

На правах рукописи

КОПЕЙКИН
Павел Максимович

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ АНТИМИКРОБНОГО И
ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИРОДНОГО ПЕПТИДА
КАТЕЛИЦИДИНА ChVac3.4 И ЕГО СТРУКТУРНЫХ МОДИФИКАЦИЙ**

3.3.3. Патологическая физиология

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»)

Научные руководители:

Шамова Ольга Валерьевна — доктор биологических наук, доцент, член-корреспондент РАН.

Жаркова Мария Сергеевна — кандидат биологических наук.

Официальные оппоненты:

Линькова Наталья Сергеевна — доктор биологических наук, заведующая лабораторией молекулярных механизмов старения отдела биogerонтологии Автономной научной некоммерческой организации высшего образования Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

Антонов Виктор Георгиевич — доктор медицинских наук, доцент кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится: «___»_____2021 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12, и на сайте: <http://iemsppb.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «___»_____2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Алешина Галина Матвеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Одним из серьёзных вызовов для современной медицины остаётся развитие *резистентности* к применяемым лекарственным препаратам [Batoni et al., 2021; Ventola, 2015]. Эта проблема остро стоит в терапии не только инфекционных, но и опухолевых заболеваний [Chatterjee et al., 2014; Deslouches & Di, 2017], и обеспечивает неугасающий интерес к *поиску новых возможностей коррекции данных патологий*. Подобные разработки являются одними из основных прикладных направлений патофизиологии и биохимии.

В создании новых методов и средств лечения исследователи, как правило, опираются на существующие в природе вещества и механизмы. Система врождённого иммунитета животных, обеспечивающая быстрый первичный ответ при обнаружении неблагоприятных факторов, является многообещающим источником как новых возможных мишеней регуляции, так и эффекторных веществ для непосредственной элиминации патогенов. К последним относятся, в частности, *антимикробные пептиды* (АМП) [Batoni et al., 2021; Mookherjee et al., 2020; Riera Romo et al., 2016; Zanetti, 2005]. Эти соединения рассматривают как перспективный базис для создания новых классов антибиотиков: они демонстрируют высокую антимикробную активность, в том числе в отношении антибиотикоустойчивых бактерий, формирующих биоплёнки, а также иммуномодулирующие эффекты [Dijksteel et al., 2021; Koo & Seo, 2019; Mookherjee et al., 2020]. Некоторые АМП, кроме этого, обладают и выраженной цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток [Balandin et al., 2016; Deslouches & Di, 2017; Tornesello et al., 2020]. Препараты с двойным — противомикробным и противоопухолевым — действием представляют значительный интерес, поскольку смертность от онкологических заболеваний во многих случаях обусловлена возникновением хронических инфекций, и наоборот, пациенты, страдающие хроническими инфекциями и иммунодефицитами более подвержены онкологическим заболеваниям [Felício et al., 2017; Otvos, 2018]. Считается, что АМП могут стать прототипами таких терапевтических средств с двойным эффектом.

Тем не менее вопросы недостаточной селективности в отношении микроорганизмов или малигнизированных клеток человека по сравнению с нормальными и, соответственно, ширины терапевтического окна; стабильности, способа доставки и фармакокинетики; цены производства и другие факторы препятствуют практическому применению большинства природных АМП в их исходной форме [Koo & Seo, 2019; Mookherjee et al., 2020; Tornesello et al., 2020]. В этой связи, *актуальной областью биомедицинских исследований* является поиск возможностей направленной модификации структур АМП для создания оптимизированных по данным параметрам синтетических аналогов. Кроме того, исследование активности отдельных фрагментов или модификаций с определёнными заменами является эффективным и широко применяемым методом анализа взаимосвязи структуры и функции биологически активных соединений, что в случае АМП служит дополнению имеющихся представлений о механизмах функционирования эффекторных молекул врожденного иммунитета в целом.

В данной работе объектом подобного анализа стал кателицидин ChVac3.4.

Степень разработанности. АМП отличаются высокой вариативностью структуры и активности [Кокряков В.Н., 1999; Huan et al., 2020]. У позвоночных животных кателицидины являются наиболее гетерогенным семейством АМП в этом отношении. Одна из необычных групп среди них — пептиды с высоким содержанием остатков пролина [Gennaro et al., 2002; Graf et al., 2017; Graf & Wilson, 2019]. Известно, что богатые пролином последовательности часто вовлекаются в различные белок-белковые или белок-пептидные взаимодействия; лиганды ряда белковых

доменов включают определённые пролин-содержащие паттерны [Kay et al., 2000; Srinivasan & Dunker, 2012]. Обогащённые пролином пептиды демонстрируют отличный от большинства других структурных классов АМП механизм действия, не включающий нарушение целостности бактериальных мембран. Показано, что в низких концентрациях они преимущественно реализуют свой микробоцидный эффект через внутриклеточные мишени: нарушают процессы синтеза и фолдинга белка [Gennaro et al., 2002; Graf et al., 2017; Graf & Wilson, 2019]. Также установлено, что такие АМП могут проникать в клетки грамотрицательных бактерий без повреждения мембран, задействуя ряд специфических транспортеров [Graf & Wilson, 2019; Krizsan et al., 2015; Mattiuzzo et al., 2007]. Большинство богатых пролином АМП характеризуется высокой активностью преимущественно против грамотрицательных бактерий и крайне незначительной токсичностью в отношении эукариотических клеток, что делает их особенно привлекательными для практических разработок [Graf & Wilson, 2019; Huan et al., 2020].

Пептид ChVac3.4, выделенный ранее из лейкоцитов домашней козы сотрудниками отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», несмотря на явную принадлежность к данному классу, демонстрирует ряд нетипичных особенностей: более широкий спектр активности, в том числе и против грамположительных штаммов бактерий, мембранолитические эффекты в концентрациях порядка минимальной ингибирующей рост микроорганизмов, а также цитоцидную активность против нескольких культивируемых линий опухолевых клеток, в частности устойчивой к доксорубину линии клеток K562 (эритромиелоидная лейкемия человека) [Shamova et al., 2009].

Для расширения представлений о биологическом потенциале АМП с высоким содержанием пролина и их возможных модификациях представляло интерес провести более глубокий структурно-функциональный анализ ChVac3.4, которому и посвящена данная работа. Кроме того, упоминавшиеся ранее АМП с выявленной противоопухолевой активностью, такие как цекропины, магейнины, мелитгин, буфорин II, лактоферрицин В, α -дефенсины человека HNP-1-3, гомезин, тахиплезины другие [Balandin et al., 2016; Deslouches & Di, 2017; Tornesello et al., 2020], относятся к структурным классам α -спиральных и β -складчатых пептидов, тогда как возможности линейных пептидов с высоким содержанием пролина в данной области остаются практически неисследованными.

Целью настоящего исследования являлся поиск подходов для создания новых антибиотических средств-корректоров патологии на основе природного пептида семейства кателицидинов — бактенецина ChVac3.4 — путем анализа биологической активности синтетических структурных аналогов данного пептида в отношении микроорганизмов и клеток человека *in vitro*, и на экспериментальной модели опухолевого роста *in vivo*, а также изучения молекулярных механизмов его антибиотического действия, для установления взаимосвязи структурных элементов пептида с проявляемыми эффектами и определения путей оптимизации его биологических свойств.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Осуществить молекулярный дизайн и последующий химический синтез структурных аналогов кателицидина ChVac3.4, с учётом особенностей его первичной структуры, а также литературных данных о свойствах других пролин-богатых пептидов, и предположительного двойственного механизма антимикробного действия, включающего внутриклеточные мишени.

2. Провести сравнительный анализ показателей и спектра антимикробной активности синтезированных аналогов и исходного природного пептида в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, в том числе устойчивых к

антибиотикам.

3. Оценить вклад мембранолитического действия на бактериальные мембраны, свойственного исходному пептиду, в реализацию антимикробного действия его синтезированных аналогов.

4. Для наиболее перспективных аналогов пептида по показателям антибактериальной активности и селективности в отношении бактерий по сравнению с клетками эукариот исследовать способность подавлять формирование бактериальных биоплёнок, а также возможность синергетического усиления действия в комбинациях с антибиотиками в отношении антибиотикорезистентных штаммов бактерий.

5. Изучить цитотоксическое действие пептида ChVac3.4 и его аналогов в отношении нормальных и опухолевых клеток человека *in vitro*, в том числе гемолитическую активность.

6. Для аналогов пептида кателицидина ChVac3.4, наиболее перспективных по величине активности и селективности в отношении опухолевых клеток, определить характер индуцируемой пептидами клеточной гибели и оценить противоопухолевое действие в модели *in vivo*.

Научная новизна. Впервые проведён сравнительный анализ антимикробной и противоопухолевой активности структурных модификаций кателицидина ChVac3.4, исследованы особенности его молекулы, обуславливающие проявление определенных биологических свойств пептида. Показано, какой вклад вносят физико-химические характеристики, такие как заряд и гидрофобность, в проявление антимикробных свойств и общей токсичности пептида. Впервые получены доказательства наличия у аналогов данного пептида наряду с мембранолитическим действием также взаимодействия с внутриклеточными мишенями. Определена ключевая роль *N*-концевого фрагмента в реализации антимикробного эффекта. Установлено, что при укорочении данного участка у ChVac3.4 в первую очередь утрачивается активность против грамположительных бактерий. Впервые показано, что одним из путей повышения активности укороченных форм бактенецинов является удвоение *N*-концевого RFR-триплета аминокислот, что позволяет существенно сократить длину пептида с усилением антибактериального действия против широкого спектра микроорганизмов, в том числе грамположительных. Впервые исследована противобиоплёночная активность аналогов бактенецина ChVac3.4 и установлена возможность усиления их противомикробной активности в комбинации с антибиотиками в отношении мультирезистентных бактериальных штаммов. Впервые выявлен ряд структурных участков, влияющих на проявление цитотоксических эффектов ChVac3.4, дополнены представления о характере реализации его противоопухолевого действия *in vitro* и впервые продемонстрирована эффективность (на примере одного из синтетических аналогов) в *in vivo* модели опухолевого роста. Впервые установлено, что определённое сочетание выявленных структурных детерминант способно повысить селективность цитотоксического действия пептида в отношении опухолевых клеток в сравнении с нормальными без индукции гемолитических свойств.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость заключается в том, что исследование структурно-функциональной активности богатого пролином пептида ChVac3.4 из семейства бактенецинов, проведённое в данной работе путём анализа антимикробных, цитотоксических и, в частности, противоопухолевых свойств набора его синтетических аналогов, вносит вклад в развитие существующих в области патофизиологии и биохимии представлений о молекулярных механизмах реализации эффектов подобных пептидов, являющихся важными защитными факторами системы врожденного иммунитета, на бактериальные и эукариотические клетки. Кроме того, теоретическая значимость

заключается в том, что полученные данные подтверждают предположения о двойственном механизме действия ChBac3.4, сочетающем мембранолитическую активность, существенно более высокую, чем у описанных в литературе пролин-богатых АМП, и взаимодействие с внутриклеточными мишенями. Также подтверждены общие закономерности влияния таких физико-химических факторов, как заряд и гидрофобность, на биологическую активность ChBac3.4. Практическая значимость работы заключается в том, что выявлены новые специфические элементы в структуре пептида, модулирующие преимущественно тот или иной вид активности. Выявленные в ходе работы пути оптимизации свойств и повышения селективности актуальны для создания отечественных инновационных, патентоспособных лекарственных препаратов на основе АМП для использования в клинической практике. Получено два структурных аналога бактенецина ChBac3.4, с оптимизированными для практического применения свойствами — пептид RFR-ChBac3.4(1-14)-NH₂, который может рассматриваться, как перспективный прототип антимикробного препарата, и пептид ChBac3.4-1-COOH — прототип противоопухолевого препарата (данный пептид стал предметом для патентования — подана заявка на патент РФ на изобретение).

Методология и методы исследования. В работе использована комбинация патофизиологических, биохимических, микробиологических и морфологических методов исследования, методов пептидного химического синтеза, а также моделей, широко применяемых в настоящее время в сфере исследования антимикробной и противоопухолевой активности различных соединений, в том числе АМП, что позволяет сравнить полученные результаты с информацией из литературных источников относительно других пептидов и антимикробных препаратов. Статистическая обработка осуществлена согласно рекомендуемым методам, адекватным типу, характеру распределения и объёму полученных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. *N*-концевая область ChBac3.4 играет критическую роль в реализации антимикробных свойств. Укорочение этого участка ведёт к постепенному снижению антимикробной активности, причем эффекты против грамположительных бактерий, нехарактерные для других бактенецинов, утрачиваются первыми. *N*-концевые фрагменты имеют слабовыраженные цитотоксические свойства в отношении эукариотических клеток, что делает использование укороченных *N*-концевых участков пептида перспективной стратегией повышения селективности его противомикробного действия.

2. Отсутствие взаимосвязи между мембранолитической активностью и эффективностью антимикробного действия различных модификаций ChBac3.4 подтверждает наличие у него внутриклеточных мишеней.

3. Удвоение лидирующего аминокислотного триплета RFR у *N*-концевого фрагмента ChBac3.4(1-14), имеющего относительно низкую антимикробную активность, восстанавливает и даже повышает активность этого пептида в сравнении с исходным бактенецином, в том числе против грамположительных бактерий. Слабо выраженный эффект модифицированного пептида RFR-ChBac3.4(1-14) на барьерную функцию цитоплазматической мембраны бактерий указывает, что восстановление активности идёт по немембранолитическому механизму. Данный пептид имеет повышенную селективность в отношении микроорганизмов и сохраняет способность усиливать действие антибиотиков против резистентных штаммов бактерий.

4. ChBac3.4 обладает высокой активностью в отношении формирующихся биоплёнок, тогда как короткоцепочечный пептид RFR-ChBac3.4(1-14) сохраняет возможность частично ингибировать их формирование в субмикробоцидных

концентрациях, но по способности полного ингибирования заметно уступает оригинальному пептиду, что позволяет предположить значимую роль С-концевого участка пептида для реализации противобиоплёночных эффектов и мембранолитической активности.

5. С-концевое амидирование, а также наличие содержащего гистидин участка 12-18, не характерного для описанных в литературе бактенецинов, не оказывают значительного влияния на величину антимикробной активности, однако вносят значительный вклад в проявление цитотоксического эффекта против эукариотических клеток. Комбинация этих параметров — отсутствия С-концевого амидирования с удвоением участка 12–18 — в модификации ChVac3.4-1-COON позволяет повысить селективность токсического действия пептида в отношении опухолевых клеток без усиления гемолитических свойств. Противоопухолевый эффект пептида подтверждается *in vivo* на модели опухолевого процесса у мышей (асцитная карцинома Эрлиха).

Личный вклад диссертанта заключался в самостоятельном планировании и проведении исследований; обработке, анализе, интерпретации экспериментальных и литературных данных; формулировании выводов; активном участии в написании статей и тезисов по теме работы, либо подготовке числовых, табличных и иллюстративных материалов для них.

Степень достоверности и апробация результатов. Апробация диссертации прошла на научном заседании отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (СПб, РФ). Результаты отдельных этапов и основные положения в ходе работы были представлены на всероссийских и международных конференциях, в том числе Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 120-летию со дня рождения академика А. А. Смородинцева (2021 г.), XII Ежегодном Всероссийском интернет-конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (2020 г.), VII Международном симпозиуме «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (2019 г.), VI Международном симпозиуме «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (2017 г.), III Всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (2016 г.) и других.

По материалам исследования издана 21 работа, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ и 17 тезисов в материалах конференций.

Достоверность полученных результатов и аккуратность выводов обеспечены выбором адекватных, современных и широко применяемых в данной области исследования методов и корректной статистической обработкой полученных данных и подтверждены успешным представлением на тематических конференциях и публикацией в рецензируемых научных изданиях.

Объём диссертации составляет 186 страниц; она иллюстрирована 9 таблицами и 21 рисунком и включает стандартные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, его результаты, их обсуждение, заключение и выводы, а также список литературы из 400 наименований, среди которых 378 источника англоязычные и 22 русскоязычные.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пептиды синтезировали методом *твердофазного химического синтеза* на 2-хлортритилхлоридной смоле по стандартному протоколу с использованием Fmoc/tBu-стратегии, очищали методом обратнo-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) и высушивали на вакуумной роторной сушке Speed Vak (Savant, США). Степень очистки и соответствие синтезированных

пептидов заданным аминокислотным последовательностям оценивали методами аналитической ОФ ВЭЖХ и MALDI TOF масс-спектрометрии.

Бактериальные штаммы. Тестирование противомикробных свойств проводили в отношении лабораторных штаммов (*Escherichia coli* ML-35p, штаммом MRSA (methicillin-resistant [метициллин-устойчивый] *Staphylococcus aureus*) ATCC 33591 и *Staphylococcus aureus* SG-511) и клинических изолятов бактерий (*Acinetobacter baumannii* 7226/16, *Pseudomonas aeruginosa* MDR 522/17, *Klebsiella pneumoniae* ESBL 344/17, *Staphylococcus aureus* 1399/17, *Escherichia coli* ESBL 521/17), обладающих множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам.

Эукариотические клетки. Использовали клеточные линии эритромиелоидной лейкемии (K562) и гистиоцитарной лимфомы (U937) человека, а также нормальные эритроциты и мононуклеары человека, выделяемые из периферической крови.

Исследование биологической активности пептидов. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) пептидов **в отношении планктонных бактерий** определяли методом серийных разведений в жидких питательных средах, содержащих микроорганизмы в модификации для АМП [Tossi et al., 1997] — с предынкубацией планшетов с 0,1% бычим сывороточным альбумином для снижения неспецифического связывания катионных пептидов со стенками. Тест проводили в 2,1% бульоне Мюллера–Хинтон/0,01 М натрий фосфатном буфере (pH 7,4) (1:1) с начальной концентрацией бактерий $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. В качестве интегрального параметра, характеризующего активность против всего тестового набора микроорганизмов в целом, использовали среднее геометрическое всех измеренных МИК (ГМИК) [Davies, 1990]. Количественную оценку **биоплёнок**, формирующихся в присутствии субингибирующих концентраций пептида (на стенках лунок) проводили в сходных условиях после 24 ч инкубации, путём окрашивания 0,1 % водным раствором кристаллического фиолетового по стандартному протоколу [Merritt et al., 2005] с перерастворением связавшегося с биоплёнкой красителя 30% уксусной кислотой и колориметрической оценкой его концентрации при длине волны 595 нм. Влияние пептидов на **проницаемость наружной и внутренней бактериальных мембран** оценивали по предложенной Lehrer et al. [1988] методике с использованием штамма *E. coli* ML-35p, не имеющего лактопермеаз, но конститутивно синтезирующего цитоплазматическую β -галактозидазу и периплазматическую β -лактамазу, и хромогенных маркеров — субстратов данных ферментов, не способных проникать через неповреждённые мембраны. В качестве маркеров использовали нитроцефин (для наружной мембраны и β -лактамазы) и о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ONPG; для внутренней мембраны и β -галактозидазы); накопление цветных продуктов их расщепления регистрировали спектрофотометрически при длинах волн 486 и 420 нм, соответственно [Артамонов А.Ю. и др., 2008; Орлов Д.С. и др., 2015]. Состав экспериментальных проб включал тестируемый пептид в концентрации $2 \times \text{МИК}$, маркер (нитроцефин в концентрации 20 мкМ или ONPG в концентрации 2,5 мМ), 0,01 М натрий фосфатный буфер (pH 7,4; 150 мМ NaCl), и бактерию ($2,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл). Измерения производили 1 раз/мин при перемешивании и поддержании температуры 37°C. Для анализа **сочетанного антимикробного действия** АМП и антибиотиков применяли метод серийных разведений по схеме «шахматной доски» [Hsieh et al., 1993; Orhan et al., 2005], по результатам которого рассчитывали фракционные индексы для сочетаний, полностью подавляющих рост бактерии: $\text{иФИК} = [A]/\text{МИК}_A + [B]/\text{МИК}_B$, где МИК_A , МИК_B — МИК веществ А и В, а [А] и [В] — их фракционные концентрации в сочетании. По минимальному значению иФИК совместное действие расценивали как синергизм, аддитивность, независимое действие или антагонизм (см. табл. 4). Для оценки **цитотоксических эффектов** пептидов в отношении эукариотических клеток *in vitro* проводили **гемолитический тест** с использованием эритроцитов человека [Antibacterial Peptide

Protocols, 1997], а также *МТТ-тест* [Mosmann, 1983] с использованием различных типов эукариотических клеток (нормальных и опухолевых). В первом случае различные концентрации пептидов инкубировали с 2,5% суспензией эритроцитов в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) в течение 30 мин при 37°C, а после осаждали клетки и колориметрически определяли концентрацию гемоглобина в супернатанте при длине волны 540 нм. Во втором случае клетки рассеивали в планшеты по 20 000 на лунку и инкубировали с пептидами 24 ч при 37°C, 5% CO₂ в среде RPMI-1640. За 4 ч до конца инкубации вносили дыхательный маркер МТТ, образующий кристаллы формазана в присутствии живых метаболизирующих клеток. Кристаллы затем растворяли добавлением изопропанола и определяли концентрацию образовавшегося формазана (пропорциональную кол-ву живых клеток) при 540 нм против фонового поглощения при 690 нм. Для более детального *анализа динамики цитотоксического действия* на ранних этапах клетки (1 млн/мл) инкубировали с пептидами при тех же условиях; отбирали образцы через 30, 90 и 180 мин; окрашивали при помощи маркера клеточной гибели трипанового синего и проводили подсчёт доли живых и мёртвых клеток в счётной камере Горяева под световым микроскопом. О *гибели клеток по пути некроза или апоптоза* судили на основании дифференциального метода окраски при помощи коммерческого набора «Annexin V-Cy3 Apoptosis Detection kit» (Sigma, США). Клетки инкубировали с пептидами в аналогичных условиях 2 ч, после чего проводили окраску согласно инструкции производителя и подсчитывали число живых, некротических и апоптотических клеток при помощи люминесцентного микроскопа. *Оценку противоопухолевого действия in vivo* проводили в модели перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) мыши в соответствии с протоколом 1/20 от 27.02.2020, одобренным Этическим комитетом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Животным инокулировали 200 тыс клеток АКЭ подкожно в область холки, введение тестируемых препаратов начинали на следующий день (1 раз в неделю). *Статистическая обработка*. Эксперименты воспроизводили не менее 3 раз, в одном эксперименте использовали несколько параллелей проб. Для усреднения результатов серийных разведений использовали медианы; для величин, рассчитанных на основе показателей оптической плотности (OD), — среднее ± среднее квадратичное отклонение. Экспериментальные и контрольные группы/пробы сравнивали, используя U-критерий Манна–Уитни (p≤0,05). Кривые выживаемости Каплана–Мейера сравнивали при помощи логарифмического рангового критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор модификаций ChVac3.4 для последующего синтеза и анализа биологической активности. Аминокислотная последовательность ChVac3.4 **RFRLPFRRPPI** RINPPPFYPPFRRFL-NH₂, в особенности в N-концевом участке (выделен жирным шрифтом), имеет значительное сходство (66% идентичности) с ChVac5 (**RFRRPPIRRPPI** RPPF NPPF RPPV RPPF RPPF RPPF RPPI GPFP-NH₂); у них обоих также присутствует сигнальная последовательность амидирования на C-концах (GRR). Однако ChVac5 включает восемь повторов вида RPPX или NPPX (обозначены подчёркиванием; X — остаток одной из гидрофобных аминокислот: F, I, V), тогда как ChVac3.4 имеет только один, а C-концевая область молекулы ChVac3.4 начиная с 12-го остатка, в которой в положении 14 присутствует аминокислота гистидин (H), совпадает с соответствующим концевым фрагментом ChVac5 только на 35% (или на 55%, если учитывать GRR).

Чтобы определить, какие структурные особенности бактенецина ChVac3.4 имеют решающее значение для реализации антибактериальной активности или же проявления цитотоксического действия по отношению к клеткам млекопитающих, был разработан и синтезирован набор его структурных аналогов (таблица 1).

Таблица 1. Первичная структура выбранных для исследования модификаций природного кателицидина ChBac3.4

Обозначение	Аминокислотная последовательность ^a	Описание	Заряд ^b
<i>оригинальный пептид</i>			
ChBac3.4-NH ₂	RFRLPFRRP <u>PIR</u> <u>H</u>PPPFYP PFRRFL-NH₂	Аминокислотная последовательность идентична таковой у природного ChBac3.4; C-конец амидирован	+8
<i>варианты, сходные по длине цепи с оригинальным пептидом</i>			
ChBac3.4-COOH	RFRLPFRRP <u>PIR</u> <u>H</u>PPPFYP PFRRFL-COOH	неамидированный по C-концу аналог ChBac3.4	+7
ChBac3.4-1-NH ₂	RFRLPFRR <u>I</u> <u>H</u>PPPFVRI <u>H</u> <u>H</u>PPPFYRRFL-NH₂	Содержит дополнительную копию участка 12-18 (RIHPPPF), наиболее отличного от последовательности ChBac5 с её характерными RPPX повторами, где X=I,F,V	+8
ChBac3.4-1-COOH	RFRLPFRR <u>I</u> <u>H</u>PPPFVRI <u>H</u> <u>H</u>PPPFYRRFL-COOH	неамидированный по C-концу аналог ChBac3.4-1	+7
RFR-ChBac3.4-1-NH ₂	RFR RFRLPFRR <u>I</u> <u>H</u>PPPFVRI <u>H</u> <u>H</u>PPPFYRRFL-NH₂	Версия ChBac3.4-1 с дополнительным триплетом RFR на N-конце молекулы; C-конец амидирован	+10
ChBac3.4-2-COOH	RFRLPFRRP W <u>PIR</u> <u>H</u>PPPFYP W PFRRFL-COOH	Вариант ChBac3.4 со вставкой 2х остатков триптофана в позициях 10 и 22; не амидирован по C-концу	+7
ChBac3.4(H-)	RFRLPFRRP <u>PIR</u> <u>P</u> <u>P</u>PFYP PFRRFL-NH₂	Аналог природного ChBac3.4 с делецией остатка гистидина в положении 14; C-конец амидирован	+8
<i>укороченные фрагменты оригинального пептида</i>			
ChBac3.4 (12-26)	<u>RI</u> <u>H</u>PPPFYP PFRRFL-NH₂	C-концевой фрагмент ChBac3.4 с 12-го по 26-ой аминокислотный остаток; C-конец амидирован	+4
ChBac3.4(1-19)-NH ₂	RFRLPFRRP <u>PIR</u> <u>H</u>PPPFY-NH₂	N-концевой фрагмент ChBac3.4 с 1-го по 19-ый аминокислотный остаток; C-конец амидирован	+6
ChBac3.4(1-14)-NH ₂	RFRLPFRRP <u>PIR</u> <u>H</u>-NH₂	N-концевой фрагмент ChBac3.4 с 1-го по 14-ый аминокислотный остаток; C-конец амидирован	+6
RFR-ChBac3.4 (1-14)-NH ₂	RFR RFRLPFRRP <u>PIR</u> <u>H</u>-NH₂	Вариант ChBac3.4(1-14) с дополнительным триплетом RFR на N-конце молекулы; C-конец амидирован	+8

^a C-концевой участок 12-18 присутствующий в структуре ChBac3.4, но сильно отличный от последовательности ChBac5, выделен подчёркиванием; необычный для бактенецинов остаток гистидина отмечен красным. Дополнительный RFR-триплет, присоединённый в ряде модификаций к N-концу цепи, обозначен зелёным цветом. Остатки триптофана, добавленные в структуру варианта ChBac3.4-2-COOH, выделены синим. Наличие/отсутствием C-концевого амидирования обозначено окончаниями -NH₂ или -COOH, соответственно.

^b Заряд приводится в расчете на pH = 7,4 с учётом амидирования; заряд боковой цепи гистидина полагается нейтральным.

Для изучения роли С-концевого амидирования рассматривали ряд модификаций, отличающихся только наличием или отсутствием амидирования.

Так как для некоторых обогащённых пропином АМП млекопитающих N-концевая область является критически необходимой для успешной реализации противомикробного эффекта [Shi et al., 1996; Skerlavaj et al., 1996; Tokunaga et al., 2001], однако не изучено значение этой области в случае действия пептида на клетки млекопитающих, в набор исследуемых модификаций были включены укороченные N- и С-концевые фрагменты ChBac3.4. На основе данных о значительном влиянии на активность именно первых нескольких аминокислот в N-концевой последовательности у ряда других бактенецинов [Gennaro et al., 2002], было также рассмотрено удвоение начального триплета RFR в качестве возможной стратегии усиления биологических свойств подобных АМП.

Также рассматривали возможную роль остатка гистидина, отсутствующего в структуре других бактенецинов козы. Эта аминокислота способна к образованию различных типов связи (водородных — с участием и основной, и боковой цепи; солевых мостиков; стэкинг-взаимодействию с другими ароматическими аминокислотами) и, соответственно, может вовлекаться в процесс белок- или пептид-белковых взаимодействий [Liao et al., 2013]. Так, рассматривали аналог ChBac3.4 с делецией гистидина из участка RHPFPF (с 12 по 18 аминокислотный остаток) — ChBac3.4(H-), — а также варианты, в которых весь этот участок наоборот был удвоен, — серию ChBac3.4-1. Это также позволило исследовать возможный вклад всего данного участка, наименее гомологичного по своей последовательности ChBac5, в реализацию спектра активности ChBac3.4.

Химический синтез разработанных модифицированных вариантов ChBac3.4 и анализ чистоты полученных препаратов были проведены согласно перечисленным ранее методам. Были успешно получены образцы, характеризующиеся высокой степенью очистки 96–99% (таблица 2).

Таблица 2. Характеристики полученных пептидов

Пептид	Препаративная ОФ ВЭЖХ	Аналитическая ОФ ВЭЖХ		Масс-спектрометрия MALDI TOF	
	Чистота после синтеза, %	Чистота после очистки, %	Время удерживания, мин	Моноизотопическая молекулярная масса, Да	m/z для (M+H) ⁺¹ или (M+2H) ⁺²
ChBac3.4-NH ₂	68,3	98,16	13,63	3373,95	3374,9 (+1)
ChBac3.4-COOH	69,9	96,09	13,86	3374,93	3375,9 (+1)
ChBac3.4-1-NH ₂	74,0	96,06	13,19	3513,02	3513,8 (+1)
ChBac3.4-1-COOH	79,5	96,07	13,46	3514,00	3514,9 (+1) 1758,5 (+2)
RFR-ChBac3.4-1-NH ₂	75,1	99,25	13,37	3972,29	3972,9 (+1)
ChBac3.4-2-COOH	73,6	99,03	14,74	3747,10	3748,1 (+1)
ChBac3.4(H-)	74,2	98,55	13,93	3236,94	3237,9 (+1)
ChBac3.4(12-26)	72,6	96,64	13,79	1938,08	1939,1 (+1)
ChBac3.4(1-19)-NH ₂	75,9	96,07	12,59	2460,43	2461,6 (+1) 1231,8 (+2)
ChBac3.4(1-14)-NH ₂	71,6	97,06	11,45	1859,14	1860,1 (+1)
RFR-ChBac3.4(1-14)-NH ₂	70,3	97,81	11,49	2318,41	2319,4 (+1)

Антимикробная активность в отношении планктонных бактерий.

Результаты измерения МИК и дальнейшего расчёта ГМИК представлены в таблице 3. Усиление антимикробной активности в сравнении с оригинальным ChVac3.4-NH₂ наблюдается лишь для двух рассмотренных аналогов: ChVac3.4(H-), и RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂. Интересно отметить что основная часть модификаций сохраняет несвойственную для большинства пролин-богатых АМП активность в отношении грамположительных бактерий. Колебания индивидуальных МИК между амидированными и неамидированными вариантами пептидов незначительны. Модификации с удвоенным участком с 12 по 18 аминокислотный остаток исходного пептида (ChVac3.4-1-NH₂, ChVac3.4-1-COOH, RFR-ChVac3.4-1-NH₂), так же как и аналог, содержащий дополнительные остатки триптофана (ChVac3.4-2-COOH), демонстрируют незначительное ослабление антибактериального действия против грамотрицательных штаммов бактерий и незначительное его повышение против грамположительных. В первом случае это может указывать на роль фрагмента 12–18 в способности природного ChVac3.4-NH₂ эффективно подавлять рост грамположительных микроорганизмов. С другой стороны, наибольшую активность против грамположительных бактерий демонстрируют модификации, содержащие дополнительный RFR триплет на N-конце пептидной цепи, при этом укороченный пептид RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ содержит лишь остатки 12–14 из фрагмента 12–18 исходной молекулы.

Постепенное укорочение N-концевой части природного ChVac3.4 в первую очередь отражается на его активности против грамположительных бактерий. У наиболее короткого N-концевого фрагмента ChVac3.4(1-14) активность падает по всему спектру, однако добавление дополнительного лидирующего RFR триплета эффективно восстанавливает его антимикробную активность до уровня, сопоставимого с полноразмерным исходным пептидом. Последнее согласуется с литературными данными об анализе зависимости структура-активность, проведенном для бактеницина коровы Vac5 [Gennaro et al., 2002]. C-концевой фрагмент ChVac3.4(12-26), как и ожидалось на основе данных об исследовании бактенецинов коровы Vac5 и Vac7 [Gennaro et al., 2002; Skerlavaj et al., 1996; Tokunaga et al., 2001], является наименее активным из всех рассмотренных вариантов.

Влияние на проницаемость бактериальных мембран было предметом отдельного интереса, поскольку природный пептид ChVac3.4-1-NH₂ в отличие от многих других бактенецинов оказывает заметное повреждающее действие на бактериальные мембраны. Все синтезированные пептиды наносят существенный ущерб внешней мембране грамотрицательной бактерии *E. coli* ML-35p (рис. 1, слева). Несколько сниженную динамику показывают наименее заряженные из показавших антимикробную активность фрагменты пептиды ChVac3.4(1-14) и ChVac3.4(1-19). В то же время эффективен слабо заряженный малоактивный в отношении бактерий C-концевой фрагмент ChVac3.4(12-26).

При нарушении целостности цитоплазматической мембраны (рис. 1, справа). ChVac3.4-2-COOH, ChVac3.4-1-NH₂ и RFR-ChVac3.4-1-NH₂ демонстрируют уровень активности, сходный с природным ChVac3.4-NH₂. Кривые, иллюстрирующие действие фрагментов с наименьшей антимикробной активностью ChVac3.4(12-26) и ChVac3.4(1-14)-NH₂, имеют наименьший угол наклона и в течение двух часов наблюдения так и не приближаются к уровню плато, однако низкая мембранолитическая активность не может быть однозначно связана с более низким суммарным зарядом пептида или низкой антимикробной активностью, так как позже всех повышение уровня проницаемости цитоплазматической мембраны индуцирует пептид RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ с зарядом +8 и антимикробной активностью, не уступающий оригинальному ChVac3.4-NH₂. В то же время кривая, иллюстрирующая действие пептида

Таблица 3. Антимикробная активность ChVac3.4 и его модификаций против грамположительных и грамотрицательных бактерий

Пептиды	МИК ^a (мкМ) против бактерий								ГМИК ^b общее [грам- грам+]
	граммотрицательных:				грамположительных:				
	<i>E. coli</i> ML-35p	<i>A. baumannii</i> 7226/16	<i>K. pneum.</i> ESBL 344/17	<i>P. aeruginosa</i> MDR 522/17	<i>E. coli</i> ESBL 521/17	<i>S. aureus</i> SG-511	MRSA ATCC 33591	<i>S. aureus</i> 1399/17	
ChVac3.4-NH ₂	2	4	4	16	4	0.5	16-32	8	4.6 [4.6 4.6]
ChVac3.4-COOH	2	4-8	4-8	32	4	0.5	32	8-16	6.0 [6.2 5.8]
ChVac3.4-1-NH ₂	4	4	8	32	8	0.25	16	8	5.7 [8.0 3.2]
ChVac3.4-1-COOH	2-4	4	8	16	4-8	0.25	16	8	4.8 [6.2 3.2]
RFR-ChVac3.4-1-NH ₂	4	8	4-8	16	8	0.5	8	4-8	5.3 [7.6 2.9]
ChVac3.4-2-COOH	4	8-16	8	16	4	0.5	8	8	5.5 [7.6 3.2]
ChVac3.4(H-)	4	8	2	8-16	2	0.5	16	4	3.9* [4.3 3.2]
ChVac3.4(12-26)	64	32	64	128	32	8	64-128	32	43.7 [55.7 29.1]
ChVac3.4(1-19)-NH ₂	4	16	8	64	4	4	64	32	13.5 [10.6 20.2]
ChVac3.4(1-14)-NH ₂	8	16	16	64	16	2	16	128	17.4 [18.4 16.0]
RFR-ChVac3.4(1-14)-NH ₂	1	8	8	16	2	0.5	8	4	3.7* [4.6 2.5]

^a Значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) приведены как медианы по результатам 3–6 независимых экспериментов.

^b ГМИК — геометрическое среднее МИК. ГМИК по всем рассмотренным штаммам дано жирным курсивом (*общее*); рассчитанное же по отдельности для грамотрицательных и грамположительных штаммов — приведено в квадратных скобках черным или серым цветом, соответственно. Значения ГМИК, меньшие, чем у оригинального ChVac3.4-NH₂, которые свидетельствуют об усилении антимикробных свойств, отмечены звёздочкой.

ChVac3.4(1-19)-NH₂ с зарядом +6 и более слабым противомикробным эффектом имеет как меньшее время задержки, так и более крутой подъём.

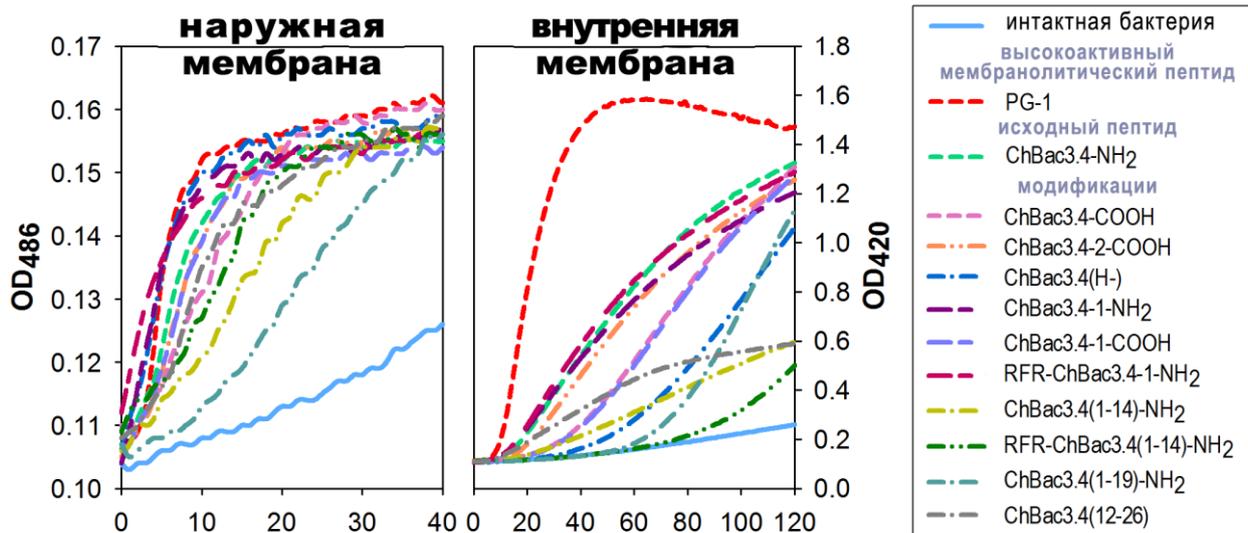


Рисунок 1. Влияние модификаций ChVac3.4 на проницаемость мембран *E.coli* ML-35p. Слева — внешней мембраны для хромогенного маркера нитроцефина; справа — внутренней мембраны для хромогенного маркера *o*-нитрофенил- β -D-галактозида (ONPG).

Интересно, что для ряда модификаций с выраженным антибактериальным действием (неамидированные ChVac3.4-COOH и ChVac3.4-1-COOH; пептид с делецией гистидина ChVac3.4(H-)) инициируемый рост проницаемости цитоплазматической мембраны начинается с заметной задержкой в сравнении с исходным ChVac3.4-NH₂, хотя и характеризуется после этого быстрым прогрессом, чего не наблюдалось при рассмотрении влияния на проницаемость внешней мембраны. Возможно, происходят изменения на таких этапах, как проникновение молекул АМП через пептидогликановый слой (а), их агрегация на поверхности мембраны (б) или переориентация и внедрение в липидный бислой (в). Также нельзя исключать, что в случае более длительных задержек (например, для укороченного RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ или ChVac3.4(1-19)-NH₂) наблюдаемое повреждение мембраны может быть вторичным, т.е. являться побочным эффектом реализации пептидом бактерицидного действия через внутриклеточные мишени.

Ингибирование формирования бактериями биоплёнок *in vitro* модификациями ChVac3.4, имеющими дополнительный N-концевой RFR-триплет было оценено, поскольку данная модификация в случае укороченного пептида ChVac3.4(1-14) показала наиболее выраженный положительный эффект на антимикробную активность в отношении планктонных бактерий. Эффект измеряли в отношении образующих биоплёнку штаммов *P.aer.* MDR 522/17 и *A.baum.* 7226/16.

Как природный ChVac3.4-NH₂, так и сходный с ним по длине аналог RFR-ChVac3.4-1-NH₂ полностью подавляют образование биоплёнок в концентрациях, равных 1–2 \times МИК. Активность укороченного RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ в сравнении с ними снижена: для 100% ингибирования требуется концентрация 4 \times МИК.

RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ вызывает статистически значимое уменьшение плотности образующейся биоплёнки *A.baumannii* лишь в концентрации не менее 2 \times МИК, при этом формирующаяся биоплёнка оказывается на $53 \pm 3\%$ слабее, чем в интактном контроле (U-критерий Манна–Уитни; $p < 0,05$). Нативный ChVac3.4 способен ослаблять рост биоплёнки *A.baumannii* в субмикробцидных концентрациях вплоть до $\frac{1}{16}$ МИК, однако более чем 50% эффект ($56 \pm 12\%$ ингибирования) достигается только в присутствии концентрации равной $\frac{1}{2}$ МИК. RFR-ChVac3.4-1-NH₂ демонстрирует статистически значимое действие в отношении биоплёнки *A.*

baumannii в разведениях до $\frac{1}{4}$ МИК (при этом рост биоплёнки ингибируется на $59 \pm 11\%$, а в присутствии $\frac{1}{2}$ МИК эффект возрастает до $88 \pm 5\%$ ингибирования).

Исходный природный пептид оказывает статистически значимый эффект против биоплёнки, сформированной *P. aeruginosa*, в концентрациях до $\frac{1}{128}$ МИК, а самая низкая концентрация, при которой количественное снижение сформированной биоплёнки в сравнении с интактным контролем составляет более 50%, равняется $\frac{1}{64}$ МИК (ингибирование на $63 \pm 9\%$). RFR-ChVac3.4-1-NH₂ и RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ заметно снижают образование биопленки *P. aeruginosa* даже при более низких концентрациях (вплоть до $\frac{1}{1024}$ МИК для RFR-ChVac3.4-1-NH₂ и до $\frac{1}{512}$ МИК для RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂), однако амплитуда эффекта не достигает 50% ингибирования даже при концентрации, равной $\frac{1}{4}$ МИК. В присутствии же $\frac{1}{2}$ МИК степень ингибирования формирования биоплёнки составляет соответственно $62 \pm 1,5\%$ для RFR-ChVac3.4-1 и $79 \pm 5\%$ для RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂.

Сочетанное действие пептида RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ с антибиотиками в сравнении с исходным ChVac3.4 охарактеризовано в таблице 4.

Таблица 4. Сочетанная антимикробная активность пептида RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ в комбинациях с антибиотиками в отношении антибиотикоустойчивых клинических изолятов бактерий в сравнении с таковой исходного ChVac3.4-NH₂

Минимальные иФИК ^а для сочетаний АМП с антибиотиками в отношении антибиотикоустойчивых клинических изолятов бактерий							
		грамотрицательных:				грамположительной:	
		<i>E. coli</i> ESBL 521/17		<i>A. baumannii</i> 7226/16		<i>S. aureus</i> 1399/17	
анти-биотик	АМП	ChVac3.4 ^б	RFR-ChVac3.4(1-14)	ChVac3.4 ^б	RFR-ChVac3.4(1-14)	ChVac3.4 ^б	RFR-ChVac3.4(1-14)
		оксациллин		1.12	1.12	1.12	1.12
меропенем		1.0	1.12	0.5	0.5 ⁼	0.31	0.62 [!]
эритромицин		0.38	0.38 ⁼	0.75	0.25 [!]	0.5	0.28 ⁺
амикацин		0.62	0.75	0.5	0.19 ⁺	0.125	0.19 ⁻
офлоксацин		0.75	0.56	0.5	0.5 ⁼	0.125	0.5 ⁻
		<i>K. pneumonia</i> ESBL 344/17		<i>P. aeruginosa</i> MDR 522/17		иФИК > 2	
анти-биотик	АМП	ChVac3.4 ^б	RFR-ChVac3.4(1-14)	ChVac3.4 ^б	RFR-ChVac3.4(1-14)	антагонизм; 1 < иФИК ≤ 2	
		оксациллин		1.12	1.12	1.12	1.12
меропенем		1.0	0.75	0.62	0.38 [!]	аддитивность;	
эритромицин		0.25	0.06 ⁺	0.38	0.19 ⁺	иФИК ≤ 0,5	
амикацин		0.38	0.31 ⁺	0.5	0.38 ⁺	синергизм	
офлоксацин		0.75	0.25 [!]	0.75	0.31 [!]		

^а медианы по результатам 3–4 независимых экспериментов.

^б по литературным данным [Zharkova et al., 2019] для сравнения.

Более низкие значения иФИК соответствуют более сильному синергетическому взаимодействию. Случаи, когда синергизм RFR-ChVac3.4(1-14) в сочетаниях с антибиотиками по своим показателям совпадает | превосходит | уступает таковому для оригинального ChVac3.4, обозначены «=» | «+» | «-», соответственно. Случаи, когда синергизм (или его утрата) наблюдается исключительно для сочетаний с RFR-ChVac3.4(1-14), обозначены «!».

Стратегия совместного применения является одним из признанных способов борьбы с антибиотикорезистентностью [Turnidge, 2014; Ventola, 2015; Zimmermann et al., 2007]. Сочетанное применение веществ, способных избирательно усилить целевые эффекты друг друга, также позволяет уменьшить их требующиеся действующие дозы и сопутствующее побочное действие.

Ранее было установлено [Zharkova et al., 2019], что природный ChBac3.4-NH₂ имеет высокую склонность к проявлению синергизма антимикробной активности в сочетаниях с конвенциональными антибиотиками. Перспективная своей высокой антимикробной активностью и низкой токсичностью для эукариотических клеток модификация RFR-ChBac3.4(1-14)-NH₂ несмотря на отличающийся механизм действия (не включающий быстрого мембранолитического эффекта по результатам теста на проницаемость бактериальных мембран *E. coli* ML-35p), показала ещё более выраженный эффект взаимного усиления противомикробных свойств при использовании в сочетании с антибиотиками, в особенности против грамотрицательных бактерий.

Гемолитическая активность в отношении эритроцитов человека. Мембраны эукариотических клеток могут быть вторичной мишенью АМП, обладающих мембранолитической активностью. Тем не менее, для большинства модификаций ChBac3.4-NH₂ признаков повышения гемолитической активности в рассмотренном диапазоне концентраций (до 64 мкМ, что на порядок выше ГМИК) не выявляется, доля подвергшихся лизису эритроцитов не превышает 5%, что находится в пределах погрешности от базового уровня. Только ChBac3.4-2-COOH демонстрирует умеренную токсичность и четкую тенденцию к дозозависимому лизису эритроцитов человека: от $7 \pm 2\%$ в присутствии 16 мкМ пептида, до $19 \pm 2\%$ в присутствии 32 мкМ и $25 \pm 2\%$ в присутствии 64 мкМ, — что может быть связано с повышением гидрофобности молекулы из-за введения двух дополнительных остатков триптофана.

Цитотоксическое действие в отношении нормальных и опухолевых клеток для модифицированных вариаций ChBac3.4-NH₂ было оценено *in vitro* с использованием МТТ-теста и были рассчитаны индексы селективности (таблица 5).

Сходные по длине с природным ChBac3.4-NH₂ варианты по своей цитотоксической активности отличаются от него в большей степени, чем по антимикробному действию. Это позволяет предположить, что внесённые в их первичную структуру изменения в большей степени влияют на их взаимодействие с эукариотическими клетками. ChBac3.4-1-NH₂ с удвоением участка 12–18 показывает наибольшую цитотоксичность среди протестированных пептидов в отношении как опухолевых, так и нормальных клеток. В отношении линии U937 пептиды RFR-ChBac3.4-1-NH₂ и ChBac3.4-2-COOH проявляют токсичность на сопоставимом с ним уровне. Пептид с делецией гистидина (ChBac3.4(H-)) наоборот характеризуется более низкой токсичностью в сравнении с природным (ЭК₅₀ на 42–86% выше), что с учётом сохранения высокой антимикробной активности приводит к росту селективности в отношении бактерий в 2,2 раза.

Неамидированные по С-концевой аминокислоте пептиды демонстрируют более низкий уровень цитотоксичности, чем амидированные аналоги, в отношении всех протестированных типов клеток, что согласуется с наблюдением, что повышение катионности АМП свыше определённого порога начинает в большей степени способствовать росту токсической активности в отношении эукариотических клеток, чем дальнейшему повышению противомикробной активности [Dathe et al., 2001; Takahashi et al., 2010].

Все укороченные аналоги показывают значительное снижение токсичности, более заметное для N-концевых фрагментов. Очевидно, что, хотя N-концевая область имеет решающее значение в реализации природным пептидом его

антибактериального действия, в реализации цитотоксического эффекта на клетки макроорганизма она не играет настолько же существенной роли. В связи с этим показавший более высокую антимикробную активность в сравнении с исходным пептидом укороченный вариант RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ оказался и наиболее селективным в отношении бактерий (ИС_{3/6} свыше 17.3, что более чем в 4 раза выше, чем у исходного ChVac3.4-NH₂).

Таблица 5. Цитотоксические свойства ChVac3.4 и его модификаций в отношении опухолевых клеточных линий и нормальных мононуклеаров периферической крови человека, а также расчетные индексы селективности (ИС)

Пептиды	Цитотоксические ЭК ₅₀ ^а (мкМ) против			ИС _{3/6} ^б ЭК ₅₀ ^{мононукл.} ГМИК [^г соотношение с ChVac3.4- NH ₂]	ИС _{н/о} ^в ЭК ₅₀ ^{мононукл.} $\sqrt{\text{ЭК}_{50}^{\text{K562}} \cdot \text{ЭК}_{50}^{\text{U937}}}$ [^г соотношение с ChVac3.4-NH ₂]
	нормальных клеток:	опухолевых клеток:			
	мононуклеары	K562	U937		
ChVac3.4-NH ₂	18.6 ± 0.8	15.5 ± 0.3	8.1 ± 0.4	4.0 [=]	1.7 [=]
ChVac3.4-COOH	36.2 ± 6.9	24.4 ± 4.0	12.9 ± 0.3	6.0 [1.5]	2.0 [1.2]
ChVac3.4-1-NH ₂	12.1 ± 0.8	8.4 ± 1.1	4.5 ± 1.6	2.1 [0.5]	2.0 [1.2]
ChVac3.4-1-COOH	33.7 ± 3.2	16.5 ± 1.3	9.8 ± 0.5	7.0 [1.7]	2.7 [1.6]*
RFR-ChVac3.4-1-NH ₂	18.3 ± 4.1	20.0 ± 3.4	3.2 ± 0.4	3.5 [0.9]	2.3 [1.4]
ChVac3.4-2-COOH	20.2 ± 4.5	13.7 ± 2.3	4.1 ± 0.3	3.7 [0.9]	2.7 [1.6]*
ChVac3.4 (H-)	34.7 ± 7.3	25.0 ± 3.5	11.5 ± 0.5	8.9 [2.2]	2.0 [1.2]
ChVac3.4 (12-26)	43.3 ± 7.7	39.4 ± 2.3	17.0 ± 1.1	1.0 [0.2]	1.7 [1.0]
ChVac3.4 (1-19)-NH ₂	>64	28.0 ± 6.5	>64	>4.7 [>1.2]	~1.5 [~0.9]
ChVac3.4 (1-14)-NH ₂	>64	33.6 ± 4.1	>64	>3.7 [>0.9]	~1.4 [~0.8]
RFR-ChVac3.4 (1-14)-NH ₂	>64	39.4 ± 6.6	>64	>17.3[>4.3]*	~1.3 [~0.8]

^а Полумаксимальные эффективные концентрации (ЭК₅₀) цитотоксического действия (среднее ± среднеквадратичное отклонение по данным 3 независимых экспериментов; Sigma Plot Standard Curve Analysis). ^б Индекс селективности повреждающего действия пептидов в отношении бактериальных (б) клеток в сравнении с нормальными эукариотическими (э) клетками (ИС_{3/6}). Рассчитан как отношение ЭК₅₀ для нормальных мононуклеаров периферической крови человека к геометрическому среднему минимальных ингибирующих концентраций пептидов против бактерий (ГМИК, см. табл. 3). ^в Индекс селективности повреждающего действия пептидов в отношении опухолевых (о) эукариотических клеток в сравнении с нормальными (н) (ИС_{н/о}). Рассчитан как отношение ЭК₅₀ для нормальных мононуклеаров периферической крови человека к геометрическому среднему ЭК₅₀ для обеих протестированных линий опухолевых клеток. ^г Для оценки прироста селективности действия модифицированных пептидов в сравнении с исходным рассчитывали отношение значения ИС соответствующего пептида к значению того же индекса для ChVac3.4-NH₂. Результат приведен в квадратных скобках, наилучшие значения отмечены звездочкой.

Прирост селективности действия модифицированных пептидов в отношении опухолевых клеток в сравнении с нормальными был менее значительным. Повышение ИС_{н/о} в 1,6 раза показали пептиды ChVac3.4-2-COOH и ChVac3.4-1-COOH. Интересно, что оба они отличаются несколько большей гидрофобностью, чем природный ChVac3.4-NH₂, о чем можно судить по увеличению времени их удерживания на колонке при проведении ОФ ВЭЖХ (см. табл. 2). Роль гидрофобности в повышении цитотоксической активности АМП хорошо известна

[Takahashi et al., 2010; Teixeira et al., 2012; Wieprecht et al., 1997]. Возможно, в некоторых случаях — и ниже определенного порога — прирост данного параметра может вносить больший вклад в «полезную» токсичность по отношению к опухолевым клеткам, чем в таковую по отношению к клеткам нормальным.

Динамика развития цитотоксического эффекта и соотношение некротических/апоптотических клеток при действии пептида ChBac3.4-1-COOH на опухолевые клетки. Пептид ChBac3.4-1-COOH был выбран для более детального исследования цитотоксических свойств по совокупности индексов селективности и индивидуальной активности в отношении как бактериальных, так и опухолевых клеток.

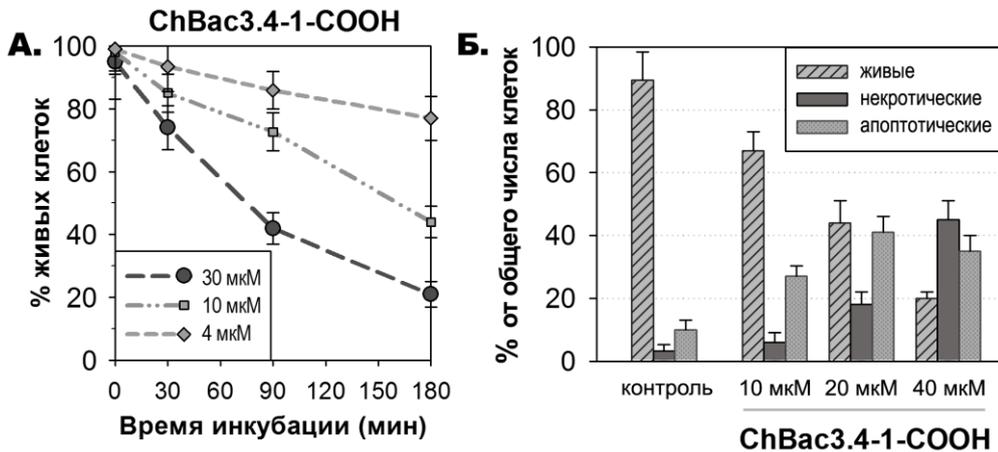


Рисунок 2.
Динамика и характер цитотоксического действия ChBac3.4-1-COOH на клетки линии K562.

А) Кривые клеточной гибели от времени, иллюстрирующие развитие цитотоксического эффекта для различных концентраций пептида в течение первых трех часов инкубации, основанные на данных микроскопического подсчета доли живых и мёртвых клеток с использованием красителя трипанового синего. **Б)** Гистограмма, показывающая долю клеток, погибающих по пути некроза или апоптоза в присутствии различных концентраций пептида, по данным флуоресцентной микроскопии с использованием набора дифференциальных красителей на основе аннексина.

Его действие развивается медленнее (рис 2А), чем у ранее охарактеризованного нативного ChBac3.4-NH₂ [Шамова О.В., 2013], несмотря на отсутствие значимых различий в величине их ЭК₅₀ в отношении клеток рассматриваемой линии K562 (см. табл. 5). Например, в присутствии 30 мкМ ChBac3.4-1-COOH спустя 3 часа от начала инкубации процент жизнеспособных клеток снижается до 21 ± 4% (что выше, чем аналогичный показатель в присутствии лишь 20 мкМ ChBac3.4-NH₂ [Шамова О.В., 2013]). Возможно, наблюдаемая картина и обнаруженный ранее эффект отставания в действии ChBac3.4-1-COOH на цитоплазматическую мембрану бактерий в сравнении с нативным ChBac3.4-NH₂ имеют под собой некоторые общие предпосылки.

При действии мембранолитических пептидов, например протегрина-1, практически все повреждённые клетки погибают по некротическому пути даже при низких концентрациях пептида [Шамова О.В., 2013]. При действии ChBac3.4-1-COOH, однако, процент некротических клеток начинает преобладать над процентом апоптотических клеток только в присутствии высоких концентраций пептида (рис. 2Б), что согласуется с полученными ранее данными для нативного ChBac3.4-NH₂ [Шамова О.В., 2013]. Это указывает на то, что цитотоксическое действие как исходного, так и модифицированного пептида в большей степени основано на взаимодействии с определёнными клеточными мишенями (вероятно, расположенными внутри клетки), чем на разрушении клеточной мембраны. При этом в присутствии высокой концентрации ChBac3.4-1-COOH (40 мкМ) наблюдается более высокий процент клеток, погибающих в результате апоптоза (35 ± 5%), и более низкий процент клеток, подвергающихся некрозу (45 ± 6%), чем

сообщалось для оригинального ChVac3.4-NH₂ (30 ± 5% и 56 ± 6% соответственно [Шамова О.В., 2013]). Более высокое соотношение апоптотических клеток к некротическим может свидетельствовать о снижении мембранолитических свойств и / или усилении внутриклеточной активности модифицированного пептида в сравнении с исходным.

Противоопухолевая активность ChVac3.4-1-COOH *in vivo* в модели перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха мыши оценивалась с использованием рекомбинантного препарата данного пептида, любезно предоставленного сотрудниками учебно-научного центра при Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, возглавляемого д.х.н. Т.В. Овчинниковой. Активность рекомбинантного и синтетического препаратов *in vitro* была сходной.

Установлено, что ChVac3.4-1-COOH оказывает *in vivo* умеренный положительный эффект на продолжительность жизни животных с опухолью как в низкой, так и в высокой дозе (рис. 3). Среднее время выживания от момента введения опухолевых клеток в группе, получавшей 100 мкг пептида на животное в неделю, составило 26,5 ± 2,9 (M ± σ) дней, а в группе, получавшей 1 мкг, — 27,9 ± 4,8 дня, что в обоих случаях статистически значимо превысило среднее время выживания в контрольной группе, равное 23,2 ± 1,5 дням (U-критерий Манна–Уитни; p < 0,05). Медианное время выживания в названных группах составило 25, 28 и 23 дня, соответственно. Увеличение продолжительности жизни мышей также подтверждается сравнением кривых Каплана–Мейера с использованием логарифмического рангового критерия. Тем не менее в рассмотренном диапазоне концентраций отсутствует очевидная зависимость между вводимой дозой и величиной противоопухолевого эффекта. Наблюдаемое противоопухолевое действие, возможно, реализуется за счёт менее зависимых от концентрации механизмов, — например, иммуномодулирующих эффектов.

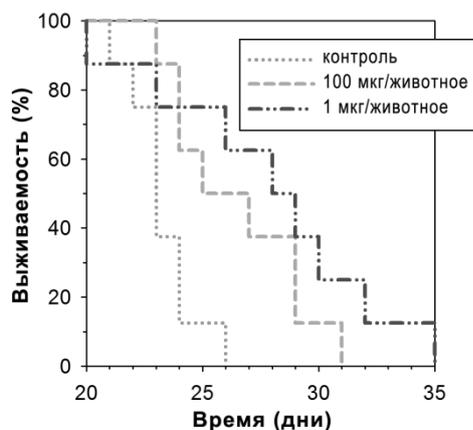


Рисунок 3. Кривые выживаемости Каплана–Мейера для мышей, получавших ChVac3.4-1-COOH, в модели введённой подкожно в область холки перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха. Мышам опытных групп вводили обозначенные дозы пептида в 0,1 мл деионизованной воды один раз в неделю. Контрольной группе вводили такое же количество деионизованной воды. Логарифмический ранговый критерий показывает статистически значимую разницу между группами, получавшими как 100 мкг ($p = 0,039$), так и 1 мкг ($p = 0,034$) пептида, и контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование структурно-функциональной активности богатого пролином пептида ChVac3.4 (также обозначавшегося как ChVac3.4-NH₂) из семейства бактенецинов, проведённое в данной работе путём анализа антимикробных, цитотоксических и, в частности, противоопухолевых свойств набора его синтетических аналогов, вносит вклад в развитие представлений о молекулярных механизмах реализации эффектов подобных пептидов, являющихся важными защитными факторами системы врожденного иммунитета, на бактериальные и эукариотические клетки, а также служит продвижению на пути внедрения АМП в медицинскую практику для коррекции функциональных нарушений в организме при инфекционных и, возможно, опухолевых патологиях.

С точки зрения фундаментальных аспектов полученные данные подтверждают предположения о двойственном механизме действия ChVac3.4 и его аналогов, сочетающем мембранолитическую активность и эффекты на внутриклеточные мишени. Также подтверждены общие закономерности влияния таких физико-химических факторов как заряд и гидрофобность, выявленные ранее для других структурных классов АМП, на биологическую активность ChVac3.4. Кроме этого выявлены и новые специфические элементы в структуре пептида, ответственные за преимущественно тот или иной вид активности.

Полученные данные демонстрируют выраженное антимикробное действие как исходного пептида ChVac3.4, так и ряда его синтетических вариантов против мультирезистентных клинических изолятов, в том числе грамотрицательных штаммов, устойчивых к карбапенемам и экспрессирующих β -лактамазы расширенного спектра (ESBL). Данные штаммы бактерий возглавляют список приоритетных патогенов ВОЗ, что подчёркивает перспективность исследуемых пептидов как основы для разработки новых противомикробных препаратов.

Сравнительный анализ антимикробной и цитотоксической активности N- и C-концевых фрагментов ChVac3.4 указывает на пространственное разобщение участков, вносящих наиболее значимый вклад в реализацию его действия против бактериальных клеток или же клеток человека, что открывает возможности для повышения противомикробной селективности. Так, укороченный N-терминальный пептид ChVac3.4(1-14)-NH₂ сохраняет антимикробную активность, но полностью утрачивает токсические свойства в отношении клеток млекопитающих, в то время как усеченный C-концевой пептид ChVac3.4(12-26)-NH₂, напротив, в большей степени демонстрирует снижение антибактериальной активности, чем цитотоксического действия на эукариотические клетки. При этом использование более короткоцепочечных пептидов выгодно с экономической точки зрения. Кроме того, малые пептидные молекулы менее иммуногенны.

Выявленная возможность поддержания антимикробной активности N-концевого фрагмента на уровне полноцепочечного пептида и даже её усиления путём удвоения лидирующего N-концевого RFR триплета является важным продвижением в данном направлении. RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ демонстрирует повышенную эффективность в отношении бактерий, сниженную токсичность и, таким образом, более чем в четыре раза высокий, чем у оригинального пептида, индекс селективности. Укороченный пептид до определённой степени сохраняет характерную для природного ChVac3.4 способность в субмикробцидных концентрациях частично ингибировать образование биоплёнок клиническими изолятами бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, а по потенциалу усиления активности за счёт применения в комбинации с клиническими антибиотиками RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ даже превосходит исходный пептид благодаря более выраженным синергетическим эффектам.

В данной работе выявлен ряд структурных особенностей, определяющих преимущественно цитотоксическую активность ChVac3.4. К ним относятся C-концевое амидирование и имеющая низкое структурное сходство с другими бактенецинами область 12-18, включающая остаток аминокислоты гистидина. Варьирование данных особенностей позволило в модификации ChVac3.4-1-COOH получить увеличение селективности действия в отношении опухолевых клеток в сравнении с нормальными без индукции побочных гемолитических свойств.

Таким образом, полученные в данной работе результаты демонстрируют потенциал структурных модификаций как способа оптимизации селективности и спектра активности ChVac3.4 и бактенецинов в целом, а также подтверждают, что они являются многообещающими прототипами для разработки противомикробных и противоопухолевых препаратов.

Практические рекомендации. Суммируя полученные данные и данные литературы, можно считать, что модификации катионных пролин-богатых пептидов, состоящая в удвоении начального богатого аргинином участка, является важной для получения короткоцепочечных высокоактивных производных ChBac3.4 и других бактенецинов. Подобные пептиды представляются перспективными кандидатами для разработок лекарственных препаратов на их основе.

Наблюдаемое цитотоксическое действие ChBac3.4 и некоторых его структурных вариантов по отношению к опухолевым клеткам в культуре, а также противоопухолевый эффект выбранного аналога (ChBac3.4-1-COOH), подтверждённый *in vivo*, указывают на определённые перспективы применения подобных пептидов также в противоопухолевой терапии. Использование АМП как альтернативных терапевтических агентов может быть выигрышной стратегией, например, в случаях, когда рост опухоли сопровождается хронической инфекцией, поскольку пептид оказывает двойное антибактериальное и противоопухолевое действие.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны, химически синтезированы и очищены с использованием ОФ ВЭЖХ структурные аналоги кателицидина ChBac3.4. Степень очистки полученных образцов составила 96–99%.

2. Сравнительный анализ антимикробной активности показал, что укорочение N-концевой части молекулы ChBac3.4 приводит к постепенному снижению активности пептида, в первую очередь в отношении грамположительных бактерий. Наиболее низкой антимикробной активностью среди изученных аналогов ChBac3.4 обладает C-концевой фрагмент 12–26. Это подчёркивает роль N-концевого участка молекулы в обеспечении антимикробной функции пептида.

3. Удвоение начального триплета аминокислот (1–3) RFR полностью восстанавливает уровень активности короткоцепочечного N-концевого фрагмента ChBac3.4(1-14) до уровня активности полноразмерного ChBac3.4 и даже повышает его. Наиболее эффективный из полученных аналогов пептид RFR-ChBac3.4(1-14) также сохраняет свойственную исходному ChBac3.4 способность синергетически усиливать активность антибиотиков. C-концевое амидирование, не является определяющим параметром для реализации антимикробной активности.

4. Анализ механизмов антимикробного действия показал, что структурные аналоги ChBac3.4 значительно различаются по мембранолитической активности в отношении цитоплазматической мембраны бактерий. Наиболее существенную роль для снижения мембранолитических свойств играют следующие параметры: уменьшение длины фрагментов в сравнении с оригинальным пептидом, удаление остатка гистидина в положении 14, отсутствие C-концевого амидирования. Отсутствие прямой взаимосвязи мембранолитического действия и величины антимикробной активности подтверждает наличие у ChBac3.4 внутриклеточных мишеней, а слабо выраженный эффект RFR-ChBac3.4(1-14) на барьерную функцию мембран указывает, что восстановление активности при удвоении N-концевого RFR-триплета идёт по независимому от повреждения мембраны механизму.

5. Все структурные аналоги ChBac3.4, за исключением обогащённого триптофаном варианта с повышенной гидрофобностью, сохраняют низкую гемолитическую активность в отношении эритроцитов человека.

6. N-концевые фрагменты ChBac3.4 демонстрируют минимальные цитотоксические свойства в отношении клеток человека. Это показывает эффективность разобщения антимикробных и цитотоксических свойств и повышения селективности в отношении микробных клеток путём использования N-концевого участка, оптимизированного удвоением лидирующего RFR-триплета. Наибольший

вклад в проявление цитотоксической активности вносит участок 12–18, содержащий аминокислотный остаток гистидина и не имеющий характерных для бактенецинов повторяющихся мотивов, что подтверждается как повышением цитотоксичности пептидов с удвоением указанного участка, так и снижением токсичности при делеции гистидина в положении 14.

7. Отсутствие С-концевого амидирования снижает цитотоксическое действие пептида. Сочетание структурных особенностей — отсутствия С-концевого амидирования с удвоением участка 12–18, как продемонстрировано на примере пептида ChVac3.4-1-COOH, — позволяет повысить селективность токсического действия ChVac3.4 в отношении опухолевых клеток без усиления гемолитичности.

8. В экспериментах *in vitro* на линии клеток К-562 и *in vivo* на модели перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха мыши показано противоопухолевое действие ChVac3.4-1-COOH. Цитотоксическое действие пептида на опухолевые клетки характеризуется более медленной динамикой с ростом доли клеток, погибающих по пути апоптоза в сравнении с оригинальным ChVac3.4.

9. В результате проведенного исследования определены подходы для разработки новых антибиотических соединений-корректоров патологии (инфекция, опухолевый рост) на основе природного пептида семейства кателицидинов — бактенецина ChVac3.4; получено два пептида, которые могут рассматриваться в качестве прототипов для создания на их базе новых лекарственных средств: пептид RFR-ChVac3.4(1-14), обладающий высокой антимикробной активностью и избирательностью действия в отношении микроорганизмов, и проявляющий синергический эффект с рядом конвенциональных антибиотиков, в том числе в отношении устойчивых к ним бактерий; а также пептид ChVac3.4-1-COOH, обладающий противоопухолевой активностью.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Шамова О.В., Жаркова М.С., **Копейкин П.М.**, Орлов Д.С., Корнева Е.А. Механизмы действия антимикробных пептидов бактенецинов ChVac3.4, ChVac5 и mini-ChVac7.5N β на бактериальные клетки // Патогенез. 2017. Т. 15, № 3. С. 43–50.
2. Жаркова М.С., **Копейкин П.М.**, Афиногенов Г.Е., Орлов Д.С., Артамонов А.Ю., Сафиуллина К.Э., Сухарева М.С., Цветкова Е.В., Мильман Б.Л., Афиногенова А.Г., Шамова О.В. Действие пролин-богатых пептидов врожденного иммунитета на антибиотикоустойчивые штаммы бактерий // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20, № 1. С. 107–114.
3. Артамонов А.Ю., Сухарева М.С., **Копейкин П.М.**, Сухачев А.Н., Филатенкова Т.А., Орлов Д.С., Шамова О.В. Эффекты пролин-богатых пептидов на функциональную активность лейкоцитов человека *in vitro* // Российский иммунологический журнал. 2019. Т. 13 (22), №2. С. 710–713.
4. **Kopeikin P.M.**, Zharkova M.S., Kolobov A.A., Smirnova M.P., Sukhareva M.S., Umnyakova E.S., Kokryakov V.N., Orlov D.S., Milman B.L., Balandin S.V., Panteleev P.V., Ovchinnikova T.V., Komlev A.S., Tossi A., Shamova O.V. Caprine Bactenecins as Promising Tools for Developing New Antimicrobial and Antitumor Drugs // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020. V.10. E.552905. doi: 10.3389/fcimb.2020.552905.

Тезисы докладов:

1. Орлов Д.С., Артамонов А.Ю., Жаркова М.С., **Копейкин П.М.**, Орлов С.Б. Молекулярные механизмы действия пептида врожденного иммунитета протегрина 1 на мембраны бактерии E.coli ML35p // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9(18), № 2–1. С. 508–510.
2. Shamova O.V., Zharkova M.S., Artamonov A. Yu., Pazina T. Yu., Yukhnev V.A., **Kopeykin P.M.**, Orlov D.S. Cathelicidins – antibiotic and immunomodulatory molecules of the innate immune system // Abstracts of V International symposium "Interaction of the nervous and immune systems in health and disease". June 23 – June 26, 2015, Saint-Petersburg, Russia. P. 54.
3. Шамова О.В., Жаркова М.С., Артамонов А.Ю., Юхнев В.А., **Копейкин П.М.**, Кокряков В.Н., Орлов Д.С., Овчинникова Т.В. Пептиды-кателицидины – многофункциональные молекулы и

- перспективные прототипы новых лекарственных средств // V Съезд физиологов СНГ, V Съезд биохимиков России (Сочи, Россия, 4–8 октября 2016). Acta Naturae. 2016. Т.2, Спец. С. 165-166.
- 4. Копейкин П.М.,** Лукьянова Т.А., Орлов Д.С., Мильман Б.Л., Артамонов А.Ю., Шамова О.В. Разработка, синтез и изучение биологической активности пролин-богатых пептидов семейства бактеницинов // Медицинский академический журнал. 2016. Т. 16, № 4. С. 216-217.
- 5. Лукьянова Т.А., Копейкин П.М.** Сравнительный анализ биологической активности структурных аналогов антимикробных пептидов семейства бактеницинов // Сборник тезисов XIX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье» Санкт-Петербург, 2016. Том XIX. С. 351-352. ISSN 2221-5654.
- 6. Shamova O., Kopeykin P.,** Artamonov A., Pazina T., Balandin S., Panteleev P., Ovchinnikova T., Orlov D. Caprine batenecin ChBac3.4—an untypical mammalian proline-rich AMP with cytotoxic effects towards host cells // Abstracts of the Antimicrobial peptides 2016 Intern. Symp. «Towards an integrated view of AMP diversity, functions and applications» (Montpellier, France, June 6-8, 2016). P. 31.
- 7. Kopeykin P.M.,** Lukyanova T.A., Orlov D.S., Milman B.L., Artamonov A.Yu., Shamova O.V. Antimicrobial activity of synthetic analogues of natural peptides-batenecins // Abstracts of the VI International Symposium “Interaction of the nervous and Immune systems in health and disease”. 20–23 June, 2017. Saint-Petersburg (Russia). P. 40.
- 8. Shamova O., Zharkova M.,** Lukyanova T., Kopeykin P., Balandin P., Ovchinnikova T., Yamschikova E., Pazina T., Filatenkova T., Kokryakov V., Artamonov A., Nazarov A., Orlov D. Proline-rich peptides batenecins: antimicrobial activity and effects towards host cells // Abstracts of the VI International Symposium “Interaction of the nervous and Immune systems in health and disease”. 20–23 June, 2017, Saint-Petersburg (Russia). P.72.
- 9. Копейкин П.М.,** Лукьянова Т.А. Антимикробные свойства синтетических аналогов природных пептидов бактеницинов // В сборнике тезисов XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье». 22 апреля 2017, СПб. С. 281-282.
- 10. Назаров А.С., Копейкин П.М.** Конъюгация антимикробных пептидов с флуоресцентными маркерами // В сборнике тезисов XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье». 22 апреля 2017, СПб. С. 390-391.
- 11. Назаров А.С., Кудрявцев И.В.,** Филатенкова Т.А., Копейкин П.М., Баландин С.В., Овчинникова Т.В., Артамонов А.Ю., Орлов Д.С., Шамова О.В. Интернализация пролин-богатых пептидов врожденного иммунитета в клетки человека *in vitro* // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19. № 5. С. 69.
- 12. Шамова О.В., Жаркова М.С., Копейкин П.М.,** Лукьянова Т.А., Артамонов А.Ю., Баландин С.В., Филатенкова Т.А., Назаров А.С., Сафиуллина К.Э., Сухарева М.С., Пазина Т.Ю., Гринчук Т.М., Кокряков В.Н., Овчинникова Т.В., Орлов Д.С. Пролин-богатые пептиды врожденного иммунитета как прототипы новых антимикробных и противоопухолевых лекарственных препаратов // Acta Naturae (русскаяязычная версия). 2017. Т. 9. № 5. С. 148-149.
- 13. Комлев А.С., Копейкин П.М.,** Позолотин В.А., Сухарева М.С., Жаркова М.С., Орлов Д.С., Шамова О.В. Разработка способов получения синтетических аналогов природных антибиотических пролин-богатых пептидов // Forcipe. 2019. Т. 2. № S3. С. 26-27.
- 14. Kopeykin P.M.,** Sukhareva M.S., Lugovkina N.V., Shamova O.V. Chemical synthesis and analysis of antimicrobial and hemolytic activity of structural analogous of a peptide protegrin 1 // Medical Academic Journal. 2019. Т. 19. № 5. С. 169-170.
- 15. Shamova O.V., Nazarov A.S., Kopeykin P.M.,** Kudryavtsev I.V., Grudinina N.A., Andreeva E.A., Milman B.L., Orlov D.S. Batenecins as cell-penetrating peptides // Medical Academic Journal. 2019. Т. 19. № 5. С. 178-179.
- 16. Kopeykin P.M.,** Cheredova K.V., Zharkova M.S., Kolobov A.A., Smirnova M.P., Orlov D.S., Afinogenova A.G., Afinogenov G.E., Sukhareva M.S., Milman B.L., Shamova O.V. Antimicrobial activity of synthetic analogous of caprine peptides batenecins towards drug-resistant bacteria // Abstract: International Conference "Molecular foundations of epidemiology, diagnosis, prevention and treatment of topical infections" (December 4-6, 2018, St. Petersburg). Инфекция и иммунитет. Т. 8, № 4. С. 614-615.
- 17. Sukhareva M.S., Kopeykin P.M.,** Zharkova M.S., Shamova O.V. Combined antibacterial action of salivary cationic proline-rich peptides and antimicrobial peptides // Medical Academic Journal. 2019. Т. 19. № 5. С. 180-181.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ESBL — (Extended Spectrum Beta-Lactamase) β -лактамаза расширенного спектра
- ГМИК — геометрическое среднее минимальных ингибирующих концентраций
- MALDI TOF масс-спектрометрия — времяпролётная (Time-of-flight = TOF) масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization = MALDI).
- MRSA — устойчивый к метициллину (methicillin-resistant) *Staphylococcus aureus*
- OD — (optical density) оптическая плотность
- ONPG — О-нитрофенил- β -D-галактопиранозид
- АКЭ — асцитная карцинома Эрлиха
- АМП — антимикробные пептиды
- ЗФР — забуференный физиологический раствор
- ИС — индекс селективности
- иФИК — индекс фракционной ингибирующей концентрации
- КОЕ — колониеобразующие единицы
- МИК — минимальная ингибирующая концентрация
- МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид
- ОФ ВЭЖХ — обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
- ЭК50 — 50%-ая (полумаксимальная) эффективная концентрация