зона ограничения роста, мм	Достоверность различий (к контролю)
3	Первая зона: 7,10± 0,01 Зона мелких колоний в виде кольца: 8,20± 0,30 Вторая зона: 13,5± 0,77	p < 0,01
6	7,58 ± 0,38	p < 0,01
7	6,00 ± 0,00	
8	6,00 ± 0,00	
9	7,00 ± 0,33	p < 0,05
0,15 М цитрат-фосфатный буфер pH 5,1± 0,02	6,00 ± 0,00	



По результатам микробиологического тестирования установили, что фракция №3, обладающая наименьшей концентрацией белка из выбранных фракций, имеет высокую антибактериальную активность. Данная фракция при микробиологическом тестировании давала три чётко различающиеся концентрические зоны: зону полного отсутствия роста (1), зону мелких колоний (уменьшение скорости роста) и зону единичных, но более крупных колоний (3). Вероятно, наличие нескольких зон связано с многокомпонентностью данной фракции. Было выявлено, что две фракции гемолимфы (№7 и №8), имеющие самые высокие концентрации белка, не обладают антибактериальной активностью.

В процессе микробиологического тестирования на наличие антибактериальной активности у гемолимфы неиммунизированных личинок *Galleria mellonella* были получены достоверные расширения зон задержки роста бактерии *E. coli* в присутствии белковых фракций гемолимфы неиммунизированных личинок № 3, 4, 5, 6, 7, 8 (табл. 4).

Таблица 4. Значения зон задержки роста *E. coli* на плотной среде вокруг дисков, пропитанных фракциями гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella*.

№ фракции	Зона отсутствия роста (мм)	Зона ограниченного роста (мм)	Достоверность различий (к контролю)
3	7,25 ± 0,07	12,00 ± 0,43	p < 0,01
4	6,38 ± 0,20	10,94 ± 0,15	p < 0,01
5	6,50 ± 0,00	—	p < 0,01
6	6,00 ± 0,00	7,42 ± 0,26	p < 0,01
7	6,00 ± 0,00	9,00 ± 0,28	p < 0,01
8	6,83 ± 0,11	10,50 ± 0,72	p < 0,01
0,15 М цитрат-фосфатный буфер pH 5,1 ± 0,02	6,00 ± 0,00	6,86 ± 0,15	

По результатам микробиологического тестирования установили, что фракция №3, обладающая наибольшей концентрацией белка, и фракция №8, содержащая наименьшее количество белка, проявляют самую высокую антибактериальную активность (табл. 4). Выявили, что фракции №4 и №7, также обладают выраженной антибактериальной активностью (табл. 4).

Анализ полученных данных показывает, что в обоих гемолимфах содержались вещества, проявляющие антибактериальные свойства. Из таблиц 2, 3 и 4 видно, что фракции №3 у обоих гемолимф проявили самые высокие антибактериальные активности, при сравнительно одинаковом содержании белка 0,71071 и 0,72981 мг/мл. Фракции № 6 указанных гемолимф также показали антимикробные свойства, однако количество белковых компонентов в гемолимфе иммунизированных личинок почти в три раза превышает их содержание в гемолимфе

## ПЕПТИДЫ ГЕМОЛИФЫ ЛИЧИНОК ВОСКОВОЙ МОЛИ

неиммунизированных личинок 1,09501 и 0,36431 мг/мл соответственно. В гемолимфе неиммунизированных личинок во фракциях № 7, 8 в концентрациях 0,33241 и 0,32153 мг/мл содержались антибактериальные вещества. А соответствующие им фракции гемолимфы иммунизированных личинок № 7, 8 не проявили антибактериальных свойств, имея достаточно высокие концентрации белка 2,73321 и 1,87861 мг/мл.

С целью анализа биологически активных белков и очистки антибактериальных компонентов провели:

- Нативный гель-электрофорез раствора гемолимфы иммунизированных личинок второй партии и двух фракций гемолимфы иммунизированных личинок (№3 и №6) первой партии, обладающих по результатам микробиологического тестирования наибольшей антибактериальной активностью (рис. 3, 4).

- Нативный гель-электрофорез растворов гемолимфы неиммунизированных личинок второй партии и четырех фракций гемолимфы (№3, №4, №7, №8) первой партии, обладающих по результатам микробиологического тестирования наибольшей антибактериальной активностью (рис. 3, 5).



**Рисунок 3.**

Электрофореграммы растворов гемолимф иммунизированных личинок (I) и неиммунизированных личинок (II), содержащих антибактериальные компоненты, соответственно (1 - нижний белок, используемый для получения масс-спектра).



**Рисунок 4.**

Электрофореграммы фракций №3 (I) и №6 (II), полученных после ионообменной хроматографии гемолимфы иммунизированных личинок и обладающих антибактериальной активностью, соответственно (2 - белок, используемый для получения масс-спектра).



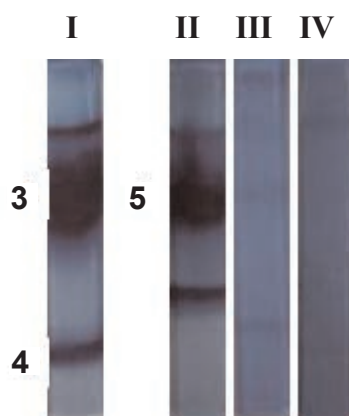


Рисунок 5.

Электрофореграммы фракций №3 (I), №4 (II), №7 (III) и №8 (IV), полученных после ионообменной хроматографии гемолимфы неиммунизированных личинок и обладающих антибактериальной активностью, соответственно (3, 4, 5 - белки, используемые для получения масс-спектра).

По-видимому, гемолимфы иммунизированных и неиммунизированных личинок *Galleria mellonella* содержали 5 и 7 белковых компонентов соответственно, различающихся по электрофоретической подвижности, поскольку на электрофореграммах растворов гемолимф иммунизированных и неиммунизированных личинок второй партии видны области 5 и 7 белковых полос (рис. 3).

На электрофореграммах фракций №3, №6, полученных из гемолимфы иммунизированных личинок, выявлено 2, 1 индивидуальных белковых компонентов соответственно (рис. 4).

На электрофореграммах фракций №3, №4, №7, №8, полученных из гемолимфы неиммунизированных личинок, выявлено 4, 5, 5 и 2 индивидуальных белковых компонентов соответственно (рис. 5).

После избирательной элюции разделенных электрофорезом белков из геля полученные растворы белков анализировали методом MALDI TOF.

Масс-спектр нижнего белка (рис. 6) с электрофореграммы гемолимфы иммунизированных личинок (рис. 3) позволил оценить его молекулярную массу, которая составила 5626 Да. Данный белок является антибактериальным, поскольку достоверно увеличивает зоны задержки роста *E. coli* (табл. 5).

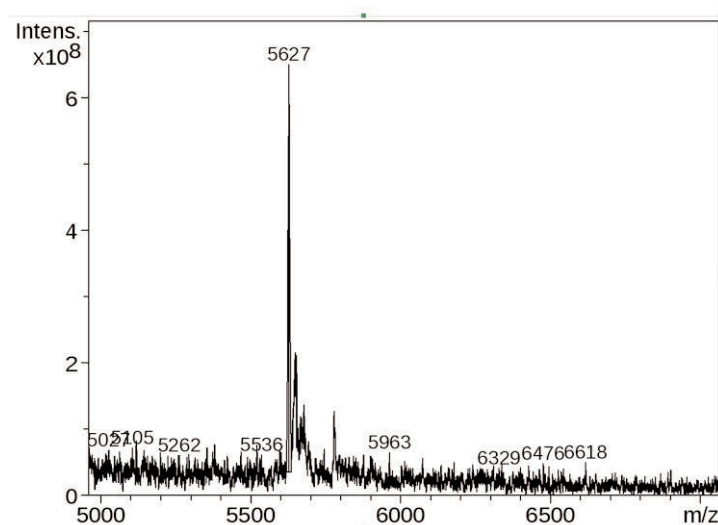


Рисунок 6.

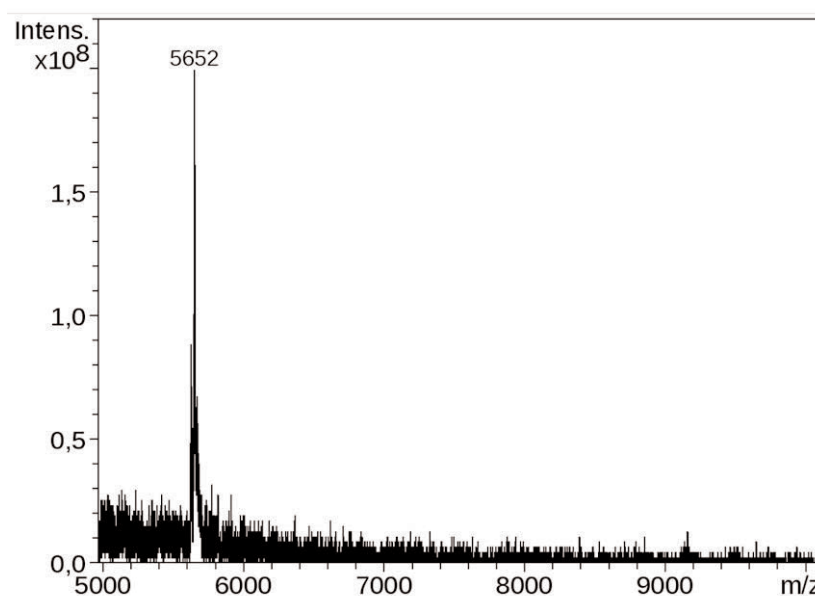
Масс-спектр нижнего белка (1) с электрофореграммы раствора гемолимфы иммунизированных личинок.

## ПЕПТИДЫ ГЕМОЛИФЫ ЛИЧИНОК ВОСКОВОЙ МОЛИ

Таблица 5. Средние значения зон задержки роста *E. coli* на плотной среде вокруг дисков, пропитанных исследуемыми растворами белка из гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella*, содержащими индивидуальный белковый компонент с молекулярной массой 5627 Да.

Проба	Зона ограничения роста, мм	Зона отсутствия роста, мм	Достоверность различий (к контролю)
Гемолимфа иммунизированных личинок (нижний белок)	$8,14 \pm 0,18^*$	$6,00 \pm 0,00$	$p < 0,01^*$
Фракция № 6	$8,13 \pm 0,15^*$	$6,50 \pm 0,10$	$p < 0,01^*$
Стандарт	$6,02 \pm 0,80$	$6,00 \pm 0,00$	

Масс-спектр белка фракции №6 (рис. 7) с электрофореграммы гемолимфы иммунизированных личинок (рис. 4) позволил оценить его молекулярную массу, которая составила 5627 Да. Антибактериальные свойства белка подтверждаются достоверным увеличением зоны задержки роста *E. coli* (табл. 5) в его присутствии. На масс-спектре белка фракции № 6 пик молекулярного иона представлен в виде  $[M+Na]^+$ . Это характерно для метода MALDI TOF, поскольку при его использовании пик молекулярного иона образован в виде  $[M]^+$ , либо в виде  $[M+Na]^+$ .

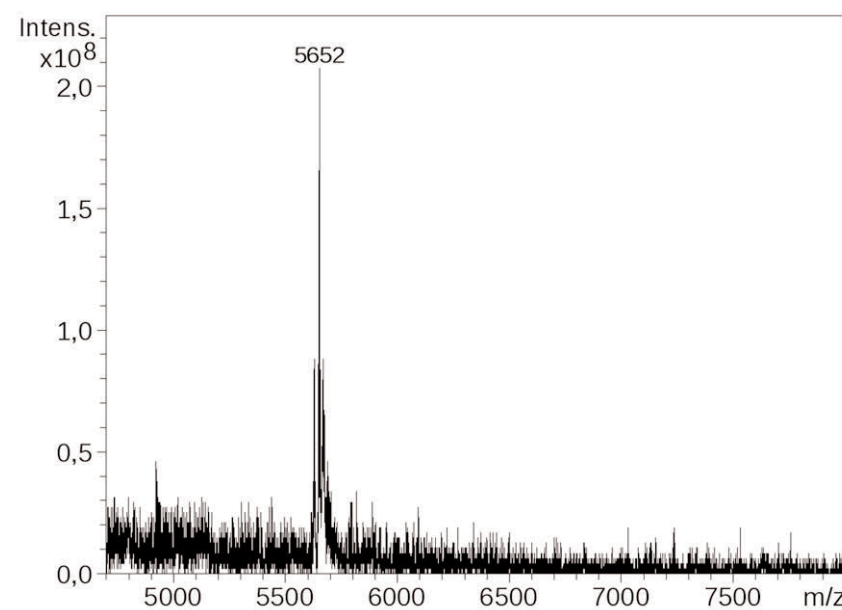


**Рисунок 7.**

Масс-спектр белка (2) с электрофореграммы фракции №6 гемолимфы иммунизированных личинок.

Масс-спектрометрический анализ фракции № 6 и белков гемолимфы иммунизированных личинок выявил единую природу антибактериальных белковых компонентов из гемолимфы иммунизированных личинок, полученных разными способами.

Масс-спектр второго белка (рис. 8) с электрофореграммы фракции №3 гемолимфы неиммунизированных личинок (рис. 5) позволил оценить его молекулярную массу, которая составила 5627 Да. Данный белок является антибактериальным, поскольку достоверно увеличивал зоны задержки роста *E. coli* (табл. 6).



**Рисунок 8.**

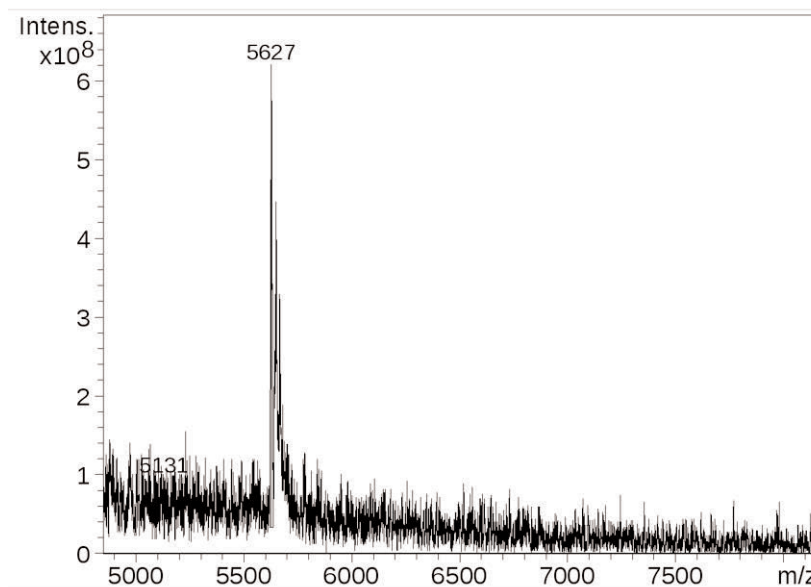
Масс-спектр второго белка (3) с электрофореграммы фракции №3 гемолимфы неиммунизированных личинок.

Таблица 6. Средние значения зон задержки роста *E. coli* на плотной среде вокруг дисков, пропитанных исследуемыми растворами белка из гемолимфы неиммунизированных личинок *Galleria mellonella*, содержащими индивидуальный белковый компонент с молекулярной массой 5627 Да.

Проба	Зона отсутствия роста (мм)	Зона ограниченного роста (мм)	Достоверность различий (к контролю)
Фракция №3 (2-й белок)	6,00 ± 0,00	7,77 ± 0,10	p < 0,01*
Фракция №3 (3-й белок)	6,00 ± 0,00	8,96 ± 0,14	p < 0,01*
Фракция №4 (2-й белок)	6,80 ± 0,15	8,13 ± 0,12	p < 0,01*
Стандарт	6,00 ± 0,00	6,92 ± 0,80	

## ПЕПТИДЫ ГЕМОЛИФЫ ЛИЧИНОК ВОСКОВОЙ МОЛИ

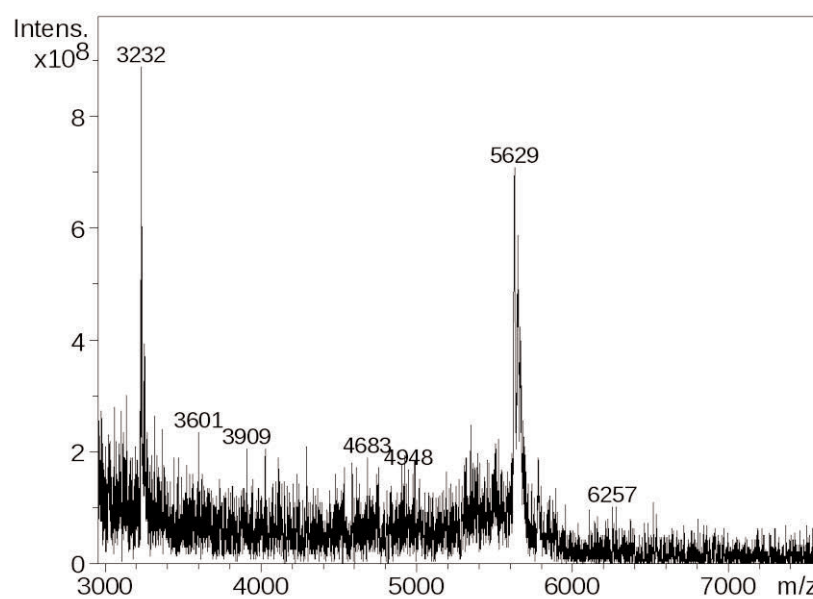
Масс-спектр третьего белка (рис. 9) с электрофореграммы фракции №3 гемолимфы неиммунизированных личинок (рис. 5) позволил оценить его молекулярную массу, которая составила 5626 Да. Антибактериальные свойства белка подтверждались достоверным увеличением зоны задержки роста *E. coli* (табл. 6) в его присутствии.



**Рисунок 9.**

Масс-спектр третьего белка (4) с электрофореграммы фракции №3 гемолимфы неиммунизированных личинок.

Масс-спектр второго белка (рис. 10) с электрофореграммы фракции №4 гемолимфы неиммунизированных личинок (рис. 5) показал наличие двух белковых компонентов с молекулярными массами 3231 Да и 5628 Да соответственно. Антибактериальные свойства указанных белков подтверждаются достоверным увеличением зоны задержки роста *E. coli* (табл. 6) в их присутствии.



**Рисунок 10.**

Масс-спектр второго белка (5) с электрофореграммы фракции №4 гемолимфы неиммунизированных личинок.

Масс-спектрометрический анализ остальных белков фракции не позволил их идентифицировать методом MALDI TOF, так как получались сложные спектры. Предполагается применить другие методы для уточнения, поскольку использование только масс-спектрометрических данных не достаточно.

Микробиологическое тестирование растворов белка, экстрагированных из геля, подтверждает их антибактериальные свойства (табл. 5, 6).

Масс-спектрометрический анализ биологически активных компонентов в гемолимфах неиммунизированных личинок и иммунизированных личинок *Galleria mellonella* показал наличие антибактериального белкового компонента с молекулярной массой 5626 Да в составах обоих гемолимф. По-видимому, данный пептид содержится в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* постоянно, а иммунизация насекомого суспензией бактерий *Pseudomonas aeruginosa* лишь увеличивает его содержание.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Анализ полученных результатов позволяет сделать нам следующие выводы:

1) Получены достоверные значения расширения зон задержки роста *E. coli* в гемолимфе иммунизированных личинок *Galleria mellonella* и её белковых фракциях, на основании чего сделано предположение о наличии в данных объектах компонентов, обладающих бактериостатическим действием.

2) Масс-спектрометрический анализ позволил обнаружить в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* новый антибактериальный пептид. Методом MALDI TOF установлена молекулярная масса данного пептида – 5627 Да.

3) Не выявлена зависимость между значениями ширины зон задержки роста бактерий *E. coli* на плотной среде в присутствии исследуемых фракций гемолимфы и общей концентрацией белков, входящих в их состав.

В дальнейшем представляется перспективным более детальное изучение выделенного индивидуального белкового компонента (5627 Да) с целью разработки на его основе нового класса антибактериальных лекарственных препаратов, предназначенных для лечения бактериальных и грибковых инфекций.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Nikol S., Pelisek J., Engelmann M.G., Rolland P.H., Armeanu S. (2000) Int. J. Angiol., **9**(2), 87-94.
2. Haeberli S., Kuhn-Nentwig L., Schaller J., Nentwig W. (2000) Toxicon., **38**(3), 373-380.
3. Sawa T., Kurahashi K. (1999) Masui, **48**(11), 1186-1193.
4. Otvos L. (2000) J. Pept. Sci., **6**(10), 497-511.
5. Andra J., Berninghausen O., Leippe M. (2001) Med. Microbial. Immunol. (Berl.), **189**, 169-173.
6. Kim K.R., Lee Y.H., Bang I.S., Kim E.S., Kang C.S., Yun C.Y., Lee I.H. (2000) Arch. Insect Biochem Physiol., **45**(4), 149-155.
7. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Vitcchi C., Mocchegiani F., Riva A., Saba V., Scalise G. (2001) Crit. Care Med., **29**, 1666-1669.
8. Досон Р. (1991) Справочник биохимика /Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот/ под ред. К. Джонса. – М.: Мир, с. 544.
9. Stephens J.M. (1962) Can. J. Microbiol., **8**, 597-602.
10. Пурьгин П.П., Срибная О.С., Кленова Н.А. (2007) Вестник СамГУ, **9**/1(57), 270-286.

Поступила: 21. 09. 2008.

COMPARISON OF THE RESULTS OF RESEARCH OF HEMOLYMPH IMMUNIZED  
AND NONIMMUNIZED OF LARVAE OF *GALLERIA MELLONELLA*

*A.K. Buryak<sup>1</sup>, P.P. Purygin<sup>2</sup>, O.S. Sribnaya<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Leninsky prosp., 31, bld. 4,  
Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup>Samara State University, str. Acad. Pavlova, 1, Samara, 443011 Russia; tel.: 8 (846) 3345459;  
fax: 8 (846) 3345417; e-mail: elektromodel@mail.ru

This work deals with the antibacterial activity of larvae of *Galleria mellonella*. Protein fractions with antibacterial activity have been purified from hemolymph by ion-exchange chromatography and gel-electrophoresis. The mass-spectrometric analysis of fractions showed the presence of a peptide of 5627 Da. Probably, this peptide determines the antibacterial activity of hemolymph.

**Key words:** antibacterial peptides, hemolymph, larvae of great wax moth *Galleria mellonella*.