

БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ПОЛОСТИ РТА

М.М. Мадумарова¹

Г.А. Муминова²

Н.И. Алимов³

Аннотация: В работе подробно освещён биохимический анализ антимикробных пептидов в полости рта, которые обеспечивают первую линию защиты тканей полости рта от внедрения патогенных факторов. В ротовой полости обнаружено несколько групп антимикробных пептидов, имеющих разное происхождение и проявляющих активность против бактерий, грибов и вирусов, а также обладающих свойствами иммуномодуляторов и хемоаттрактантов. Антимикробные пептиды играют важнейшую роль для поддержания здоровья в полости рта.

Ключевые слова: АМП, слизистая оболочка, биохимические функции, гистатины, слюнные железы, аденомедуллин, Hst-5.

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Микрофлора полости рта человека чрезвычайно разнообразна и в норме представлена несколькими сотнями видов микроорганизмов. При заболеваниях пародонта, как правило, изменяется количественное соотношение микробов, а их видовой состав остается постоянным. Это обстоятельство позволяет предполагать, что причиной заболеваний тканей полости рта является не собственно бактериальная инфекция, а нарушение адекватного взаимодействия макроорганизма с микрофлорой. В связи с этим у исследователей особый интерес вызывает изучение защитных систем ротовой полости. Антимикробные пептиды обеспечивают первую линию защиты тканей полости рта от внедрения патогенов. В ротовой полости обнаружено несколько групп антимикробных пептидов, имеющих разное происхождение и проявляющих активность против бактерий, грибов и вирусов, а также обладающих свойствами иммуномодуляторов и хемоаттрактантов. Антимикробные пептиды играют важнейшую роль для поддержания здоровья в полости рта. Показано, что нарушение их синтеза коррелирует с развитием пародонтита и множественного кариеса зубов.

¹ Старший преподаватель, Андижанский государственный медицинский институт

² PhD, доцент, Андижанский государственный медицинский институт

³ Студент 4-го курса лечебного факультета



ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель исследования заключалась в изучении биохимических констант АМП и их применение для диагностики и лечения заболеваний полости рта.

Задачами исследования явились:

1. Провести биохимический анализ АМП (антимикробных пептидов)
2. Определить их роль при заболеваниях полости рта.
3. Создание диагностических и лечебных алгоритмов полости рта антимикробных пептидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Волонтерская работа проводилась в техникуме общественного здоровья имени Абу Али ибн Сины и в школе-интернат №13. Работа была направлена на определение функционирования биохимических свойств и особенностей АМП. В вышесказанных учреждениях были отобраны 72 учащихся в возрастном интервале с 15 до 20 лет, среди них мальчиков – 35, а девочек – 37. В течение 2-х месяцев была проведена масштабная работа по определению биохимических свойств АМП и выявлению их особых черт.

В процессе исследования были собраны истории болезни каждого учащегося. Каждую неделю проводились плановые осмотры, опрос и сбор анамнеза исследуемых, были взяты во внимание их режим и тип питания, условия жизни. При сборе информации нам помогали опросники для учащихся, с помощью которых они смогли выразить ответ в полном его объёме, что в свою очередь помогло нам правильно ориентироваться в их результатах. В неделю 3 раза проводилось бактериальное исследование мазков со слизистой оболочки ротовой полости, где определялась возможность и уровень функционирования биохимических свойств АМП.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В полости рта обнаружены следующие виды АМП: гистатины, аденомедуллин человека, источниками которых являются слизистая оболочка ротовой полости, слюнные железы и нейтрофилы. В ротовой полости АМП не только уничтожают патогенные микроорганизмы, но и участвуют в поддержании нормальной микрофлоры. Наибольшее количество АМП вырабатывается именно в слизистой оболочке полости рта, поскольку эпителий активно реагирует на сигналы из окружающей среды, на инфекцию, интегрируя врожденные и приобретенные иммунные реакции. Выделяемые слизистой оболочкой β -дефензины, аденомедуллин, а также антимикробный белок кальпротектин дополняют защитную функцию антимикробных факторов слюнных желез, лизоцима и иммуноглобулинов.

Гистатины (Hsts) — катионные пептиды слюны, одной из функций которых является защита от патогенных грибов. Гистатины получили свое название благодаря наличию остатков гистидина и могут быть названы «пептиды, богатые гистидином». Гистатины секретируются околоушными и поднижнечелюстными железами. Семейство гистатинов включает 12 пептидов длиной от 7 до 38 аминокислот, из которых Hst-1 и Hst-3 являются отдельными полноразмерными пептидами, закодированными в различных рядом расположенных генах. Остальные представители семейства имеют меньший размер и получают путем частичного протеолиза из Hst-1 и Hst-3. Под действием протеиназ слюны Hst-2 образуется из Hst-3 и Hst-



1, а остальные гистатины Hst-4-12 — из Hst-3. В наиболее высокой концентрации в слюне обнаружен Hst-5. Гистатины активны против патогенных дрожжевых и нитчатых грибов, в том числе и резистентных к азолам и полиеновым антимикотикам. Антибактериальные свойства гистатинов выражены значительно слабее, чем противогрибковые. Наиболее подробно изученный Hst-5 обладает высокой активностью в отношении дрожжевого гриба *C. albicans*, который является представителем нормальной микрофлоры полости рта, но может вызывать поражение слизистой оболочки полости рта у иммунодефицитных пациентов. Hst-5 предотвращает переход бластоспор *C. albicans* в стадию псевдогиф, что защищает ткани от проникновения гриба. Уровень гистатинов у пациентов с рецидивирующим кандидозом полости рта повышен по сравнению со здоровыми добровольцами, что, по-видимому, предотвращает развитие инвазивных форм грибковой инфекции. Снижение уровня синтеза гистатинов с возрастом коррелирует с увеличением частоты грибковых инфекций полости рта. Одной из причин развития грибковых инфекций полости рта у больных ксеростомией может быть именно недостаточность гистатинов. Особая роль гистатинов в предотвращении кандидоза полости рта недавно была продемонстрирована в работах S. Khan и соавт., которые показали, что у ВИЧ-инфицированных пациентов со сниженным уровнем Hst-5 в слюне наблюдается массивное размножение *C. albicans* на слизистой оболочке ротовой полости. Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что гистатины поддерживают рост *C. albicans* и другой грибковой микрофлоры полости рта на определенном физиологическом уровне. Несмотря на детальные исследования, механизм антимикробного действия гистатинов до сих пор до конца не изучен. Ясно только, что Hst-5 имеет несколько внутриклеточных мишеней и механизмов действия. При обработке культуры *C. albicans* Hst-5 гибель микроорганизма наступает в результате осмотического дисбаланса из-за потери ионов калия. В водном растворе гистатин-5 образует беспорядочный клубок, но формирует α -спираль в липидном бислое мембран. Ранее считалось, что действие Hst-5 реализуется через образование пор и нарушение проницаемости биологической мембраны, но последующие исследования показали, что данный механизм не объясняет антигрибковую активность этого гистатина в физиологических условиях. Однако можно предположить, что при высоких концентрациях в эксперименте или при использовании гистатинов в качестве лекарственных средств их действие будет приводить к нарушению барьерной функции биологических мембран микроорганизмов. Показано, что Hst-5 может проникать в клетку *C. albicans* тремя различными путями: простой или облегченной диффузией с помощью мембранного транспортера, а также эндоцитозом. Тот или иной способ транспорта зависит, по-видимому, от концентрации Hst-5. Возможно, что и формирование α -спирали в двойном слое липидов мембран способствует проникновению гистатина в клетку. Многочисленные исследования показали, что действие Hst-5 на клетки *C. albicans* приводит к выходу из них макроэргического аденозинтрифосфата (АТФ). Предполагается, что гибель клеток гриба происходит не только из-за потери АТФ, но и благодаря особому механизму клеточной сигнализации. Высвободившиеся молекулы АТФ, вероятно, взаимодействуют с определенными рецепторами на внешней клеточной мембране, что запускает каскад реакций, приводящий к гибели клеток. Основной мишенью для Hst-5 в клетке гриба являются митохондрии. В митохондриях клеток *C. albicans*, обработанных Hst-5, наблюдается изменение в составе ферментов дыхательной цепи и цикла трикарбоновых кислот. Считается, что один из механизмов действия Hst-5 связан с окислительным стрессом, который обусловлен нарушением функций митохондрий. Вследствие окислительного стресса происходит



нарушение функций других клеточных компонентов. Также показано нарушение клеточного цикла *C. albicans* под влиянием Hst-5, которое коррелирует с потерей объема клеток. В последнее время появились доказательства, что возможным механизмом действия гистатинов является конкурирование с патогенами за ионы железа, меди, цинка и других металлов. Данная гипотеза согласуется с предыдущими исследованиями, которые показали, что комплексы Hst-5 с металлами могут усиливать окислительный стресс. Кроме того, связывание ионов железа и меди внутри клетки может нарушать работу митохондрий, так как ионы этих металлов входят в состав белковых комплексов дыхательной цепи. В любом случае изменение количества ионов металлов может пагубно влиять на жизнедеятельность клеток *C. albicans*. Гистатины участвуют в формировании защитной пелликулы на поверхности зубов, что предотвращает развитие зубного налета и препятствует деминерализации эмали. Недавние эксперименты М. Oudhoff и соавт. показали, что гистатины 1 и 2 стимулируют миграцию эпителиальных клеток, что, по-видимому, способствует заживлению ран в ротовой полости. На основании изучения влияния замены аминокислотных остатков на свойства Hst-5 были синтезированы два антимикробных пептида, обладающие очень высокой антимикробной активностью, однако их клиническое применение оказалось невозможным из-за гемолитической активности *in vivo*. Адреномедуллин относится к регуляторным пептидам широкого спектра действия. Впервые адреномедуллин был выделен К. Kitamura и соавт. из клеток феохромоцитомы, и свое название получил, так как был обнаружен среди пептидов мозгового вещества надпочечников. Сейчас известно, что адреномедуллин синтезируется клетками печени, почек, эпителия кожи, кишечника, полости рта. Нарушения его синтеза были обнаружены при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, печени, почек, гестозе второй половины беременности (преэклампсия).

Адреномедуллин состоит из 52 аминокислотных остатков. Синтез адреномедуллина происходит путем частичного протеолиза из более крупного предшественника преадреномедуллина. На С-конце пептидного остова имеется остаток амидированного тирозина. Адреномедуллин имеет области гомологии с кальцитонином, поэтому его относят к кальцитониновому семейству. В клетках полости рта адреномедуллин экспрессируется постоянно, а под воздействием бактериальных липополисахаридов, ИЛ-1 и ТФР- α , его синтез возрастает. В полости рта адреномедуллин подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, но не обладает антигрибковой и противовирусной активностью. Показана его высокая активность в отношении возбудителя пародонтита *P. gingivalis*. Кроме антимикробного действия адреномедуллин существенно влияет на гемодинамику, вызывая расширение периферических кровеносных сосудов. Кроме того, адреномедуллин участвует в эндокринной регуляции: тормозит выделение АКТГ из гипофиза, воздействует на секреторную активность коры надпочечников, а также секрецию инсулина. Механизм антимикробного действия адреномедуллина точно не известен, но есть предположение, что он, как и большинство АМП, нарушает барьерную функцию биологических мембран

ВЫВОД

В связи с тем, что АМП полости рта разнообразны и действуют на микроорганизмы очень быстро, вероятность развития резистентности к ним достаточно мала. Это позволяет надеяться, что АМП могут использоваться для получения антимикробных препаратов, устойчивость к которым развивается очень медленно. Поэтому предлагается применение



АМП, обладающих антивирусной и противогрибковой активностью, у лиц с ослабленным иммунитетом, в том числе, больных СПИДом, для профилактики и лечения кандидозов и герпетических гингивостоматитов.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. Inomata M, Into T, Murakami Y. Suppressive effect of the antimicrobial peptide Il-37 on expression of il-6, il-8 and cxcl10 induced by porphyromonas gingivalis cells and extracts in human gingival fibroblasts. *European Journal of Oral Sciences*. 2010;118(6):574-581. doi:10.1111/j.1600-0722.2010.00775.x.
2. Wu WKK, Wang G, Coffelt SB, Betancourt AM, Lee CW, Fan D, Wu K, Yu J, Sung JJY, Cho CH. Emerging roles of the host defense peptide Il-37 in human cancer and its potential therapeutic applications. *International Journal of Cancer*. 2010;127(8):1741-1747. doi:10.1002/ijc.25489.
3. Bucki R, Namiot DB, Namiot Z, Savage PB, Janmey PA. Salivary mucins inhibit antibacterial activity of the cathelicidin-derived Il-37 peptide but not the cationic steroid csa-13. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(2):329-325. doi:10.1093/jac/dkn176.
4. Campese M, Sun X, Bosch JA, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ. Concentration and fate of histatins and acidic proline-rich proteins in the oral environment. *Arch. Oral Biol*. 2009;54(4):345-353. doi:10.1016/j.archoralbio.2008.11.010.
5. Kavanagh K, Dowd S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2004;56(3):285-289. doi:10.1211/0022357022971.
6. Khan SA, Fidel PL Jr, Thunayyan AA, Varlotta S, Meiller TF, Jabra-Rizk MA. Impaired Histatin-5 Levels and Salivary Antimicrobial Activity against in HIV Infected Individuals. *Journal of AIDS & Clinical Research*. 2013;4(2):123-128. doi:10.4172/2155-6113.1000193.
7. Puri S, Edgerton M. How does it kill?: understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5. *Eukaryotic Cell*. 2014;13(8):958-964. doi:10.1128/ec.00095-14.
8. Oudhoff MJ, Blaauboer ME, Nazmi K, Scheres N, Bolscher JG, Veerman EC. The role of salivary histatin and the human cathelicidin LL-37 in wound healing and innate immunity. *Biological Chemistry*. 2010;391(5):541-548. doi:10.1515/bc.2010.057.
9. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1993;192(2):553-560. doi:10.1016/j.bbrc.2012.08.022.
10. Hart TC, Hart PS, Michalec MD, Zhang Y, Firatli E, Van Dyke TE, Stabholz A, Zlotogorski A, Shapira L, Soskolne WA. Haim-munk syndrome and papillon-lefevre syndrome are allelic mutations in cathepsin c. *Journal of Medical Genetics*. 2000;37(2):88-94. doi:10.1136/jmg.37.2.88.
11. Shoxabbos, S., & Mahramovich, K. S. M. K. S. (2023). CAUSES OF THE ORIGIN OF CARDIOVASCULAR DISEASES AND THEIR PROTECTION. *IQRO JURNALI*, 1-6.
12. Maxmudovich, A. X., Raximberdiyevich, R. R., & Nozimjon o'g'li, S. S. (2021). Oshqozon Ichak Traktidagi Immunitet Tizimi. *TA'LIM VA RIVOJLANISH TAHLILI ONLAYN ILMIY JURNALI*, 1(5), 83-92.
13. Maxmudovich, A. X., Raximberdiyevich, R. R., & Nozimjon o'g'li, S. S. (2021). Oshqozon Ichak Traktidagi Immunitet Tizimi. *TA'LIM VA RIVOJLANISH TAHLILI ONLAYN ILMIY JURNALI*, 1(5), 83-92.



14. Shoxabbos, S., & Mahramovich, K. S. M. K. S. (2023). CAUSES OF THE ORIGIN OF CARDIOVASCULAR DISEASES AND THEIR PROTECTION. *IQRO JURNALI*, 1-6.
15. Salomov, S. N. O. G. L., Aliyev, H. M., & Dalimova, M. M. (2022). RECONSTRUCTIVE RHINOPLASTY METHOD WITH EXTERNAL NOSE DEFORMATION AFTER UNILATERAL PRIMARY CHEILOPLASTY. *Central Asian Research Journal for Interdisciplinary Studies (CARJIS)*, 2(10), 87-90. Nozimjon o'g'li, S. S., & Makhmudovich, A. H. (2023). NUTRITION RECOMMENDATIONS FOR CARDIAC PATHOLOGIES. *IQRO*, 1(1), 3-6.
16. Nozimjon o'g'li, S. S. (2022). First Aid Medication and Remedies for Heart Failure. *Academia Open*, 7, 10-21070.
17. Nozimjon o'g'li, S. S. (2022). Emergency medical care in case of drowning and measures to restore the patient's health. *Academia open*, 7, 10-21070.
18. Nozimjon o'g'li, S. S. (2022). INFORMATION ABOUT THE STRUCTURE OF THE MEMBRANE OF EPITHELIAL TISSUE AND GLANDS. *British Journal of Global Ecology and Sustainable Development*, 10, 65-69.
19. Nozimjon O'g'li, S. S. (2022). CAUSES OF THE ORIGIN OF OSTEOCHONDROSIS, SYMPTOMS, DIAGNOSIS AND TREATMENT METHODS. *Conferentia*, 76-77.

