

Пречистване, характеризиране и  
молекулно идентифициране на  
антимикробни пептиди от  
хемолимфата на градинския  
охлюв *Helix aspersa*

Институт по органична химия  
с център по фитохимия - БАН

# Значение и приложение на антимикробните пептиди:

- хемолимфата на молюсковите организми е сложна смес от биохимично и фармакологично активни компоненти – гликопептиди и протеини;
- алтернатива на хранителните консерванти и на традиционно използваните антибиотици;
- разрушават структурата и нарушават функциите на клетъчната мембрана на патогенните микроорганизми;
- всеки жив организъм има специфични антибактериални пептиди, които го адаптират към условията на средата, която обитава и го предпазват от въздействието на болестотворни микроорганизми.

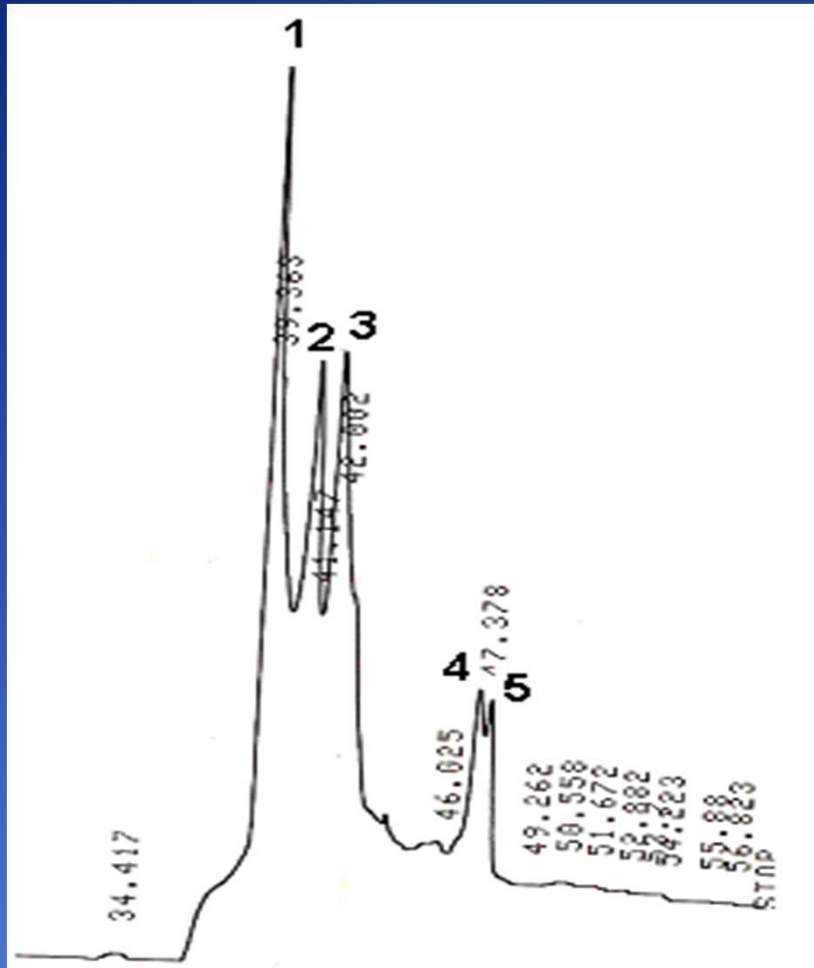
- антимикробните пептиди, изолирани от хемолимфата на различни молюски - подобно на пептидите, изолирани от бозайници, насекоми и растения - служат като ефекторни молекули на първичния имунен отговор, осигурявайки висока степен на защита срещу патогени.

# Методика за работа:

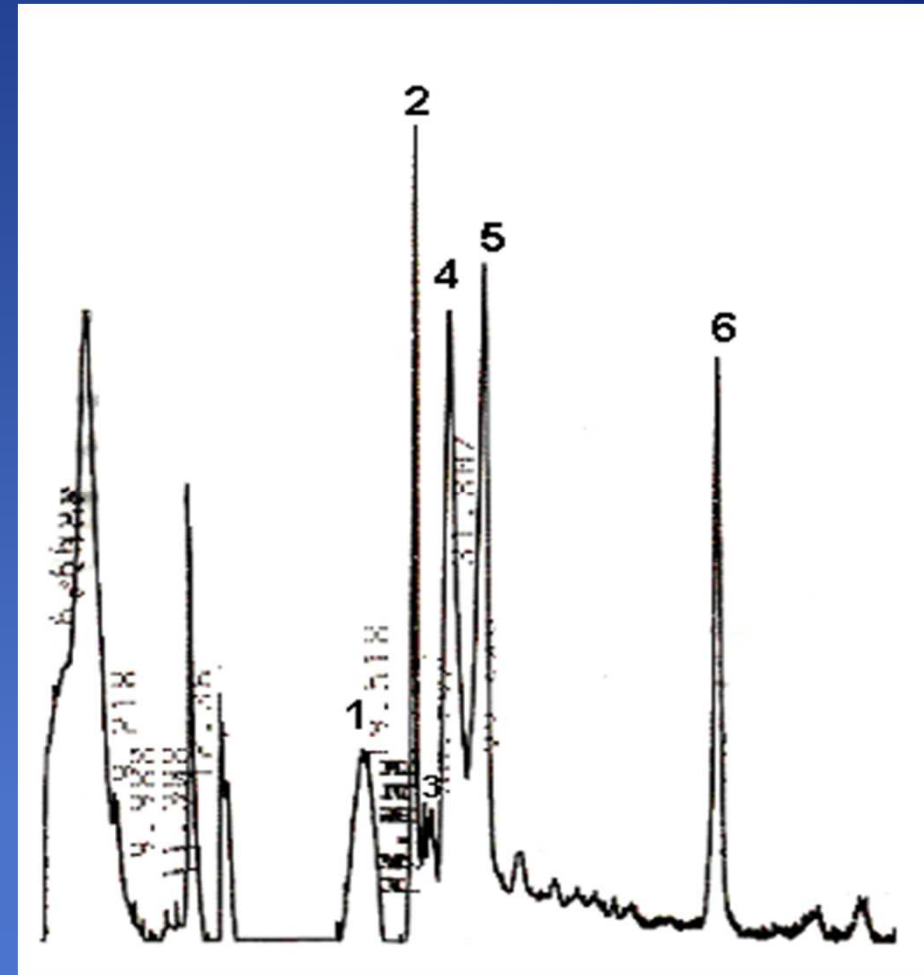
- определяне на антимикробните пептиди чрез ултрафилтрация и обратно-фазова високоефективна течна хроматография (RP-HPLC);
- масспектрометричен анализ за определяне на точните молекулни маси на пептидите;
- Едманово разграждане – чрез което ще се определи аминокиселинната последователност, както и определяне на N-крайните секвенции на полипептидната верига;
- определяне на вторичната структура на пептидите, чрез измерване на кръгово-дихроичните спектри (CD) в областта 195- 260 нм.

- Хемолимфата се концентрира и разделя на няколко фракции, чрез поредица от филтри, с различен размер - 3, 10 и 30 кДа. Фракция , с молекулна маса между 3 и 10 кДа, се концентрира и пуска за разделяне на HPLC – система с буфери - съответно: А (вода с 0,1% TFA) и В (80% ацетонитрил и 0,1% TFA), при средна скорост на потока в колоната 1,5 ml/ min. Елуираните фракции се събират и лиофилизират.
- Пептидите от хемолимфата бяха тествани срещу следните бактериални щамове: *E.coli*, *Staphilococcus epidermidis*, *Staphilococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* и *Candida albicans*.
- УВ-спектрите показват, че веществата в хемолимфата на *H. aspersa* притежават характеристики на пептиди. Четири от тях имат силно антимикробно действие срещу тестваните грам-положителни и грам-отрицателни микроорганизми.
- Установено е, че активността на пептидите, изолирани от слюзта е много по-ниска от активността на пептидите, изолирани от хемолимфата.

## Антибактериални пептиди от хемолимфата на *Helix aspersa*



Фракция 3 (под 10 кДа) инхибира над 50% *Staphylococcus aureus*



Фракции 3, 4, 5, 6 (между 10-30 кДа) показана около 50% инхибиране срещу *E. coli*



# Антимикробна активност на пептиди, изолирани от хемолимфа на *H. aspersa*

Пептид	<i>E.coli</i> 0h	<i>E.coli</i> 24h	<i>Staph.epidermidis</i> 0h	<i>Staph.epidermidis</i> 24h	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> 0h	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> 24h
1Н	0,034	0,384	0,036	0,567	0,049	0,203
2Н	0,039	0,743	0,037	0,534	0,053	0,215
3Н	0,038	0,749	0,032	0,444	0,052	0,211
4Н	0,038	0,774	0,036	0,452	0,059	0,189
5Н	0,035	0,377	0,049	0,396	0,052	0,157
6Н	0,043	0,608	0,044	0,654	0,050	0,225
7Н	0,047	0,101	0,048	0,045	0,047	0,149
8Н	0,042	0,470	0,043	0,584	0,052	0,161
Контрола	0,035	0,485	0,032	0,498	0,038	0,137

Пептид	Pseudomonas aeruginosa 0h	Pseudomonas aeruginosa 24h	Staph. aureus 0h	Staph. aureus 24h	Candida albicans 0h	Candida albicans 24h
1Н	0,043	1,091	0,033	0,125		
2Н	0,049	1,15	0,041	0,132		
3Н	0,048	0,834	0,040	0,255		
4Н	0,051	1,001	0,038	0,128		
5Н	0,045	0,948	0,035	0,111		
6Н	0,053	1,021	0,039	0,197		
7Н	0,052	1,094	0,038	0,034		
8Н	0,052	1,064	0,038	0,241		
Контрола	0,038	0,384	0,032	0,247		







Благодаря за вниманието!