

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины»

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, чл.-корр. РАН

кандидат биологических наук

Шамова Ольга Валерьевна

Жаркова Мария Сергеевна

Санкт-Петербург

2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. СИСТЕМА ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА	15
1.1.1. Барьерные эпителии	15
1.1.2. Клеточное звено врожденного иммунитета	17
1.1.3. Гуморальное звено врожденного иммунитета	20
1.2. АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ: ОСНОВНЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ЧЕРТЫ И КЛАССИФИКАЦИЯ.....	23
1.3. ОСОБЕННОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ПРОЛИНА	25
1.4. ФУНКЦИИ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ.....	29
1.4.1. Антибактериальная активность	29
1.4.2. Противогрибковая активность	34
1.4.3. Противовирусная активность.....	34
1.4.4. Противоопухолевое действие	35
1.4.5. Иммуномодулирующее действие	40
1.5. ПРИМЕНЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ: ПЕРСПЕКТИВЫ, ПРОБЛЕМЫ, СТРАТЕГИИ ОПТИМИЗАЦИИ СВОЙСТВ	42
1.5.1. Преимущества и перспективы практического применения.....	42
1.5.2. Текущие успехи клинических испытаний	44
1.5.3. Проблемы на пути к клиническому применению	46
1.5.4. Стратегии улучшения антимикробных пептидов	48
1.5.5. Способы получения антимикробных пептидов	51
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	57
2.1. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ.....	57
2.1.1. Используемые штаммы и их характеристика	57
2.1.2. Условия культивирования и расчёт концентрации	58
2.2. ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ	59

2.2.1. Клеточные линии и условия культивирования	59
2.2.2. Определение концентрации клеток в суспензии путём микроскопического подсчёта в камере Горяева	60
2.2.3. Приготовление эритроцитарной суспензии и выделение фракции моноклеаров из цельной периферической крови.....	62
2.3. МЕТОДЫ СИНТЕЗА, ОЧИСТКИ И АНАЛИЗА ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ	64
2.3.1. Твердофазный химический синтез пептидов	64
2.3.2. Обратнo-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография	65
2.3.3. Масс-спектрометрический анализ.....	66
2.4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК.....	67
2.4.1. Исследование антимикробной активности пептидов методом серийных разведений в жидкой питательной среде, содержащей микроорганизмы	67
2.4.2. Оценка влияния пептидов на проницаемость наружной и внутренней мембран бактерии <i>E.coli</i> ML-35p для хромогенных маркеров спектрофотометрическим методом	69
2.4.3. Оценка влияния пептидов на метаболическую активность бактериальной суспензии флуориметрическим методом с использованием дыхательного маркера резазурина.....	72
2.4.4. Оценка влияния пептидов на формирование микробных биоплёнок спектрофотометрическим методом с использованием красителя кристаллического фиолетового	75
2.4.5. Оценка характера сочетанного антимикробного действия веществ в комбинации методом перекрёстного титрования. Фракционные индексы	76
2.5. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ В ОТНОШЕНИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК	80
2.5.1. Спектрофотометрическая оценка гемолитической активности пептидов	80
2.5.2. Оценка цитотоксического действия пептидов при помощи МТТ-теста	81

2.5.3. Исследование динамики токсического действия путём микроскопического подсчёта доли погибших клеток с использованием маркера клеточной гибели трипанового синего.....	83
2.5.4. Дифференциальный подсчёт клеток, погибающих по пути некроза или по пути апоптоза, при помощи набора красителей, включающего аннексин V с флуоресцентной меткой.....	84
2.5.5. Оценка противоопухолевого действия <i>in vivo</i> в модели перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха мыши.....	87
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	89
3.1. ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ КАТЕЛИЦИДИНА ChVac3.4 НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН И МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В СУСПЕНЗИИ	89
3.2. ВЫБОР МОДИФИКАЦИЙ ChVac3.4 ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО СИНТЕЗА И АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ.....	94
3.3. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ РАЗРАБОТАННЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ ChVac3.4 И АНАЛИЗ ЧИСТОТЫ ПОЛУЧЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	97
3.4. ЭФФЕКТЫ МОДИФИКАЦИЙ ChVac3.4 НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ.....	101
3.4.1. Антимикробная активность в отношении планктонных бактерий.....	101
3.4.2. Влияние на проницаемость бактериальных мембран	107
3.4.3. Ингибирование формирования бактериальных биоплёнок <i>in vitro</i> модификациями ChVac3.4, имеющими дополнительный N-концевой RFR-триплет.....	110
3.4.3. Сочетанное действие пептида RFR-ChVac3.4(1-14)-NH ₂ с антибиотиками в сравнении с исходным ChVac3.4.....	112
3.5. ЭФФЕКТЫ МОДИФИКАЦИЙ ChVac3.4 НА ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ	115
3.5.1. Гемолитическая активность в отношении эритроцитов человека	115
3.5.2. Цитотоксическое действие в отношении нормальных и опухолевых клеток <i>in vitro</i>	117

3.5.3. Динамика развития цитотоксического эффекта и соотношение некротических/апоптотических клеток при действии пептида ChVac3.4-1-COOH на опухолевые клетки	120
3.5.4. Противоопухолевая активность ChVac3.4-1-COOH <i>in vivo</i> в модели перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха мыши.....	123
4. ОБСУЖДЕНИЕ	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	147
ВЫВОДЫ	150
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	155

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Одним из серьёзных вызовов для современной медицины остаётся развитие *резистентности* к применяемым лекарственным препаратам [1, 2]. Эта проблема остро стоит в терапии не только инфекционных, но и опухолевых заболеваний [3, 4], 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) [2, 5–7]. Эти соединения рассматривают как перспективный базис для создания новых классов антибиотиков: они демонстрируют высокую антимикробную активность, в том числе в отношении антибиотикоустойчивых бактерий, формирующих биопленки, а также иммуномодулирующие эффекты [6, 8, 9]. Некоторые АМП, кроме этого, обладают и выраженной цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток [3, 10, 11]. 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 [12, 13]. 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 [3, 6, 8, 9, 11]. 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 ChBas3.4.

Степень разработанности. АМП отличаются высокой вариативностью структуры и активности [14, 15]. У позвоночных животных кателицидины являются наиболее гетерогенным семейством АМП в этом отношении. Одна из необычных групп среди них — пептиды с высоким содержанием остатков пролина [16–18]. Известно, что богатые пролином последовательности часто вовлекаются в различные белок-белковые или белок-пептидные взаимодействия; лиганды ряда белковых доменов включают определённые пролин-содержащие паттерны [19, 20]. 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 [16–18]. Также установлено, что такие АМП могут проникать в клетки грамотрицательных бактерий без повреждения мембран, задействуя ряд специфических транспортеров [17, 21, 22]. 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 [15, 17].

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 цитотоксическую активность против нескольких культивируемых линий опухолевых клеток, в частности устойчивой к доксорубину линии клеток K562 (эритромиелоидная лейкемия человека) [23, 24].

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, мелиттин, буфорин II, лактоферрицин В, α -дефенсины человека HNP-1-3, гомезин, тахиплезины и др. [3, 10, 11], 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 ChVac3.4, 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 ChVac3.4. 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 ChVac3.4, с оптимизированными для практического применения свойствами: пептид RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂, который может рассматриваться, как перспективный прототип антимикробного препарата, и пептид ChVac3.4-1-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 ChVac3.4 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 ChVac3.4 подтверждает наличие у него внутриклеточных мишеней.
3. Удвоение лидирующего аминокислотного триплета RFR у *N*-концевого фрагмента ChVac3.4(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-ChVac3.4(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. ChVac3.4 обладает высокой активностью в отношении формирующихся биоплёнок, тогда как короткоцепочечный пептид RFR-ChVac3.4(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-COОН 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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Система врождённого иммунитета

Врождённый иммунитет выполняет роль первой линии защиты против патогенов и формирует системный ответ для предотвращения инфекции и поддержания гомеостаза [5]. Система врождённого иммунитета также принимает важное участие в активации и регуляции адаптивного иммунного ответа [25]. Во время первичного инфицирования происходит быстрая индукция ответа со стороны врождённых защитных механизмов, в том числе с формированием воспалительных состояний [26, 27]. Этот ответ, по современным представлениям, является специфическим, поскольку показано, что на поверхности клеток врождённого иммунитета экспрессируются рецепторные молекулы, которые способны распознавать сложные полисахариды, гликолипиды, липопротеины, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты — так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП), сигнализирующие о возникновении микробной угрозы [25, 28]. К элементам врождённого иммунитета относят внешние физические барьеры, а также гуморальное и клеточное эффекторные звенья, компоненты которых являются консервативными среди челюстных позвоночных [5]. Основные реализуемые системой врождённого иммунитета механизмы представлены на рисунке 1.1.

1.1.1. Барьерные эпителии

Одной из основных стратегий защиты в рамках врождённого иммунитета является формирование поверхностных структур, выполняющих барьерную функцию и, таким образом, предотвращающих проникновение и распространение инфекции [5, 29, 30]. У разных видов такие барьеры могут иметь морфологические и анатомические особенности, но, так или иначе, они выполняют важнейшую роль изоляции внутренней среды организма от внешних факторов, таких как токсичные вещества и патогенные микробы [5]. Основным защитным барьером у всех позвоночных является кожа. Она состоит из рядов эпителиальных клеток, соединённых плотными контактами, что обеспечивает

механическую защиту от проникновения патогенов, а также предотвращает потерю воды из организма. Кроме того, кожа постоянно смазывается за счёт выделения вовне различных секретов для поддержания эпидермальной целостности и определенного уровня увлажнения. Немаловажную роль играют компоненты этих секретов, имеющие антимикробные свойства [5, 30], такие как лизоцим и антимикробные пептиды (АМП), которые являются частью защитных механизмов врожденного иммунитета [31, 32].

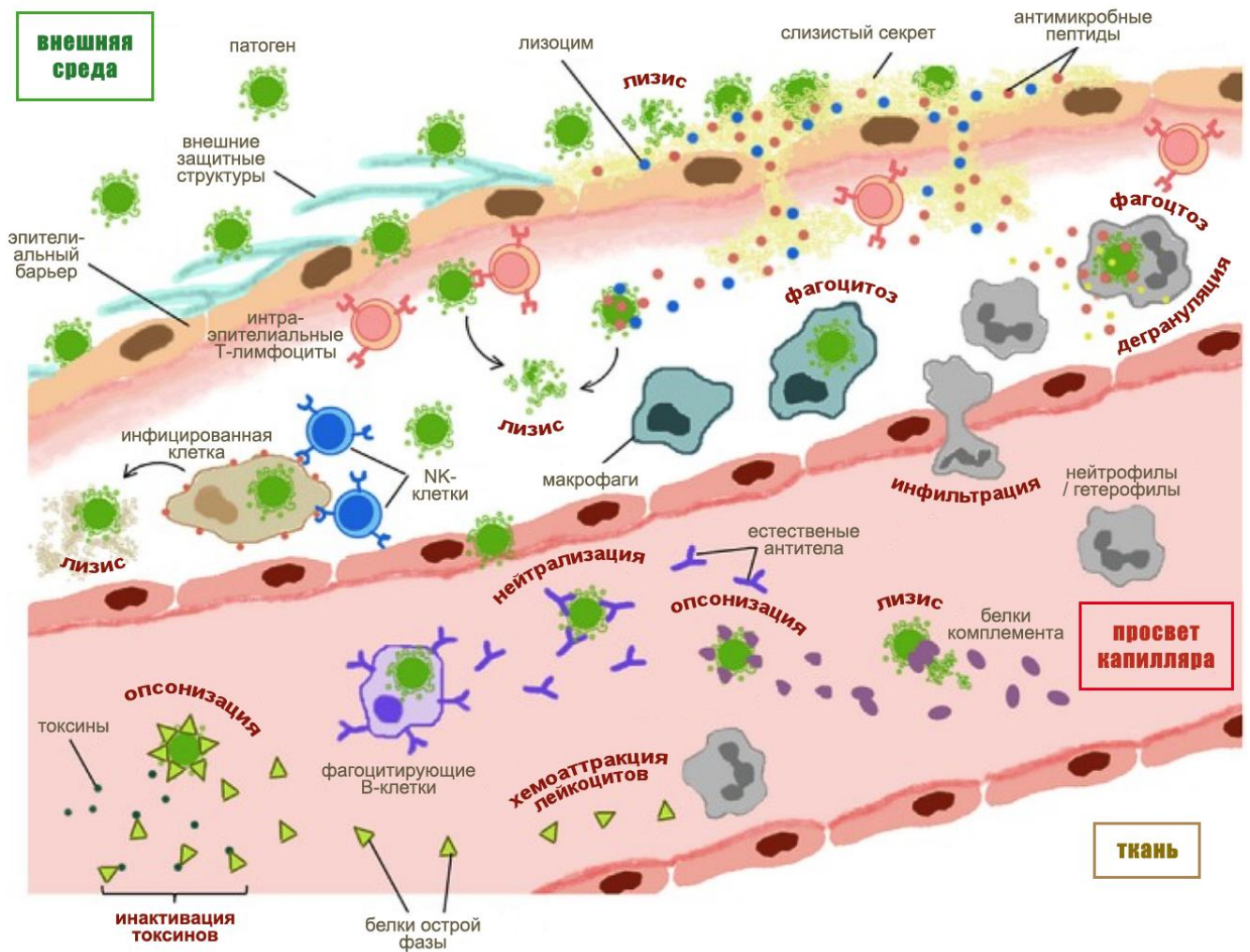


Рисунок 1.1. Схематическая иллюстрация основных механизмов врожденного иммунитета [по 5].

В ответ на проникновение патогенов кожа также реализует специфические клеточные ответы: например, эпителиальный слой может реагировать путем уплотнения и гиперплазии. Помимо этого, в слои эпидермиса проникают незрелые дендритные клетки, называемые клетками Лангерганса, которые

захватывают антигены и предотвращают возникновение локальной инфекции [30, 31].

Ещё одной важной линией защиты организма от проникновения патогенов является поверхность слизистых. У рыб они представлены эпителием жабр и пищеварительного тракта; у наземных позвоночных — более специализированными слизистыми оболочками дыхательного и желудочно-кишечного трактов. Они предотвращают проникновение из внешней среды в организм чужеродных веществ, а также захваченных с воздухом/водой или пищей патогенных микроорганизмов [30, 31]. Биохимический арсенал защиты слизистых оболочек от бактерий и паразитов включает низкий уровень pH, присутствие гидролитических ферментов и секрецию биологически активных молекул, в том числе лизоцима, АМП и провоспалительных цитокинов [29, 31, 32]. В иммунной защите принимают участие также лимфоидные ткани желудочно-кишечного тракта. Они содержат большое количество интраэпителиальных лимфоцитов, которые уничтожают патогены и сохраняют эпителиальную целостность [5].

Помимо перечисленного для большинства позвоночных животных характерно наличие на поверхности кожи и слизистых оболочек симбиотической микрофлоры, которая подавляет колонизацию патогенными микроорганизмами, конкурирующими с ней за места прикрепления, в том числе, за счет синтеза антимикробных метаболитов [5, 31].

Наиболее широко изученными являются механизмы врожденного иммунитета млекопитающих, поскольку именно эта группа организмов является основным объектом для медицины и ветеринарии [31, 33].

1.1.2. Клеточное звено врожденного иммунитета

В системе врождённого иммунитета можно выделить два основных типа клеточных эффекторов: клетки, осуществляющие фагоцитоз патогенов, и клетки, реализующие свою токсическую функцию в отношении патогенов без фагоцитоза.

Миелоидные фагоцитарные клетки. Главными клеточными компонентами врожденного иммунитета позвоночных являются фагоцитарные

клетки миелоидного ряда, также называемые «профессиональными» фагоцитами [5, 34]. К этому типу лейкоцитов относятся моноциты, макрофаги, нейтрофилы, гетерофилы, базофилы и эозинофилы. Они фагоцитируют и разрушают патогены, секретируют цитокины и растворимые медиаторы, такие как гистамин, активные формы кислорода и оксида азота, антимикробные пептиды и белки. Этот тип клеток составляет первую линию защиты против инфекции, распознавая патогены с помощью ПАМП-распознающих рецепторов, и осуществляет связь с адаптивным звеном иммунитета, презентирруя антигены для В и Т клеток. Основными ПАМП-распознающими рецепторами у позвоночных являются Toll-подобные рецепторы, лектиновые рецепторы С-типа, NOD-подобные рецепторы и Rig I геликазы, которые распознают химические структуры, характерные для различных типов патогенов: липополисахариды, липопротеины, сложные гликаны, пептиды, содержащие формилметионин, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты и др. Эти рецепторы способны различать изомеры молекул и могут даже распознавать варианты полисахаридов, липидов или нуклеотидов для селективной активации различных сигнальных путей, индуцирующих специфические провоспалительные и антимикробные реакции системы врождённого иммунитета [26, 27]. Клетки миелоидного ряда также вовлечены в реализацию ранозаживления и функционирования тканей в норме [35].

Интересно отметить, что особенно важную роль фагоцитоз занимает в иммунном ответе у экзотермических позвоночных, поскольку в меньшей степени зависит от температуры в сравнении с реакциями адаптивного иммунитета [5].

Фагоцитирующие В клетки. У низших позвоночных В лимфоциты проявляют фагоцитарную активность, схожую с таковой у лейкоцитов, однако также способны продуцировать антитела классов IgG и IgA, вовлеченные в классические ответы адаптивного иммунитета, и естественные антитела (ЕАТ) изотипа IgM [36, 37]. Такие фагоцитирующие В клетки обнаружены у рыб, амфибий и рептилий [37, 38]. У млекопитающих большинство В клеток не проявляет фагоцитарной активности и, по-видимому, участвует только в реализации механизмов приобретенного иммунитета. Однако известна

субпопуляция В-1 лимфоцитов, сохраняющих фагоцитарную активность, как у низших позвоночных. Эти клетки локализованы в основном в брюшной и плевральной полостях, где продуцируют ЕАТ и презентируют фагоцитированные антигены CD4+ Т клеткам, участвуя в кооперации врожденного и адаптивного иммунитета [38].

Неспецифические цитотоксические клетки. Неспецифическая цитотоксичность является важным клеточным механизмом в реализации врожденного иммунного ответа позвоночных. У млекопитающих эта функция реализуется главным образом так называемыми естественными киллерами — ЕК лимфоцитами. Их цитотоксическое действие направлено против трансформированных или инфицированных вирусом клеток, а также внутриклеточных микробов [39]. Кроме того, ЕК лимфоциты секретируют противовирусные цитокины, такие как интерфероны и интерлейкины, участвуют в механизмах защиты печени и регенерации тканей, играют важнейшую роль в противопаразитическом иммунном ответе и защите слизистых оболочек [5].

Интраэпителиальные Т лимфоциты. Эпителий слизистых оболочек, в частности кишечника, содержит так называемые интраэпителиальные лимфоциты (ИЭЛ) [40]. По фенотипическим признакам большинство из них относится к Т лимфоцитам [41, 40], однако они имеют ряд общих характеристик с эффекторными клетками врожденного иммунитета. Например, в отличие от классических Т-клеток, отвечающих за формирование адаптивного иммунного ответа, они характеризуются низкой вариабельностью Т-клеточных рецепторов. ИЭЛ способны распознавать небелковые антигены, растворимые белки и молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), секретировать цитокины, активировать созревание дендритных клеток, привлекать макрофаги, проявлять цитотоксическую активность против трансформированных клеток. Они участвуют в поддержании целостности эпителия и взаимодействии с В- и Т-лимфоцитами [41].

1.1.3. Гуморальное звено врожденного иммунитета

В гуморальном звене врождённого иммунитета можно выделить регуляторные и эффекторные компоненты.

Цитокины. К основным регуляторным молекулам следует отнести цитокины. Эти белки опосредуют связь между различными клетками в реализации иммунного ответа. К ним относятся интерфероны (ИФН), интерлейкины (ИЛ), факторы некроза опухолей (ФНО), хемокины и трансформирующие ростовые факторы (ТРФ) [29, 42]. По своему влиянию их обычно разделяют на про- и противовоспалительные.

Интерфероны в основном участвуют в противовирусной защите, хотя проявляют и иммуномодулирующие функции [42]. Так, например, у амфибий ИФН I типа стимулирует активность ЕК-клеток [43]. Основные функции ИФН II типа включают в себя помимо противовирусной защиты регуляцию экспрессии молекул ГКГС, стимуляцию фагоцитоза, ингибирование роста клеток и апоптоз. У млекопитающих единственным ИФН II типа является ИФН- γ [5].

Интерлейкины, особенно у млекопитающих, являются одним из наиболее многочисленных семейств цитокинов. Они участвуют в пролиферации и дифференцировке клеток, в частности, лимфоидного и миелоидного ряда, хемоаттракции макрофагов и лейкоцитов, а также стимулируют синтез и секрецию различных веществ, в том числе других цитокинов, например ИФН- γ [5, 42].

Среди ФНО наиболее изученным и консервативным провоспалительным цитокином является ФНО- α ; он участвует в хемоаттракции лейкоцитов и стимуляции макрофагов [5]. Наиболее хорошо охарактеризованный из ТРФ — ТРФ- β — регулирует рост и дифференцировку клеток, участвует в созревании ооцитов, заживлении ран, модуляции воспалительного ответа, иммуносупрессии [44].

Белки острой фазы. В условиях инфекции и воспаления запускается синтез ряда белков, присутствующих в плазме крови и секретах эпителиальных клеток. У млекопитающих основными белками острой фазы являются С-реактивный белок

(СРБ), сывороточные амилоиды А и Р, гаптоглобин, $\alpha 1$ -кислый гликопротеин, $\alpha 2$ -макроглобулин, церулоплазмин, фибриноген [45]. Сывороточный амилоид Р и СРБ участвуют в распознавании патогенов, реакциях агглютинации, опсонизации и активации каскада комплемента. Сывороточный амилоид А участвует в хемоаттракции лейкоцитов и регуляции воспалительного ответа [45]. Гаптоглобин связывает свободный гемоглобин в сыворотке крови, предотвращая его окислительное повреждение, а также оказывает антимикробное и иммуномодулирующее действие [5]. Основной функцией $\alpha 1$ -кислого гликопротеина является инактивация таких молекул как липополисахариды и различные виды низкомолекулярных токсинов [45].

Церулоплазмин, $\alpha 2$ -макроглобулин и фибриноген имеют свою активность в норме, однако в условиях воспаления и инфекции их концентрация в плазме крови повышается. Церулоплазмин является медь-связывающим белком, который удаляет свободные радикалы. $\alpha 2$ -макроглобулин инактивирует токсины и протеолитические ферменты. Фибриноген участвует в восстановлении поврежденных тканей [45].

Следует отметить, что при воспалении уровень ряда белков наоборот снижается. Такие белки иногда называют негативными белками острой фазы. Основными из них являются альбумин и трансферрин [5, 45].

Естественные антитела. Естественные антитела (ЕАТ) были открыты в 60х годах прошлого века [46]. Они вырабатываются В-лимфоцитами спонтанно — без антигенной стимуляции, вызванной инфицированием или вакцинацией, — что подтверждается в том числе их обнаружением у гнотобиотических мышей [5]. ЕАТ преимущественно представлены иммуноглобулинами класса IgM и, в меньшей степени, IgG и IgA. Механизмы их образования ещё недостаточно изучены и могут быть многофакторными [47]. ЕАТ характеризуются низкой аффинностью, высокой авидностью, полиспецифичностью к аутоантигенам организма; некоторые из них способны связывать консервативные эпитопы чужеродных антигенов. Таким образом, ЕАТ обеспечивают защиту от патогенов и участвуют в элиминации клеточного дебриса и эндотоксинов [5, 48].

Система комплемента. Система комплемента — набор белков сыворотки крови, осуществляющих каскад реакций, результатом которого является опсонизация, усиление провоспалительного ответа и формирование мембран-атакующего комплекса, обеспечивающего лизис грамотрицательных бактериальных клеток [29, 49] (см. рис. 1.1). К настоящему времени описаны три пути активации каскада комплемента: классический, альтернативный и лектиновый [49, 50]. По классическому пути протеолитический каскад активируется иммунными комплексами антиген-антитело (обычно с участием антител классов IgG или IgM). В случае лектинового пути распознавание поверхностных бактериальных углеводов с помощью маннозо-связывающего лектина запускает активацию сериновых протеиназ, ассоциированных с маннозо-связывающим лектином, которые инициируют протеолитический каскад комплемента. Альтернативный путь заключается в самоактивации каскада реакций при спонтанном гидролизе белка комплемента C3 на микробной мембране [29, 49].

Антимикробные белки. Лизоцим. Секреты слизистых оболочек и плазма крови позвоночных животных содержат большое количество белков, обладающих антимикробной активностью. Одним из наиболее активных является лизоцим (мурамидаза) — фермент класса гидролаз, разрушающий пептидогликаны, входящие в состав клеточных стенок бактерий [29]. Высокая консервативность этого белка в многоклеточных организмах является убедительным доказательством его важной функции в реализации механизмов врожденного иммунитета: изоформы лизоцима обнаружены у рыб, амфибий, рептилий, птиц [5, 51]. Этот фермент присутствует в различных тканях организмов млекопитающих, секретируется железистыми и поверхностными эпителиальными клетками, экспрессируется нейтрофилами и макрофагами [31].

Антимикробные пептиды. Антимикробные пептиды (АМП), составляющие объект настоящего исследования, также относятся к гуморальному звену врожденного иммунитета — являются одними из основных эффекторных молекул многоклеточных организмов [5]. Они обладают прямой активностью

против широкого круга патогенов: вирусов, бактерий, грибов, паразитов и др. Их эффекты реализуются с использованием богатого арсенала механизмов: дестабилизации и повреждения мембран, формирования в них пор, связывания белков, ингибирования внутриклеточных мишеней, влияния на транскрипцию ДНК, остановки синтеза и фолдинга чужеродных белков [32]. Кроме того, для некоторых из них выявлено иммуномодулирующее действие [6] и участие в заживлении ран [52–55]. АМП экспрессируются как конститутивно, так и в ответ на инфицирование. Как уже упоминалось, они синтезируются и в иммунокомпетентных клетках, и в тканях организма, имеющих высокую вероятность контакта с патогенами из внешней среды, например, эпителиях слизистых оболочек и кожи [56]. Более подробно АМП будут рассмотрены в следующих разделах.

1.2. Антимикробные пептиды: основные структурные черты и классификация

Первые АМП были выделены и идентифицированы в 60-х годах XX века [6, 14], и на сегодняшний день их открыто внушительное количество. Например, база данных APD3 (The Antimicrobial Peptide Database¹), включающая в основном природные пептиды, содержит информацию о 3257 АМП, база данных DRAMP (Data repository of antimicrobial peptides²) — о 5841 АМП, а база данных DBAASP (Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides³) — более чем о 16000 пептидов, хотя в последнем случае более 80% структур синтетические. Большинство АМП имеет длину от 10 до 60 аминокислотных остатков (средняя длина по APD3 — 33.26 остатков) и является катионными молекулами (средний заряд по APD3 — +3.32) [15]. Наряду с основными аминокислотными остатками (аргинином, лизином, в меньшей степени гистидином), АМП содержат значительное количество остатков гидрофобных аминокислот (валина, лейцина, изолейцина, пролина, метионина, триптофана, фенилаланина). В функционально

¹ <https://wangapd3.com/main.php>, дата обращения 23.04.2021.

² <http://dramp.cpu-bioinfor.org/>, дата обращения 23.04.2021.

³ <https://dbaasp.org/>, дата обращения 23.04.2021.

активной молекуле АМП аминокислотные остатки, содержащие основные и гидрофобные боковые группы, как правило, пространственно разобщены, что придаёт ей амфипатические свойства [56, 57].

Высокое разнообразие АМП вызывает определённые трудности при их классификации. Они могут объединяться в группы по способу и источнику получения, типу активности, структурным характеристикам, присутствию большого количества остатков тех или иных аминокислот (рис.1.2) [15].

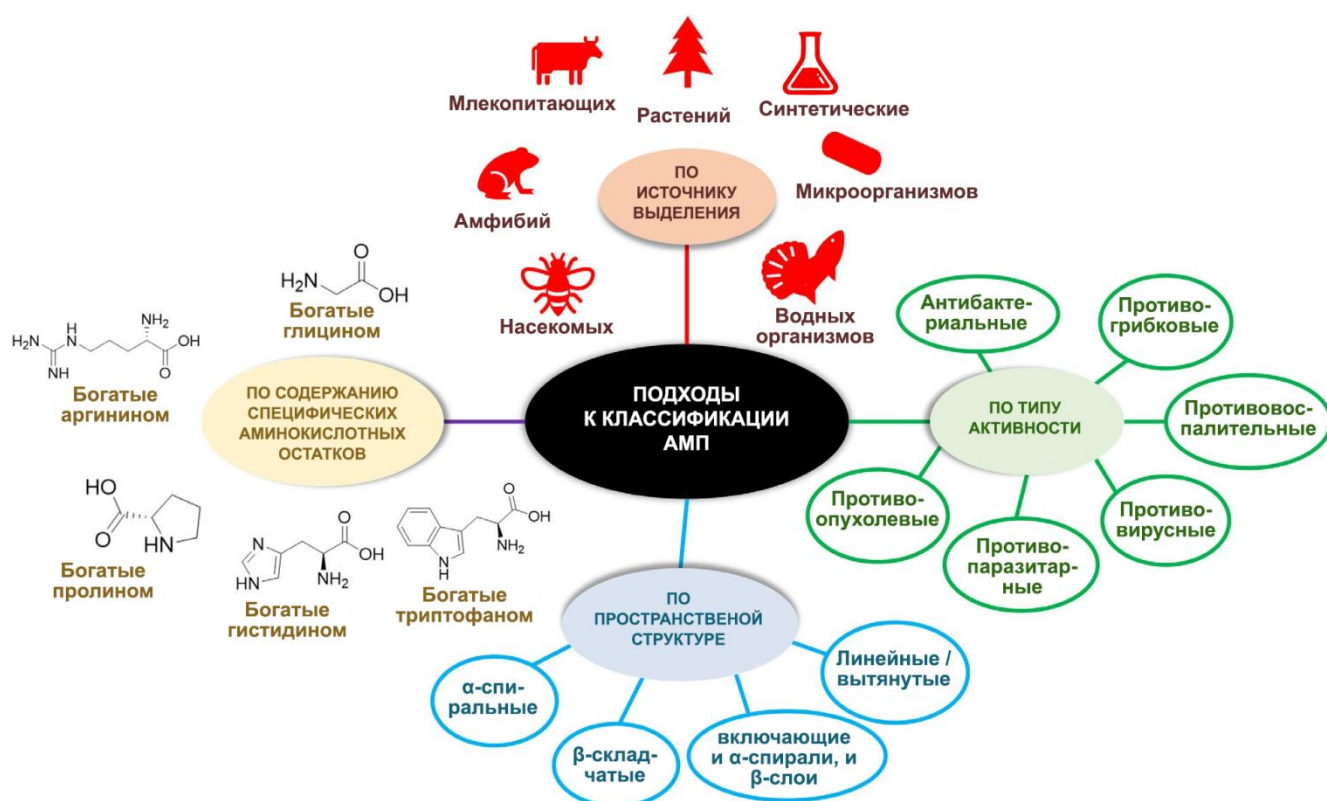


Рисунок 1.2. Различные подходы к классификации АМП [по 15].

Основными суперсемействами АМП у млекопитающих, присутствующими также и у других позвоночных, являются дефенсины и кателицидины [15].

Дефенсины обладают рядом общих структурных признаков, главным из которых является присутствие в молекуле 6 остатков цистеина, взаимодействующих с образованием 3 дисульфидных связей [58], большая часть молекулы при этом образует β-складчатую структуру [59]. Выделяют группы α-, β- и θ-дефенсинов [60, 61]. Дисульфидные связи у α-дефенсинов формируются между 1–6, 2–4 и 3–5 остатками цистеина, у β-дефенсинов — между 1–5, 2–4, 3–6.

Группа θ -дефенсинов интересна тем, что имеет полностью циклическую структуру основной цепи, сформированную за счёт ковалентного связывания «голова к хвосту» двух нонапептидов, образующихся из предшественника, филогенетически связанного с α -дефенсином [62, 63]. Благодаря циклической структуре и сети дисульфидных связей θ -дефенсины обладают высокой устойчивостью к протеолитической деградации в сыворотке и плазме крови, также они сохраняют антимикробную активность при повышении ионной силы (до 0,1 М), тогда как активность α - и β -дефенсинов в этих условиях резко снижается [59, 64].

Кателицидины в отличие от дефенсинов имеют между собой сильные различия в первичной и вторичной структуре активных молекул; среди них можно встретить и α -спиральные, и β -складчатые, и линейные пептиды, в том числе богатые той или иной аминокислотой [65, 7]. В то же время структура кодирующих эти пептиды генов высоко консервативна среди позвоночных, а *N*-концевые прочасти синтезирующихся первоначально молекул-предшественниц, не обладающих антимикробной активностью, называемые «кателиновым доменом», обладают высокой степенью гомологии. Именно кателиновый или иначе кателин-подобный домен и дал название этой группе пептидов; его наличие указывает на эволюционное родство кателицидинов с кателином — белком-ингибитором катепсина L (*cath*epsin **L** *in*hibitor) [65–67].

1.3. Особенности антимикробных пептидов с высоким содержанием пролина

Среди кателицидинов присутствует большое число интересных и высокоактивных пептидов. При этом одни из наиболее известных, наравне с единственным кателицидином человека LL-37, были выделены из организмов парнокопытных (протегрины и PR-39 свиньи, индолицидин коровы, бактенецины различных жвачных животных и др.), у которых, по текущим данным, отсутствуют гены α -дефенсинов [68].

Упомянутые PR-39 и бактенецины относятся к группе АМП, богатых остатками аминокислоты пролина. Эта группа необычна по своему механизму

действия: антимикробный эффект реализуется через внутриклеточные мишени без существенного повреждения мембран микроорганизмов [15, 17].

Видовое распространение. У млекопитающих все пептиды данного структурного класса относятся к семейству кателицидинов и обнаружены исключительно у представителей китопарнокопытных: коров [69], свиней [70], овец [71, 72], коз [72], а также дельфинов [73]. Большинство этих пептидов обладает определённой степенью структурной гомологии; пептиды коров, овец и коз, в связи с этим, имеют общее название бактенецины. К богатым пролином пептидам свиньи относятся PR-39 и профенины. Пептиды бутылконосого дельфина *Tursiops truncatus*, несмотря на сходство с бактенецинами, получили сокращённые названия в честь источника выделения — Tur1A и Tur1B.

Интересно отметить, что при исследовании нейтрофилов коровы, козы, овцы и других жвачных животных было выделено три типа гранул: помимо широко распространённых пероксидазо-негативных специфических и пероксидазо-позитивных азурофильных гранул был обнаружен ещё один вид пероксидазо-негативных гранул, отличающихся крупными размерами [74]. Эти крупные гранулы составляют у указанных животных основную популяцию гранул [74], и именно в них локализованы пролин-богатые АМП [17], что подчёркивает важную роль данных пептидов в иммунной защите.

Кроме млекопитающих АМП, богатые пролином, широко распространены среди членистоногих: крабов [75] и насекомых, включая ос, пчёл, мух и жуков [76–82]. Наиболее известными пролин-богатыми пептидами насекомых являются апидаецины медоносной пчелы *Apis mellifera* и онкоцины клопа *Oncopeltus fasciatus*, также к богатым пролином относятся дрозоцин фруктовой мушки-дрозофилы *Drosophila melanogaster* и пиррхокорин красного клопа *Pyrrhocoris apterus*.

Известные пути интернализации в бактериальные клетки. В отличие от подавляющего большинства АМП, имеющих своей мишенью бактериальную мембрану и тем самым способствующих лизису патогенных клеток [83], большая часть АМП, богатых пролином, в низких концентрациях подавляют рост бактерий

с использованием нелитического механизма [84–87]. Первоначально выявленное отсутствие лизиса поставило вопрос о том, каким путём эти пептиды попадают в бактериальные клетки. Эксперименты с использованием мутагенеза позволили идентифицировать два белка, участвующих в интернализации богатых пролином АМП: являющихся, вероятно, основным SbmA [21] и вспомогательным MdtM [22]. Белок SbmA локализован во внутренней мембране грамотрицательных бактерий и имеет молекулярную массу 46,5 кДа [21]. Он опосредует проникновение в клетку пролин-богатых АМП, а также других противомикробных агентов, используя электрохимический протонный градиент [88]. Среди грамотрицательных бактерий гомологи SbmA имеются у *Enterobacteriaceae*, включая рода *Escherichia* и *Salmonella*; у *Pseudomonadales*, включая *Pseudomonas* и *Acinetobacter baumannii*, а также у α - и ϵ -протеобактерий, таких как *Neisseria meningitis* и *Campylobacter*, соответственно [17, 18]. Белок MdtM также располагается во внутренней мембране, и, по-видимому, принимает вспомогательное участие в интернализации АМП [22], особенно при более высоких концентрациях пептида [17]. Наличие белков-переносчиков, вероятно, определяет преимущественную эффективность богатых пролином АМП в отношении грамотрицательных бактерий в сравнении с грамположительными [15, 17].

Внутриклеточные мишени действия. Первой предложенной мишенью ингибирования богатыми пролином пептидами был процесс трансляции [85], однако практическое подтверждение было получено для другой мишени — опосредованного шаперонами фолдинга белков [89]. При выделении и очистке с помощью аффинной хроматографии производных пиррокоридина, дрозидина и аналогов апицидина наблюдалась их коиммунопреципитация с шапероном DnaK [89]. Позднее также было показано связывание DnaK на N-концевых 35-аминокислотных фрагментах бактенецина Bac7 коровы, конъюгированных со 2-хлортритиловой смолой [90]. Методом рентгеновской кристаллографии было установлено, что пептиды связываются с субстратной щелью DnaK [91–93]. Однако сравнение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) против

штаммов *E. coli* с делецией *dnaK* с *E. coli* дикого типа не показала существенных различий в их чувствительности. Это дало основания полагать, что шаперон-зависимый фолдинг является не единственной мишенью действия богатых пролином АМП [90, 94]. Новые эксперименты по совместной иммунопреципитации меченых биотином молекул АМП с лизатом *E. coli* привели к идентификации в качестве альтернативной мишени рибосомных белков, и, таким образом, рибосом и процесса трансляции [94, 95]. Последующий анализ связывания и другие эксперименты показали, что рибосомальный синтез белка, скорее всего, является основным процессом, ингибируемым богатыми пролином АМП [94, 95].

Были также определены сайты связывания различных богатых пролином АМП, чтобы установить, насколько идентичным является их механизм действия. Первым рассмотренным пептидом стал онкоцин Onc112 [96, 97], затем были исследованы бактенецин Bac7 коровы, пептид металъниковин щитника зелёного древесного (*Palomas prasina*) и пиррхокорицин [98, 99], а также апидаецин Api137 [100] и Tur1A дельфина [73]. Было обнаружено, что все пептиды в вытянутой конформации связываются с выходным туннелем рибосомы и перекрывают путь синтезируемой цепи [73, 96–100]. Такая вытянутая конформация молекул АМП, вероятно, является следствием высокого содержания и взаимного расположения в их пептидной цепи остатков пролина, предотвращающих возможность формирования стандартной α -спирали [17, 18]. Связывание пептида в канале рибосомы обеспечивается рядом полярных контактов, а также стэкинг-взаимодействием [17, 18]. Например, для богатых пролином пептидов млекопитающих Bac7 и Tur1A показано, что их контакт с рибосомой обеспечивается преимущественно боковыми цепями аргинина [73, 98, 99]. К настоящему моменту выявлено два различных способа связывания, и соответственно, механизма ингибирования синтеза белка на рибосоме под действием богатых пролином АМП. На основе этого они разделены на два типа: пептиды типа I, включающие бактенецин Bac7, онкоцин, пиррхокорицин, металъниковин и Tur1A, блокируют синтез на первой стадии элонгации, тогда как

пептиды типа II, такие как апидецин 1b и его производное Ap137, действуют преимущественно на стадии терминации трансляции [17].

Интересно отметить, что между пептидами типа I присутствуют заметные различия в аминокислотном составе, количестве остатков и количестве устанавливаемых контактов внутри кармана связывания аминокислотного сайта рибосомы [73, 96–99]. У пептидов насекомых (онкоцина, метальниковина и пиррхокорицина) в этот карман попадают только четыре N-концевые аминокислоты [96–99], тогда как у пептидов Bac7 и Tur1A присутствует семь дополнительных аминокислот, которые образуют короткую петлю, закоривающую их в аминокислотном сайте, и, по-видимому, специфичную для богатых пролином АМП млекопитающих [73, 98, 99].

1.4. Функции и механизмы действия антимикробных пептидов

АМП обладают широким спектром активности в отношении бактерий, вирусов, грибов и даже клеток млекопитающих, однако молекулярные механизмы, благодаря которым они осуществляют своё действие, зачастую до конца не ясны и пока ещё недостаточно хорошо исследованы [11, 101, 102].

1.4.1. Антибактериальная активность

Наиболее изученной функцией АМП является прямая противомикробная активность, которая реализуется за счет:

– (1) разрушения клеточной мембраны за счет внеклеточного действия пептидов (этот процесс зависит от аминокислотной последовательности, структуры, общего заряда, амфипатичности пептида, а также состава самой мембраны) [103, 104];

– (2) вмешательства пептидов во внутриклеточные процессы после их интернализации (как правило, мембрана при этом остаётся интактной) [6, 104] (см. рис. 1.3).

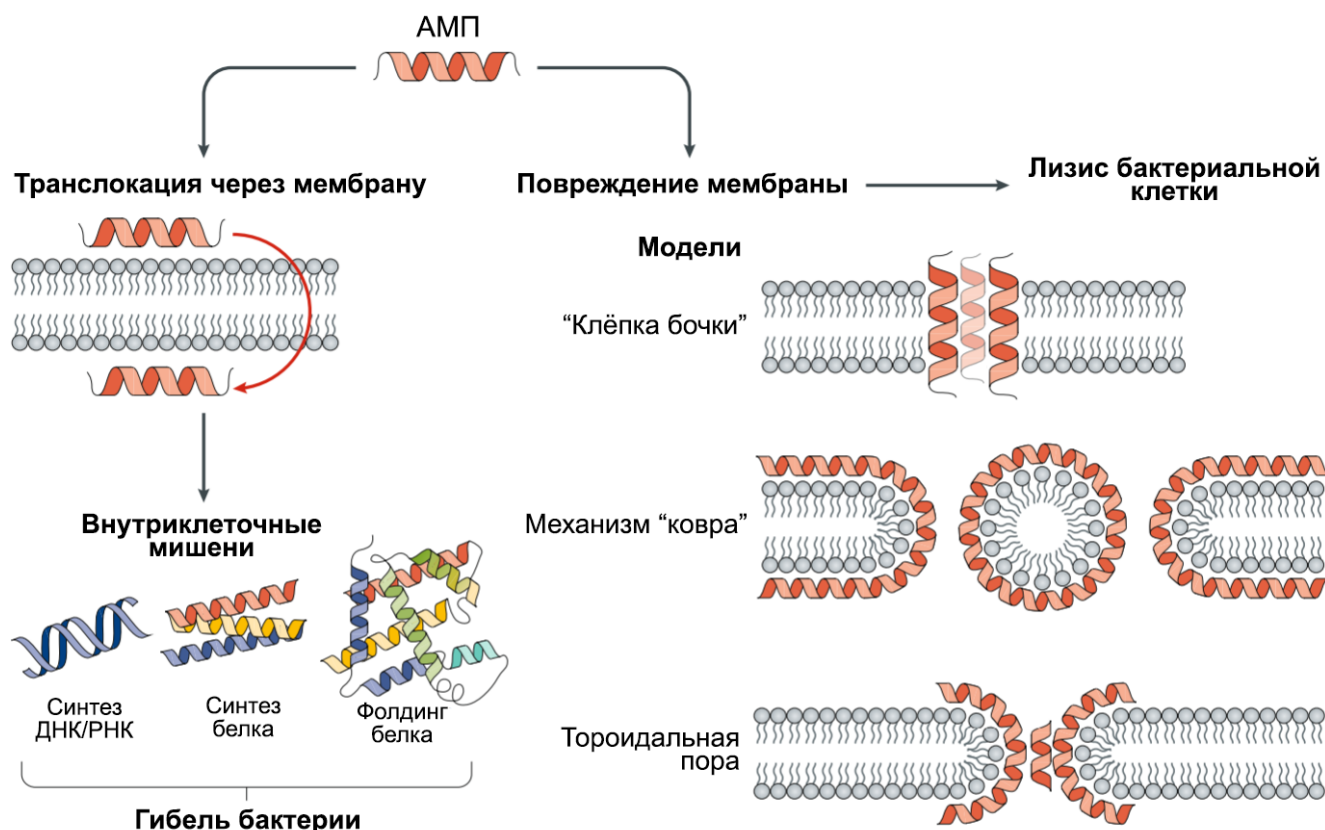


Рисунок 1.3. Модели антимикробного действия АМП [по 6]

Способ взаимодействия АМП с клеточными мембранами изучался различными методами, включая круговой дихроизм, рентгеновскую кристаллографию, ядерный магнитный резонанс, обратно фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию и поверхностный плазмонный резонанс [105, 106]. Было установлено, что независимо от дальнейшего сценария на первом этапе АМП электростатически взаимодействуют с анионной частью мембраны и дестабилизируют бактериальную оболочку [11].

На чувствительность клеток к АМП влияет состав мембран грамположительных и грамотрицательных бактерий. Оболочка грамположительных бактерий содержит липотеиновые, тейхуроновые и тейхоевые кислоты, а также кислые полисахариды [107, 108].

Отрицательные заряды на мембране грамотрицательных бактерий обеспечиваются фосфатными группами липополисахаридов (ЛПС), а также анионными фосфолипидами, такими как кардиолипин и фосфатидилглицерин [3, 109]. Положительно заряженные АМП легко взаимодействуют с отрицательно

заряженными сайтами связывания двухвалентных катионов ЛПС на поверхности клетки и проникают сквозь внешнюю мембрану по механизму, известному как «self-promoted uptake» (дословно «самоусиливающийся захват»), заключающемся в том, что уже взаимодействующие с мембраной молекулы пептида облегчают проникновение через неё последующих [110, 111].

Мембранолитическое действие АМП. Большинство хорошо исследованных и подробно охарактеризованных АМП являются порообразователями, т.е. нарушают барьерную функцию бактериальных мембран [112]. Существуют разные модели, описывающие подобный сценарий их действия: это и классические «клёпка бочки», тороидальная пора и модель «ковра» [83, 113, 114], и новые модели молекулярной электропорации, тонущего рафта и др. [115–119].

Согласно модели «клёпки бочки» после контакта с поверхностью мембраны мономеры пептидов на поверхности клетки претерпевают конформационные изменения, агрегируют и встраиваются в липидный бислою с образованием мультимерной водной поры, которую молекулы пептида выстилают подобно доскам в стенках бочонка. Гидрофобные участки АМП вступают в контакт с ацильными цепями фосфолипидов мембраны, а гидрофильные образуют канал поры, расширяющийся по мере увеличения количества агрегировавших пептидов [107]. На сегодняшний момент единственным известным АМП, отвечающим этой модели является спиральный пептид аламетицин, выделенный из гриба *Trichoderma viride* [106, 107, 120].

В модели «тороидальной поры» молекулы пептида, расположенные первоначально параллельно бислою, с увеличением концентрации дестабилизируют мембрану и поворачиваются перпендикулярно бислою, в то же время сохраняя его целостность — внутренняя часть поры похожа на отверстие в бублике-тороиде: оно, как и остальная поверхность мембраны, оказывается выстелено головками мембранных фосфолипидов, а не только молекулами пептида. Такая структура поры позволяет пептидам проникать во внутренний листок мембраны, а распад пор вызывает высвобождение пептидов во

внутриклеточное пространство, где они могут также ингибировать ключевые процессы жизнедеятельности, такие как репликация ДНК и синтез белка, вызывая гибель бактерий [121, 122]. Эта модель была предложена для таких АМП как магейнин 2, протегрин-1, цекропин А [107].

Модель «ковра» описывает случай, при котором молекулы АМП остаются параллельными поверхности клетки, не встраиваясь в липидный бислой и покрывают его своеобразным пептидным «ковром». Когда концентрация пептидов становится критической, их самопроизвольное вращение вызывает повышение текучести мембраны, переориентацию фосфолипидов, образование мицелл и разрушение бислоя [121]. Примерами АМП, реализующих эту модель, являются цекропин Р1, дермасептин и кателицидин человека LL-37 [107].

Модель «тонущего рафта» имеет логическое сходство с моделью тороидальной поры и не является строго мембранолитической. Пептиды связываются с клеточной мембраной и вызывают значительное изменение её кривизны, что позволяет образоваться временным трансмембранным порам и обеспечить попадание пептидов на внутреннюю сторону мембраны [11].

Модель «щелевой протечки» также имеет некоторые сходства с моделью тороидальной поры, с той разницей, что в данном случае АМП образуют связанный с липидами линейно протяжённый амфипатический матрикс, где молекулы пептида обращены к бислою гидрофобной стороной. В результате формируются временные фибриллярно-вытянутые олигомерные структуры, напоминающие щели, где мембрана приобретает сильную положительную кривизну, и происходит повышение её проницаемости [119].

При исследовании процесса электропорации — образования пор в мембране под действием внешнего электрического поля — было установлено, что в случае использования коротких импульсов для образования пор требуется напряжение на мембране порядка 1 В [123]. При приложении электрического поля в течение более длительного периода времени ($> 0,1$ мс) этот порог снижается примерно до 0,2 В [124]. Модель «молекулярной электропорации» подразумевает, что катионные молекулы АМП, связавшиеся с поверхностью мембраны, способны

создать высокую плотность заряда и разность электрических потенциалов на мембране не менее 0,2 В, тем самым инициировав образование пор [115].

Еще одна модель — «пептид-индуцированной сегрегации липидов» — была предложена при исследовании взаимодействия пептидов с липидными компонентами мембраны. Согласно ей связывание АМП вызывает группировку анионных липидов в пептид-липидные домены и их сегрегацию от цвиттерионных липидов, что вызывает изменение мембранной организации с возможными значительными последствиями для жизнеспособности и выживания клеток (например, нарушением работы мембран-ассоциированных белков и белковых комплексов) [107, 119].

Существуют и другие модели, описывающие те или иные аспекты влияния пептидов на мембранный бислой и его компоненты, хотя следует отметить, что большинство как перечисленных, так и не упомянутых здесь моделей были получены при рассмотрении модельных мембран [6, 11, 56].

В дополнение к нарушению целостности бактериальных мембран показано, что АМП могут также влиять на синтез компонентов клеточной стенки. Так, например, для α -дефенсина-1 и β -дефенсина-3 человека описана способность связывать липид II, являющийся промежуточным продуктом при синтезе пептидогликана [125–127].

Внутриклеточные мишени действия АМП. На примере особенностей богатых пролином АМП в п. 1.3 уже были разобраны некоторые возможные внутриклеточные мишени действия пептидов, а именно этап трансляции при рибосомальном синтезе белка и шаперон-зависимый фолдинг белковых молекул. Помимо синтеза белка АМП могут влиять на биосинтез нуклеиновых кислот, вызывая деградацию их молекул или влияя на ключевые ферменты, вовлечённые в соответствующие процессы [15]. Так, например, кателицидин коровы индолицидин, богатый остатками триптофана, способен специфически взаимодействовать с АП-сайтами (апуриновыми/апиримидиновыми сайтами) и вызывать сшивку одно- или двуцепочечных молекул ДНК, а также ингибировать ДНК-топоизомеразу I [128]. Другой АМП ТС24, представляющий собой 24-

аминокислотный С-концевой фрагмент ингибитора сериновых протеиназ TFPI-1 (Tissue factor pathway inhibitor 1), выделенного из морских языков — рыб *Cynoglossus semilaevis*, после повреждения клеточной мембраны проникает в цитоплазму и способствует разрушению ДНК и тотальной РНК [129].

1.4.2. Противогрибковая активность

Возможности АМП как противогрибковых агентов также привлекают интерес исследователей. Сопутствующие другим патологиям заболевания грибковой природы, поражающие кожу и слизистые оболочки широко распространены, а системные заболевания, вызванные такими видами, как *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* и *Histoplasma capsulatum*, являются причиной гибели до 1,5 миллионов человек ежегодно [130]. Проблема осложняется как развитием резистентности к применяемым препаратам, так и ростом количества иммунокомпрометированных пациентов.

Для АМП описаны различные механизмы активности против клеток грибов, однако предполагается, что они главным образом нарушают целостность мембран и работу митохондрий [131, 132]. Например показано, что кателицидин человека LL-37 разрушает цитоплазматические мембраны клеток *Candida albicans* до отдельных везикул [133], в целом сходно с действием АМП против бактерий. При этом селективность цитотоксического действия в сравнении с клетками организма человека связывают с различием в фосфолипидном и стероидном составе мембран высших и низших эукариот [134].

1.4.3. Противовирусная активность

Противовирусное действие АМП является недостаточно исследованной, но активно расширяющейся в последние годы областью. *In vitro* продемонстрирована активность АМП, в том числе дефенсинов и кателицидинов, против оболочечных вирусов (вируса гриппа, респираторно-синцитиального вируса, вируса Зика), проявляющаяся в нарушении целостности мембранной оболочки, в результате чего вирусы теряют вирулентность [135] (рис.1.4).

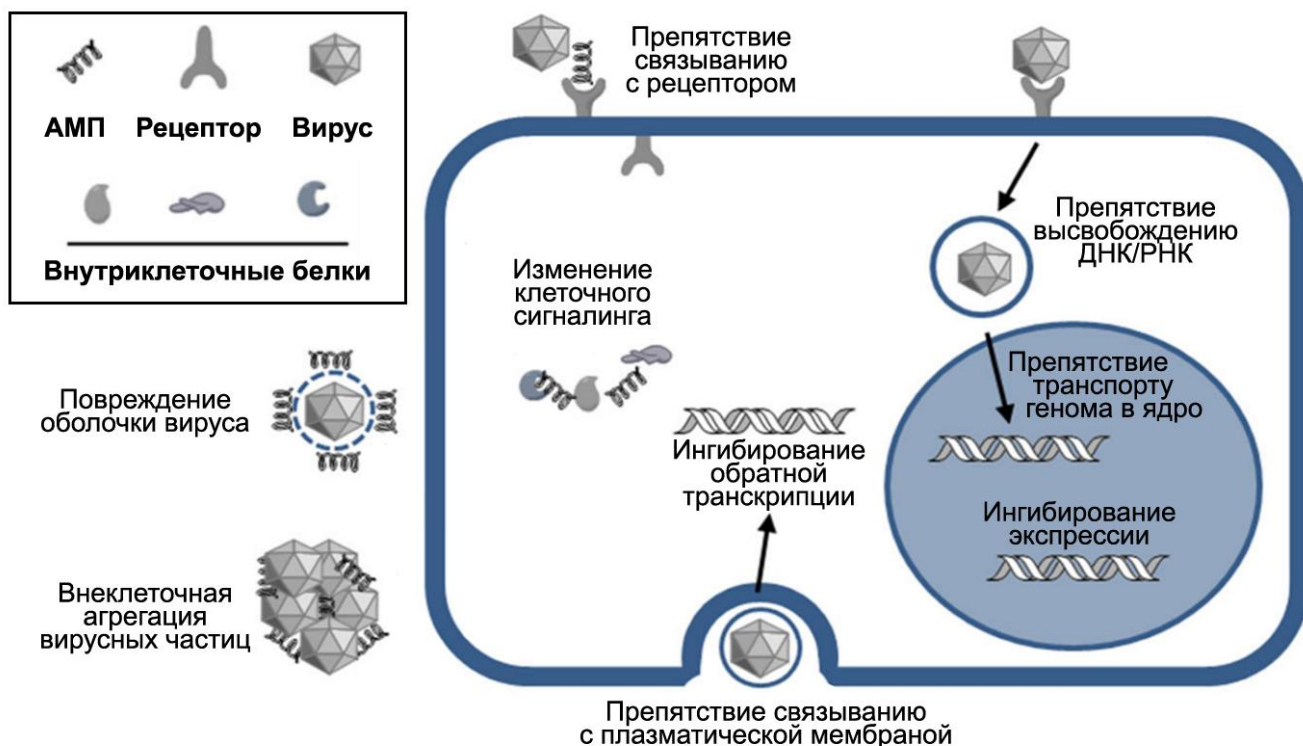


Рисунок 1.4. Механизмы противовирусной активности АМП [по 136].

АМП демонстрируют активность и против безоболочечных вирусов: риновирусов, аденовирусов, вируса папилломы человека. Они способны нарушать их репликацию или связывать капсидные белки, предотвращая разборку вирусной частицы и проникновение генома вируса в ядро клетки [137, 138].

Против таких вирусов, как вирус простого герпеса и вирус иммунодефицита человека, показан дополнительный механизм, заключающийся в специфическом связывании рецепторных молекул, опосредующих проникновение вируса внутрь клетки [139, 140]. Кроме того, противовирусные эффекты АМП могут проявляться в агрегации вирусных частиц, ингибировании ферментативной активности протеинкиназы С, а также через не прямое иммуномодулирующее действие пептидов: стимуляцию фагоцитоза и модуляцию цитокинового ответа (рис. 1.4) [141, 142].

1.4.4. Противоопухолевое действие

Несмотря на беспрецедентные успехи в развитии медицины за последние пятьдесят лет, серьезной угрозой жизни и здоровью человека остаются

онкологические заболевания [143, 144]. Химиотерапевтические препараты, применяемые в сочетании с хирургическим вмешательством и лучевой терапией или в дополнение к ним играют важную роль в продлении жизни онкологических больных. Опухоли представляют собой клоны быстро делящихся клеток, вышедшие из-под контроля нормальных механизмов подавления клеточного роста, и химиотерапия направлена на вмешательство в этот неконтролируемый процесс деления [3]. Однако многие применяемые химиопрепараты не обладают специфичностью непосредственно к трансформированным клеткам [145] и повреждают также здоровые клетки, для которых характерна быстрая пролиферация, что обуславливает побочные токсические эффекты. Еще одной проблемой является развитие резистентности у опухолевых клеток [4]. Таким образом, востребованной альтернативой являются классы соединений, обладающие специфическим действием на опухолевые клетки, низкой токсичностью для нормальных клеток и низкой тенденцией к развитию к ним устойчивости. АМП во многом удовлетворяют названным критериям, поскольку имеют низкую склонность вызывать развитие устойчивости у мишеней своего действия, и возможная быстрая пролиферация не оказывает существенного влияния на уровень их токсичности в отношении здоровых клеток [3, 146].

Основы селективности АМП к опухолевым клеткам. Основой противоопухолевых свойств АМП, как и их антибактериальной активности, является избирательное распознавание клеток-мишеней за счёт электростатического взаимодействия с отрицательно-заряженными элементами на их мембранах [3]. Сопоставление активности L- и D-энантиомеров показало, что такие взаимодействия как правило не опосредуются специфическими рецепторами [147, 148], и основным требованием является амфипатическая структура пептида без привязки к определённому аминокислотному паттерну, а сама последовательность модулирует в большей степени специфичность или спектр активности [3].

Причиной специфичности некоторых АМП к опухолевым клеткам может быть присутствие кислого фосфолипида фосфатидилсерина (ФС, 3–9% от общего

количества фосфолипидов) во внешнем листке их плазматической мембраны [3, 11, 149]. В нормальных клетках млекопитающих ФС обычно локализован на внутренней стороне цитоплазматической мембраны и переносится на внешний листок, как правило, в процессе апоптоза [150, 151]. Следовательно, такое изменение асимметрии мембраны, присущее апоптотическим клеткам и некоторым типам опухолевых клеток, способствует их распознаванию и клиренсу моноцитами [152, 153]. Другими факторами, способствующими увеличению отрицательного заряда на поверхности опухолевых клеток, могут выступать сульфаты гепарина и O-гликозилированные муцины [3]. Однако, так или иначе, плотность заряда на опухолевых клетках оказывается ниже по сравнению с клетками бактерий, хотя бы из-за того, что ФС имеет только одну фосфатную группу, а такие молекулы, как ЛПС и липотейхоевые кислоты — по несколько. В результате сродство АМП к опухолевым клеткам по своей природе оказывается более слабым, чем к бактериальным [3]. Следует, однако, отметить, что повышенный отрицательный заряд не всегда гарантирует высокую активность. Как показали Fadnes и др., гепарин-сульфат на клеточной поверхности может ингибировать АМП быка лактоферрицин В, перехватывая пептид до достижения им липидной мембраны [154].

Мембраны опухолевых клеток обладают и другими свойствами, которые могут способствовать преимущественному действию на них АМП в сравнении с мембранами нормальных клеток. Некоторые трансформированные клетки содержат меньшее количество холестерина в мембранах, что придаёт им повышенную текучесть. Так происходит, например, при лейкозе и раке легких у человека, если сравнивать с текучестью мембран и содержанием холестерина в нормальных лейкоцитах и клетках легкого [155, 156]. Повышение текучести мембран может усиливать литические эффекты АМП, что было продемонстрировано на примере цекропинов и других пептидов [157, 158]. С другой стороны, некоторые виды опухолевых клеток (например, при раке простаты) напротив содержат повышенные уровни холестерина в составе липидных рафтов [159, 160]. Таким образом, влияние содержания холестерина на

активность катионных противоопухолевых пептидов остается не до конца понятным. Некоторые оболочечные вирусы также чувствительны к АМП (например, LL-37 активен против вирусов простого герпеса и гриппа), несмотря на высокое содержание холестерина (в липидных рафтах) в составе маскирующих их мембран [161].

Еще одним свойством опухолевых клеток, которое может способствовать связыванию АМП, является повышение площади их поверхности за счёт увеличения количества микроворсинок [162].

Механизмы противоопухолевого действия АМП. По современным представлениям, АМП реализуют противоопухолевый эффект благодаря следующим механизмам: рекрутированию иммунных клеток, таких как дендритные клетки, для уничтожения клеток опухоли; непосредственно индукции некроза или апоптоза в опухолевых клетках; ингибированию или активации в этих клетках определенных регуляторных функциональных белков для прекращения транскрипции и трансляции генов; а также ингибированию ангиогенеза, что приводит к затруднению доставки питательных веществ к опухоли и предотвращению метастазирования [15, 163].

Непосредственные повреждения при контакте с малигнизированными клетками АМП наносят либо за счёт разрушения мембран, либо, проникая внутрь клетки, атакуют митохондрии и другие внутриклеточные мишени, что в большинстве случаев приводит к апоптозу [3].

Примерами селективных мембранолитических противоопухолевых АМП являются магейнин 2 и гомезин. Scusiani и др. [164] показали избирательную активность магейнина 2 и его аналогов как в отношении клеток солидных опухолей, так и опухолей кроветворной и лимфатической систем (гемобластозов). При этом эффект развивался быстро (в течение 1 часа) при концентрации 12 мкг/мл, а против нормальных лимфоцитов токсического действия не наблюдалось при концентрациях до 200 мкг/мл. Помимо повреждения мембраны было отмечено воздействие АМП на митохондрии, приводящее к ингибированию процесса дыхания и утечке глюкозы через образованные пептидом поры [165].

АМП гомезин (ZCRRLCYKQRCVITYCRGR) был успешно использован в составе крема для местного применения в мышинной опухолевой модели [166, 167].

Ещё одним примером является лактоферрицин В — производное белка лактоферрина из коровьего молока. В дополнение к своим антимикробным свойствам [168, 169] он демонстрирует повышенную активность против опухолевых клеток в сравнении с нормальными [170, 171]. Была показана эффективность лактоферрицина В *in vivo* у мышей: пептид успешно ингибировал рост ксенотрансплантатов нейробластомы [172]. Хотя пептид также был локализован в митохондриях и наблюдалась активация каспазы, основным цитотоксическим механизмом было признано мембранолитическое действие, поскольку пан-ингибирование ферментативного каскада каспаз не приводило к устранению токсического действия. В дальнейшем при оптимизации структуры пептида путём укорочения и замены триптофана на 3,3-дифенилаланин в определенном положении удалось добиться повышения селективности (по сравнению с влиянием на нормальные клетки), а также, что более примечательно, был выявлен двойной цитолитическо-иммуногенный механизм противоопухолевого действия пептида [173, 174]. Лизис опухоли индуцировал высвобождение из гибнущих опухолевых клеток ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов (DAMP) в дополнение к антигенам.

Наиболее распространенным нелитическим механизмом противоопухолевого действия АМП является индукция апоптоза в опухолевых клетках [3, 11]. Некоторые АМП могут одновременно вызывать нарушения в мембране и проникать в клетки, другие нелитические АМП могут так или иначе проходить через мембрану (путём транслокации, пиноцитоза и др.) и достигать внутриклеточных компартментов. В обоих случаях пептиды, как правило, разрушают митохондрии и вызывают запрограммированную гибель клеток. Примером таких АМП является пардаксин (GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSGGQE), 33-аминокислотный АМП, выделенный из морских рыб *Pardachirus marmoratus*. Пардаксин может самостоятельно проникать в опухолевые клетки без дополнительной конъюгации

с векторными молекулами. Показано, что он вызывает апоптоз клеток плоскоклеточного рака кожи за счет активации каспазы 3 [175]. Такие АМП могут использоваться для доставки противоопухолевых препаратов в раковые клетки. Примерами подобной стратегии являются работы с одним из богатых пролином кателицидинов PR39 (RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPP), который был использован для переноса в клетки рака молочной железы миРНК (малой интерферирующей РНК), ингибирующей ген сигнального белка и активатора транскрипции STAT3 [176].

1.4.5. Иммуномодулирующее действие

Первой из открытых функций АМП, помимо прямой антимикробной активности, была способность привлекать лейкоциты [177]. Это открытие послужило толчком к интенсивному исследованию других иммуномодулирующих возможностей АМП. Проведенные на сегодняшний день исследования говорят о том, что молекулярные механизмы, обуславливающие способность АМП селективно модулировать иммунный ответ, являются сложными и многокомпонентными. Они могут включать проникновение пептида внутрь клетки, опосредоваться рецепторами, сопряженными с G-белками, или взаимодействием с рядом внутриклеточных сигнальных молекул или рецепторов, затрагивать сигнальные пути (ядерный фактор NF-κB, p38, киназы MAPK, MKP1, PI₃K) и работу транскрипционных факторов и т.п. [178, 179]. Многообразие иммуномодулирующих эффектов АМП иллюстрирует рисунок 1.5.

Защитная активация иммунной системы антимикробными пептидами — один из ключевых механизмов, позволяющих им быстро элиминировать патогены на раннем этапе и предотвращать развитие инфекции [180]. АМП привлекают лейкоциты, модулируют активность нейтрофилов, а также антиген-специфичные реакции адаптивного иммунитета [6]. Показано, что пептиды с одной стороны сами являются хемоаттрактантами для различных типов иммунных клеток (нейтрофилов, макрофагов, тучных клеток, Т клеток и др.) [6, 181], а с другой могут стимулировать выброс специфических хемокинов [178, 182, 183].

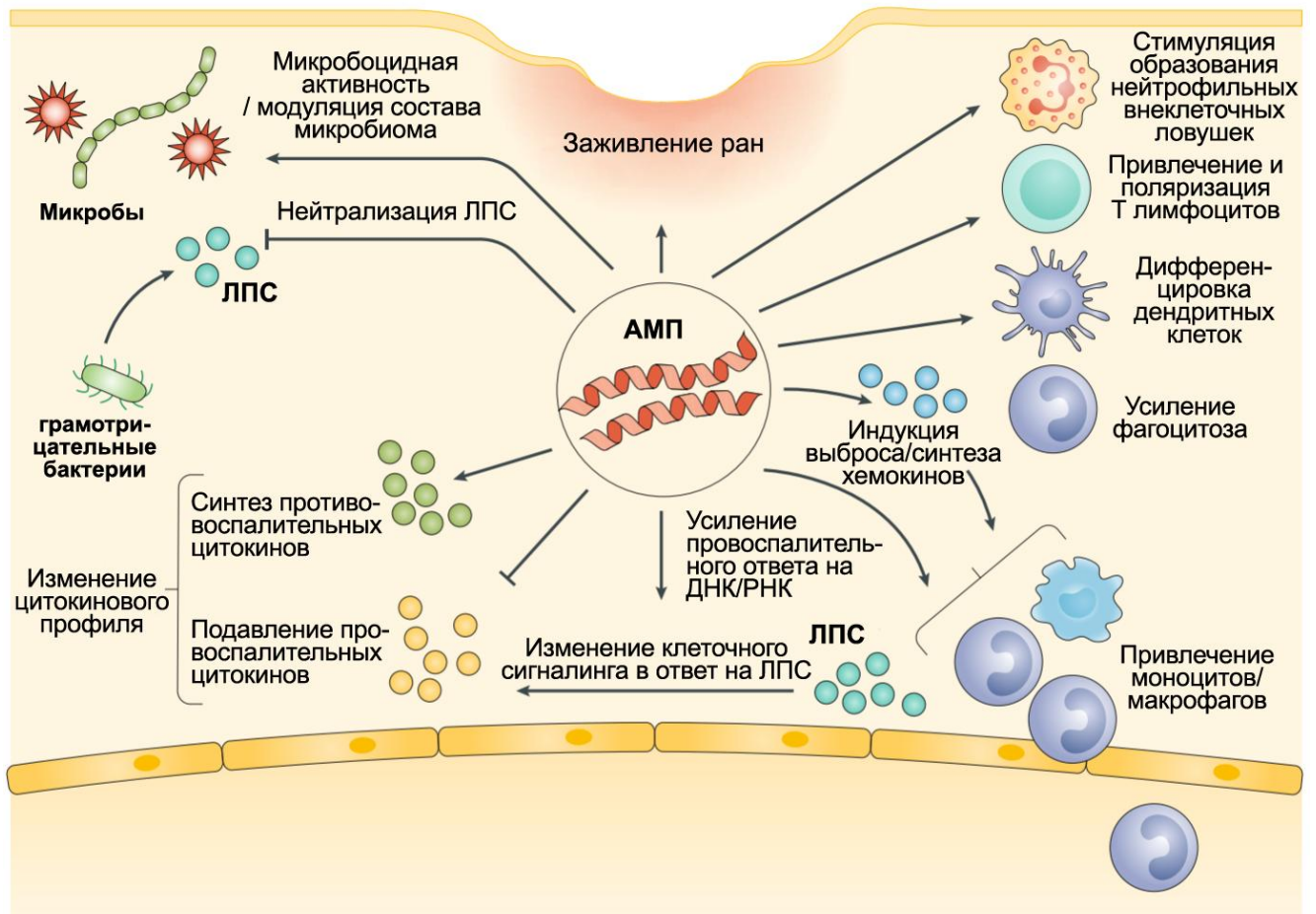


Рисунок 1.5. Иммуномодулирующие функции антимикробных пептидов [по 6].

Антимикробные пептиды обнаружены также в нейтрофильных внеклеточных ловушках (NETs), что говорит об участии этих молекул в данном виде иммунного ответа [184]. Например, показано, что при инфекционном процессе, вызванном вирусом гриппа, кателицидин LL-37 способствует формированию NETs.

АМП служат связующим звеном врожденного и приобретенного иммунитета. Они не только способны привлекать в очаг инфекции антиген-презентирующие клетки (моноциты/макрофаги и дендритные клетки), но также усиливать процесс фагоцитоза, способствуя скорейшему снижению бактериальной нагрузки, и стимулировать и направлять адаптивные иммунные реакции [6]. Например, β -дефенсины человека 2 и 3 запускают синтез интерферона α дендритными клетками и, таким образом, вызывают формирование Т клеточных ответов [185]. Присутствие β -дефенсина 3 также повышает экспрессию костимулирующих молекул CD80, CD86, CD40 на

поверхности клеток миелоидного ряда, таким образом облегчая развёртывание реакций приобретенного иммунитета за счёт вовлечения Toll-подобных рецепторов [186]. LL-37 также способствует синтезу костимулирующих молекул, влияя на дифференцировку и функционирование дендритных клеток, что подтверждается опытами *in vitro* [187] и *in vivo* [188], стимулирует их активацию [189], а через активацию фолликулярных дендритных клеток запускает также активацию и пролиферацию В лимфоцитов [190].

Помимо провоспалительных имеют место и опосредованные АМП противовоспалительные эффекты, что говорит о регуляторной роли пептидов в предотвращении чрезмерного воспалительного ответа и обеспечении иммунного гомеостаза организма. Противовоспалительную роль АМП иллюстрирует, например, эксперимент с генетически модифицированными мышами, в организме которых отсутствовали кателицидины. Такие животные демонстрировали формирование более мощного воспалительного ответа по сравнению с мышами дикого типа [191].

Кроме того, есть данные о наличии взаимодействия АМП и микробиоты слизистых оболочек организма, поддерживающее баланс симбиотических микроорганизмов [192].

Таким образом, АМП являются перспективным объектом для разработки модуляторов системного и местного иммунного ответа [6].

1.5. Применение антимикробных пептидов в терапевтических целях: перспективы, проблемы, стратегии оптимизации свойств

1.5.1. Преимущества и перспективы практического применения

АМП имеют ряд преимуществ перед конвенциональными антибиотиками и потому рассматриваются как перспективные прототипы новых антибактериальных препаратов [9, 193]. Во-первых, действие АМП часто основано на неспецифических механизмах и одновременно нацелено на множество мишеней (т.е. реализуется комбинация двух и более антимикробных механизмов, описанных в п.1.4.1); благодаря этому, АМП обладают широким

спектром действия, включающим активность против патогенов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [193, 194]. Во-вторых, АМП отличаются высокой эффективностью против грамотрицательных бактерий, наружная мембрана которых действует как дополнительный барьер, непроницаемый для многих классических антибиотиков [195]. АМП могут разрушать эту мембрану или проникать через неё. Третьим преимуществом АМП можно считать сравнительно низкую вероятность возникновения лекарственной устойчивости к этим соединениям [196]. Неспецифичность механизмов (повреждение мембраны, связывание различных отрицательно заряженных внутриклеточных биомолекул, индукция окислительного повреждения) [197] и то, что воздействие на соответствующие клеточные мишени, как правило, не опосредовано специфическим связыванием с белками, затрудняет выработку бактериями эффективных мер противодействия и, соответственно, развитие лекарственной устойчивости [194, 196]. Ещё одним ключевым фактором, усложняющим развитие резистентности, является быстрота, с которой АМП реализуют своё действие, — это ограничивает время для экстенсивного роста колонии бактерий и отбора устойчивых мутантных штаммов [196, 198].

Кроме того, некоторые АМП проявляют синергизм с конвенциональными антибиотиками [199–201] и их совместное применение может замедлить селекцию устойчивых бактерий [8]. Ряд АМП, например, LL-37, также демонстрирует антибиоплёночную активность *in vivo* [202–204], что повышает их перспективность как потенциальных терапевтических препаратов. В том числе для борьбы с трудноизлечимыми полимикробными инфекциями [2].

Помимо прямого использования существуют также предложения по применению АМП, например, в виде пептидного покрытия катетеров для предотвращения развития катетер-ассоциированных инфекций [205].

АМП предлагается использовать для профилактики и лечения различных клинических состояний, не только бактериальных инфекций. Так, ведется разработка противогрибковых препаратов на основе АМП. Например, пептид РАС113 на основе гистатина 5, содержащегося в слюне, по результатам I и II фаз

клинических испытаний признан безопасным и эффективным против орального кандидоза. На рынке доступны препараты на основе PAC113: жидкость для полоскания и спрей для полости рта и антибактериальный крем для рук [206]. Несмотря на сравнительно малое на сегодняшний день число АМП с установленной противовирусной активностью, они уже привлекают интерес и как возможные противовирусные агенты. Также предпринимаются усилия по разработке иммуномодулирующих препаратов на их основе [6]. В лечении опухолей, как уже упоминалось, одним из ключевых привлекательных свойств АМП является возможность различать нормальные и малигнизированные быстро делящиеся клетки, при этом пептиды рассматриваются и как возможные самостоятельные лекарственные агенты и как прототипы систем доставки других химиопрепаратов [3, 11].

1.5.2. Текущие успехи клинических испытаний

На основе большого количества многообещающих доклинических данных были начаты и клинические испытания препаратов на основе АМП для их последующего применения в медицине [8]. Однако к настоящему моменту ограниченное число средств успешно вышло на рынок [6]. Если не учитывать пептидные препараты бактериального происхождения, такие как полимиксины, грамицидин, даптомицин и одобренный изначально как пищевой консервант низин, а также близкий к ним по структуре полусинтетический липогликопептид далбаванцин, разрешённый в США для внутривенного введения при лечении острых кожных инфекций, то среди АМП животного происхождения остаётся отметить только меллитин и аналог гистатина пептид PAC113 [6, 8]. PAC113 допущен к продаже на Тайване в качестве местного средства для лечения кандидоза полости рта [6]. Мелиттин — 26-аминокислотный α -спиральный пептид, являющийся преобладающим (40–48%) компонентом яда европейской медоносной пчелы *Apis mellifera* [207], — благодаря своим противовоспалительными свойствами [208] одобрен FDA (управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) для снятия боли и отека при ревматоидном артрите, тендините, бурсите и

рассеянном склерозе [209, 210]. В экспериментах *in vitro* и в моделях на животных была также показана его эффективность против опухолевых клеток [211], вирусов [212] и антибиотикоустойчивых бактерий [213]. Есть вероятность, что как и для низина, в настоящее время также применяющегося в стоматологической практике и ряде фармацевтических средств для лечения язвы желудка и инфекций толстой кишки [214, 215], клиническое применение мелиттина в дальнейшем может быть расширено за рамки уже одобренных FDA целей [8].

Несмотря на то, что частота неудач при клинических испытаниях АМП остаётся высокой, количество тестируемых пептидов быстро растет [6]. На данный момент порядка 20 АМП животного происхождения и близких к ним по структуре синтетических пептидов и приблизительно столько же пептидных препаратов на основе бактериальных АМП проходят различные этапы клинических испытаний [9, 216]. Среди производных природных АМП и белков позвоночных можно отметить проходящие III фазу клинических испытаний POL7080 и омиганан. POL7080 представляет собой циклический аналог кателицидина свиньи протегрина-1, имеющего конформацию β -шпильки. Он предназначен для внутривенного введения при ИВЛ-ассоциированной пневмонии [9]. Омиганан (Omiganan, CLS001) разработан на основе обогащенного триптофаном кателицидина коровы индолицидина, состоит из 12 аминокислотных остатков и предлагается для поверхностного применения при терапии розацеа. Также данный пептид проходит фазу II клинических испытаний как местный препарат против акнэ, атопического дерматита и вагинальной интраэпителиальной неоплазии [9]. Также на II этапе клинических испытаний находится α -спиральный 24-аминокислотный пептид OP-145 на основе кателицидина человека LL-37, который предполагается использовать при хронических инфекциях среднего уха [217]. В рамках разработки иммуномодулирующих препаратов на основе АМП клинические испытания (фазу II) проходит также и сам LL-37 — как препарат для местного применения при лечении хронических сложно излечимых трофических язв на ногах [6, 9, 218]. Ещё одним примером испытаний иммуномодулирующих АМП является недавнее

исследование силикон-гидрогелиевых контактных линз, покрытых синтетическим пептидом Mel4 с целью снижения вероятности развития воспаления и инфекций, связанных с ношением контактных линз [219].

Стоит также отметить, что несколько АМП не прошли испытания по результатам фазы III не из-за токсичности или отсутствия заявленного эффекта, а из-за отсутствия превосходства перед традиционными методами лечения [8, 220]. Такие АМП могут в дальнейшем быть одобрены к применению в качестве альтернативных препаратов по совокупности дополнительных факторов, таких как безопасность и биоразлагаемость, и низкая или ограниченная способности вызывать у бактерий развитие резистентности [8]. Примером такого АМП является пексиганан — пептид на основе α -спирального АМП лягушки магейнина — предлагавшийся для местного применения при лечении диабетической стопы [221].

1.5.3. Проблемы на пути к клиническому применению

Разработка препаратов на основе АМП для внедрения в клиническую практику сопряжена с рядом проблем: сравнительно высокими затратами на разработку и последующее масштабное производство; возможной побочной токсичностью, связанной с недостаточной селективностью; снижением активности в физиологическом окружении, в котором предполагается их практическое использование, в сравнении с результатами, полученными в предварительных лабораторных тестах. Помимо этого, несмотря на представления о том, что АМП с гораздо меньшей вероятностью провоцируют развитие у бактерий устойчивости к ним, этот вопрос также требует глубокого изучения и контроля при практическом внедрении подобных препаратов [8].

Стоимость производства пептидных антибиотиков во многом зависит от метода их получения. Например, цена за грамм аминокислоты для производства АМП путем твердофазного химического синтеза может составлять от 50 до 400 долларов США, тогда как производство классических антибиотиков в разы дешевле: так, в случае аминогликозидов грамм готового препарата обходится

всего в 0,8 доллара [222]. Как следствие, для производства АМП или их аналогов в промышленных масштабах требуются альтернативные методы.

Возможные токсические эффекты в отношении нормальных эукариотических клеток связывают в основном с неспецифичностью мишени пептидов при их действии на мембрану [8]. Известны примеры АМП, оказывающих гемолитическое и / или цитотоксическое действие в концентрациях, близких к антимикробным, что, очевидно, ограничивает их потенциальное использование [223, 224].

В то же время для АМП, распознающих и реализующих свой эффект через определённые специфические молекулы на поверхности мембраны бактерий, такие как ЛПС, липид А, липиды I / II, участвующий в сборке ЛПС белок LptD, вероятность развития резистентности оказывается выше. Известные на данный момент механизмы бактериальной устойчивости к АМП рассматривались больше в отношении пептидных препаратов микробного происхождения, уже внедрённых в практику [8], и достигаемые уровни резистентности оцениваются как менее критичные в сравнении с конвенциональными антибиотиками (увеличение ингибирующих концентраций в 2–30 раз против увеличения в 100–1000 раз, соответственно) [225]. Для ряда АМП было продемонстрировано, что адаптационные изменения бактерий оказываются лишь временными и при удалении АМП из культуральной среды, бактериальные клетки по чувствительности быстро возвращаются к дикому типу [6, 226]. Тем не менее возможность выработки устойчивости нельзя игнорировать.

Также известным феноменом является то, что АМП могут терять демонстрируемую *in vitro* активность в физиологическом окружении [6, 8, 9]. Например, физиологическая концентрация солей может способствовать снижению электростатического взаимодействия между АМП и клеточными мембранами [227, 228]. В присутствии сыворотки АМП могут связываться с такими белками, как альбумины, α 2-макроглобулин, серпины, белки комплемента и др. [229, 230]; предположительно, аналогично могут действовать и некоторые клетки макроорганизма [231]. Кроме того, АМП подвергаются протеолитической

деградации в условиях многоклеточного организма [232, 233]. Всё это снижает доступную концентрацию АМП и, соответственно, оказываемый ими эффект. С проблемами доставки связано, в частности, то, что большинство АМП, проходящих клинические испытания, позиционируются как препараты для местного либо внутривенного применения [8, 6].

1.5.4. Стратегии улучшения антимикробных пептидов

Для снижения затрат на производство, цитотоксических эффектов, а также улучшения биодоступности и эффективности АМП было предложено несколько общих стратегий (рис. 1.6.) [8].

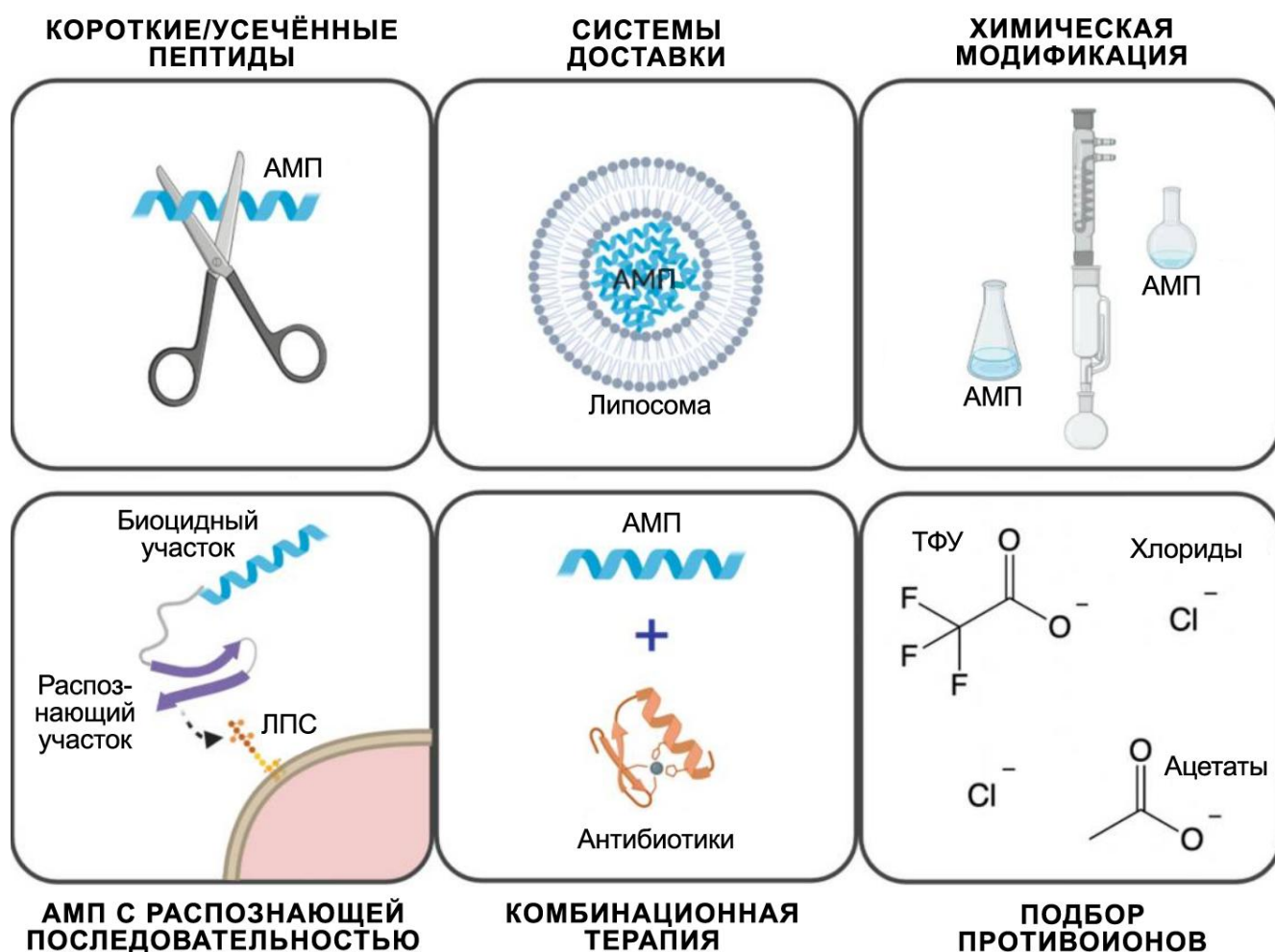


Рисунок 1.6. Стратегии улучшения терапевтического потенциала АМП [по 8].

Для снижения стоимости производства можно не только использовать альтернативные методы синтеза пептидов (см. п.1.5.5), но и уменьшить длину аминокислотной цепи. Примерами такого подхода могут служить находящиеся на

различных стадиях клинических испытаний АМП ОР-145 [234], PAC113 [235], LTX-109 [236] и EA-230 [237]. Все они состоят из меньшего количества аминокислотных остатков в сравнении с молекулами, на основе которых они разработаны: LL-37, гистатином-5, лактоферрином коровы и петель-2 β -субъединицы хорионического гонадотропина человека соответственно.

Для улучшения биодоступности АМП предлагается использовать различные системы доставки: капсулы, липосомы, наночастицы и т.п. [8]. Системы доставки могут не только улучшить биодоступность, но и снизить цитотоксичность и усилить эффективность АМП за счёт повышения специфичности и растворимости, локального повышения концентрации пептида [238–240].

Активность, специфичность, спектр действия и устойчивость АМП к физиологическим условиям могут быть оптимизированы путём химических модификаций.

Гидрофобность, амфипатичность и другие свойства пептида могут в той или иной степени оказывать влияние на его активность и токсичность. Так, например, сообщалось о связи повышения гидрофобности с индукцией гемолитических эффектов АМП [241]. В другом исследовании демонстрировалось, что снижение суммарного положительного заряда может снизить токсичность α -спиральных АМП без потери эффективности бактерицидного действия [242]. Также было обнаружено, что замена в α -спиральных АМП обеспечивающих положительный заряд аминокислотных остатков лизина на остатки аргинина приводит к повышению бактерицидной активности и снижению цитотоксического действия, несмотря на то, что заряд пептида не изменяется [243].

Предложены различные подходы к химической модификации пептидов для повышения устойчивости последних к действию протеаз: это и введение D-аминокислот, и циклизация, и амидирование или ацетилирование концевых участков [244–246]. Для повышения стабильности АМП в условиях высокой ионной силы и сыворотке крови рассматриваются возможности введения триптофана или β -нафтилаланина в концевые области пептида [246, 247].

Промежуточным вариантом между использованием системы доставки и химической модификацией можно считать конъюгирование АМП с молекулами полиэтиленгликоля (ПЭГ). Как показано группой Gumbleton и др. [248], ПЭГилирование АМП способно снизить токсичность пептида для макроорганизма, при этом не влияя на антимикробную активность. ПЭГилирование усиливает фармакологические свойства препарата несколькими способами [249–251]: повышая гидрофильность, ПЭГ защищает пептид от действия протеаз, а также продлевает время циркуляции и снижает скорость клубочковой фильтрации.

Поскольку цитотоксические эффекты АМП, как и их широкий спектр действия, связывают с неспецифическими механизмами реализации их активности, для уменьшения этих эффектов было предложено использовать АМП со специфическим распознающим мишень доменом [252]. Модифицированные таким образом АМП могут, например, убивать определенные патогенные виды микроорганизмов, не затрагивая нормальную флору. Они включают как минимум две функционально различные области связанные спейсером: одну или несколько распознающих последовательностей и участок, непосредственно отвечающий за уничтожение. Распознающий участок при этом дополнительно повышает активность АМП за счет усиления начального связывания пептида со специфическими патогенными детерминантами на поверхности клетки [253]. Использование двух и более распознающих цель последовательностей повышает эффективность узнавания мишени и снижает вероятность выработки резистентности к препарату за счёт модификации распознаваемых поверхностных структур [254]. Примером реализации такого подхода является, например, препарат С16G2, представляющий собой синтетический АМП с N-концевой распознающей последовательностью, специфичной к *Streptococcus mutans*, который в настоящее время проходит клинические испытания в качестве средства для лечения вызываемого *S. mutans* кариеса [255, 256].

Для улучшения эффективности лечения в клинической практике часто используется комбинированная терапия, например сочетание нескольких

антибиотиков. Аналогичный подход может быть применён и для новых препаратов на основе АМП, поскольку многие пептиды проявляют с антибиотиками синергетическое взаимодействие [201, 257–260]. Это может не только снизить темпы развития резистентности к антибиотику, но и снизить необходимые для достижения лечебного эффекта концентрации препаратов, тем самым снижая как побочную токсичность, так и стоимость лечения [8, 261].

В случае получения АМП методом твердофазного синтеза на эффективность и цитотоксичность препарата могут влиять противоионы, используемые на заключительном этапе — при отщеплении и снятии защиты с функциональных групп в синтезированной пептидной цепи. Противоионы, такие как анионы трифторуксусной кислоты (ТФУ), способны взаимодействовать с положительно заряженными молекулами АМП и влиять на формирующуюся сеть водородных связей и, вместе с тем, формирующуюся вторичную структуру [262, 263]. Также было показано, что ТФУ сама по себе обладает цитотоксическим эффектом против клеток млекопитающих [264]. Sikora и др. [265] изучили влияние трех различных типов противоионов: трифторацетатов (анионов ТФУ), ацетатов и хлоридов, — на антибактериальную активность и токсичность ряда АМП и обнаружили, что антимикробная активность пептидных ацетатов и хлоридов оказались выше, чем у трифторацетатов. С другой стороны известно, что использование в качестве противоионов ТФУ способствует формированию α -спирали, например, LL-37 [266], а противоионы уксусной кислоты, по-видимому, повышают гемолитическую активность [265]. Хотя последнее может зависеть от природы самого АМП: ацетат пексиганана наоборот показал наименьшую цитотоксичность при анализе выживаемости клеток и был наиболее стабильной солью пексиганана [265, 267].

1.5.5. Способы получения антимикробных пептидов

Выделение из природных источников. Классическим способом получения природных АМП является их выделение из клеток крови и секретов животных. Метод, как правило, включает кислотную экстракцию и последующую хроматографическую очистку. Протокол очистки разрабатывается для каждого

пептида индивидуально исходя из его физико-химических свойств, что повышает трудоемкость процесса. Производство АМП в промышленных масштабах таким способом ограничивается постоянной потребностью в источнике выделения пептида. Также невозможно получить пептиды, значительно отличающиеся от природных. Альтернативой служит использование технологии рекомбинантной ДНК и химический синтез.

Химический синтез. Химические методы синтеза пептидов имеют более чем 100-летнюю историю. В 1881 году Теодор Курциус синтезировал первый N-защищенный дипептид — бензоилглицилглицин — используя метод азидного сочетания, при котором серебряная соль глицина обрабатывалась бензоилхлоридом. Однако первой публикацией об успешном синтезе стала работа Эмиля Фишера, получившего глицилглицин путём гидролиза глицина дикетопиперазина в 1901 году [268, 269]. Для эффективного синтеза необходимо применение временных защитных групп, предотвращающих присоединение мономеров к неправильным функциональным группам растущей цепи или повторное присоединение одного и того же мономера за один шаг синтеза. Стратегии синтеза, как правило, обозначаются по тому, какие защитные группы используются. В 1931 году Бергманном и Зервасом на роль защиты α -аминогрупп была предложена карбензокси группа (Cbz), а в 1957 году Карпино, МакКеем и Альбертсоном — трет-бутилоксикарбонильная группа (Boc) [270–272], которая до 70-х–80-х годов оставалась наиболее популярной. В 1963 году Меррифилд совершил прорыв в области пептидного синтеза, когда впервые использовал для него твердую подложку, положив начало современному твердофазному синтезу [270]. Хотя методом синтеза в жидкой фазе были успешно получены такие биологически активные пептиды, как окситоцин, инсулин и другие [273, 274], его серьёзным недостатком перед твердофазным вариантом является низкая скорость.

Для твердофазного синтеза используют носитель, к которому заякоревуют растущую цепь пептида. В качестве носителя выступают различные смолы, например полистирол, гидроксиметил, фенилацетамидометил, 4-

метилбензидриламин и другие [275]. Схема процедуры синтеза приведена на рис. 1.7.

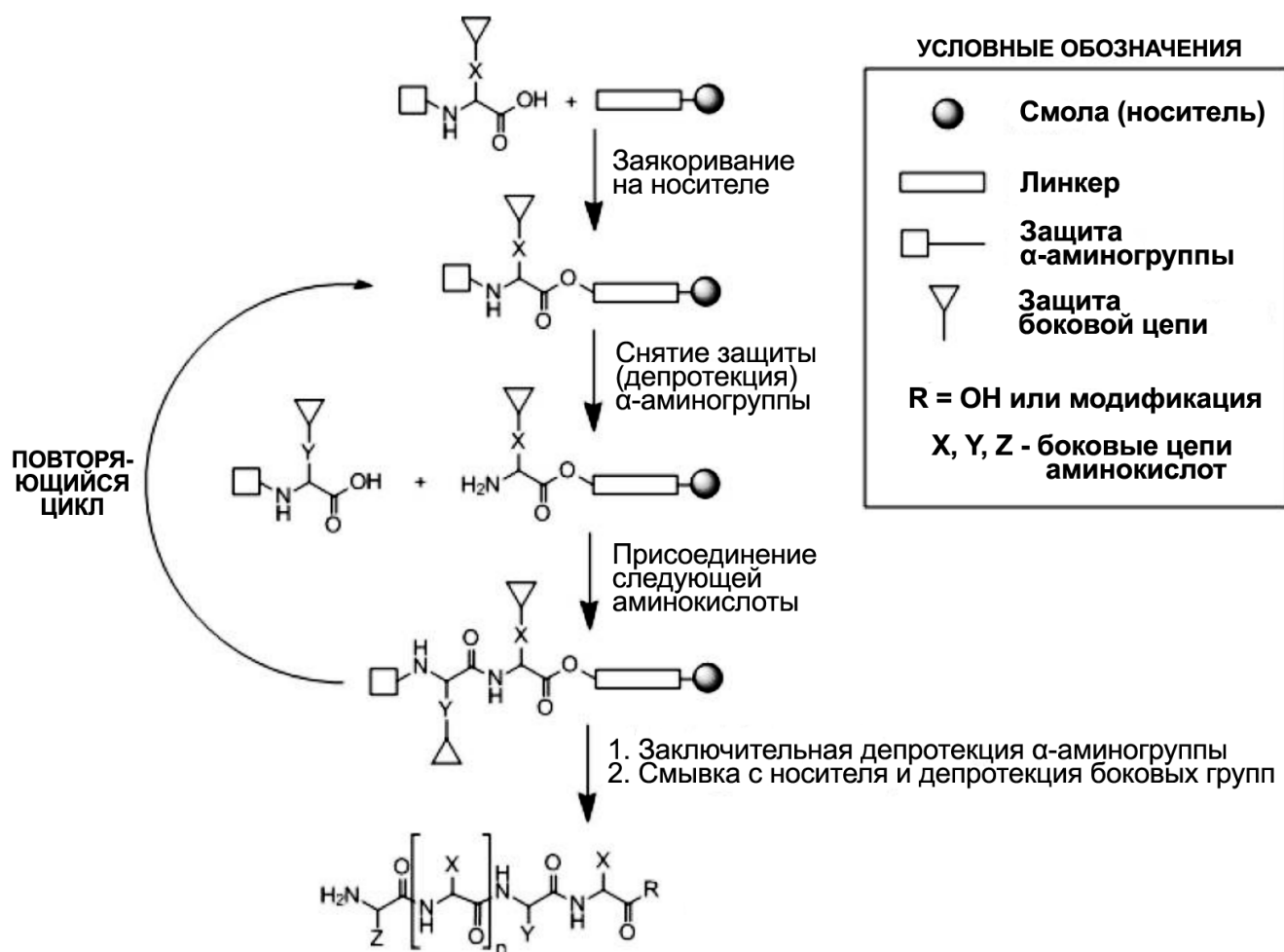


Рисунок 1.7. Схема этапов твердофазного химического синтеза пептидов [по 276].

На сегодняшний день используется преимущественно Fmoc стратегия синтеза [277]. 9-флуоренилметоксикарбонильная группа (Fmoc) для защиты α-аминогруппы аминокислоты была предложена Карпино в 1970 году [278]. При этом для боковых цепей используют защиту на основе трет-бутила (tBu). Снятие защиты Fmoc происходит в умеренно щелочных условиях, а для удаления боковых tBu-защитных групп необходима умеренно кислая среда. Эта стратегия более выигрышна в сравнении с классическим Boc-синтезом, поскольку для удаления Boc группы используют умеренно кислые условия, а для снятия боковых защитных групп — ещё более кислые условия, из-за чего в каждом цикле синтеза происходит отщепление некоторой части защитных групп боковых цепей аминокислотных остатков и возникает прогрессирующая потеря пептида с

полимерной основы [276, 279]. Внедрение Fmoc технологии позволило достичь значительных успехов в увеличении длины синтезируемых пептидов [279].

Другими преимуществами Fmoc методики является отсутствие в синтетических циклах высоко агрессивных соединений. Также удобно, что при снятии Fmoc защиты высвобождается флуоренильная группа, поглощающая в УФ-спектре, по накоплению которой можно следить за прохождением синтеза [280].

Преимуществами твердофазного химического синтеза пептидов являются быстрота получения (чаще сравнительно небольших объёмов пептида) и возможность разнообразной модификации структуры. К недостаткам можно отнести сравнительно высокую стоимость и вероятность неправильной пространственной укладки длинных молекул, синтезированных не в физиологическом окружении.

Использование технологии рекомбинантной ДНК. Данная технология позволяет получать белковые и пептидные молекулы (например, для использования в качестве лекарственных препаратов) в больших количествах. Технология основана на трансформации клетки-продуцента ДНК-вектором, содержащем ген, кодирующий пептидную последовательность. Несмотря на некоторые недостатки (отличия аппарата синтеза белка прокариот от эукариот) многие исследователи отдают предпочтение прокариотическим системам экспрессии, в частности *Escherichia coli*, из-за высокой скорости роста клеток, простоты генетических манипуляций и высокого выхода получаемого продукта [281]. Возможность производства белков и пептидов в клетках *E. coli* основана на способности бактерий воспроизводить белки, закодированные в присутствующих в их клетках плазмидных ДНК. При этом экспрессионные плазмидные векторы содержат в своем составе все необходимые элементы для синтеза полипептида ферментативным аппаратом бактериальной клетки.

Получение рекомбинантного пептида в клетках *E. coli* включает несколько этапов: химический синтез последовательности гена, кодирующего пептид, создание экспрессионной плазмиды путем клонирования гена в плазмидном

векторе, трансформацию компетентных клеток *E. coli* для создания штамма-продуцента рекомбинантного пептида, отбор успешно трансформированных клонов клеток, их культивирование для наработки рекомбинантного пептида и его последующую очистку. Таким образом, получение пептида с использованием технологии рекомбинантной ДНК является более трудоёмким в сравнении с химическим синтезом.

Также возможен ряд проблем, как общего характера, так и касающихся данного типа продуцента. Это оптимизация кодонов для организма-продуцента, возможность того, что вектор не будет транслироваться на рибосоме. В частности, получение рекомбинантных пептидов ограничено их длиной — короткоцепочечные пептиды не удается получать таким способом. Для прокариотических систем существует проблема неправильного фолдинга. Кроме того, возникает необходимость очистки полученного рекомбинантного полипептида от примесей молекул, характерных для штамма-продуцента (белков, ДНК и ЛПС), которые являются высоко иммуногенными для человека и в лекарственном препарате могут стать источником нежелательных побочных эффектов [281]. В случае же АМП дополнительной сложностью является бактерицидная природа синтезируемых пептидов — необходимо синтезировать их в неактивной форме, чтобы исключить их токсичность в отношении штамма-продуцента [8, 282].

Так, например, магейнин, β -дефенсин-3 человека, мелиттин и другие АМП были успешно синтезированы с использованием кальмодулина в качестве белка-носителя [283, 284]. Этот белок защищает клетки штамма-продуцента от токсического воздействия АМП, с одной стороны, и предотвращает деградацию самого АМП в процессе производства, с другой стороны. Также использование белка-носителя позволяет обойти ограничение на синтез короткоцепочечных пептидов.

Данная работа посвящена подробному рассмотрению пролин-богатого пептида — кателицидина козы ChVac3.4, выяснению структурно-функциональных закономерностей проявления им антибактериальной и противоопухолевой активности и поиску путей оптимизации подобных пептидов (в частности, повышения селективности) в перспективе практического применения. Для этого был выбран подход химической модификации совместно с укорочением активного пептида. Получение различных пептидных вариаций для лабораторного тестирования проводилось методом твердофазного химического синтеза; один из отобранных перспективных образцов был также получен по технологии рекомбинантной ДНК и, помимо прочего, сопоставлен по активности с синтетическим вариантом.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Бактериальные клетки

2.1.1. *Использованные штаммы и их характеристика*

Тестирование противомикробных свойств исследуемых пептидов проводили в отношении как ряда лабораторных штаммов, так и против клинических изолятов бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам.

Лабораторные бактериальные культуры были представлены одним штаммом грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ML-35p и двумя штаммами грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*: метициллин-устойчивым штаммом MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) ATCC 33591 и более чувствительным к действию антимикробных веществ штаммом *Staphylococcus aureus* SG-511. Образцы первых двух штаммов бактерий были любезно переданы в коллекцию имеющихся у ФГБНУ «ИЭМ» микроорганизмов профессором Робертом Лерером из Калифорнийского университета (Лос-Анджелес, США); последней — профессором Хансом-Георгом Салом из Боннского университета (Германия).

Мультирезистентные клинические изоляты грамотрицательных бактерий *Acinetobacter baumannii* 7226/16, *Pseudomonas aeruginosa* MDR 522/17, *Klebsiella pneumoniae* ESBL 344/17, а также грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* 1399/17 были выделены из инфицированных ран; изолят грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ESBL 521/17 был получен из мочи пациента. Образцы данных культур были любезно предоставлены профессором Г.Е. Афиногеновым из Санкт-Петербургского государственного университета и д.б.н. А.Г. Афиногеновой из НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Л.Пастера (Санкт-Петербург). Выделение и анализ спектра устойчивости данных штаммов был проведён сотрудниками указанных институтов. Данные об устойчивости, незначительно дополненные с учётом антимикробных тестов, проведённых позднее в ФГБНУ «ИЭМ», приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1. Профиль лекарственной устойчивости использованных в работе клинических изолятов бактерий

анти-биотик	грамотрицательные:				анти-биотик	грамположи-тельные:
	<i>E. coli</i> ESBL 521/17	<i>A. baumannii</i> 7226/16	<i>P. aeruginosa</i> MDR 522/17	<i>K. pneumoniae</i> ESBL 344/17		<i>S. aureus</i> 1399/17
АМПц	У	У	У	У	АМПц	У
АМКл	У	-	-	Ч	АМКл	Ч
ЦТК	У	-	-	Ч	АМО	П
ЦАЗ	У	-	У	Ч	АЗМ	У
ФЕП	У	-	У	Ч	ВАН	Ч
АТМ	У	-	-	Ч	ДОК	П
ИПМ	Ч	У	П	Ч	КЛИ	П
МЕМ	Ч	У	У	Ч	МЕМ	П
АМК	П	У	П	Ч	АМК	У
ГЕН	Ч	У	У	Ч	ГЕН	У
НЕТ	У	-	У	Ч	ЦЕФ	П
ЦИП	У	-	У	Ч	ЦИП	Ч
ФОФ	Ч	-	-	Ч	ОФЛ	У
НИТ	У	-	-	-	ЛВФ	Ч
КСТ	Ч	-	У	Ч	ЦФМ	Ч
СКТ	У	У	-	Ч	ЦТР	Ч
ЭРИ	У	У	У	У	ЭРИ	У
ТГЦ	-	П	-	-	РКМ	П
САМ	-	П	-	-	ОКС	У

АМПц — ампициллин; АМКл — амоксициллин + клавулановая кислота; ЦТК — цефотаксим; ЦАЗ — цефтазидим; ФЕП — цефепим; АТМ — азтреонам; ИПМ — имипенем; МЕМ — меропенем; АМК — амикацин; ГЕН — гентамицин; НЕТ — нетилмицин; ЦИП — ципрофлоксацин; ФОФ — фосфомицин; НИТ — нитрофурантоин; КСТ — колистин; СКТ — триметоприм + сульфаметоксазол; ЭРИ — эритромицин; ТГЦ — тигециклин; САМ — ампициллин + сульбактам; АМО — амоксициллин; АЗМ — азитромицин; ВАН — ванкомицин; ДОК — доксициклин; КЛИ — клиндамицин; ЦЕФ — цефалексин; ОФЛ — офлоксацин; ЛВФ — левофлоксацин; ЦФМ — цефуроксим; ЦТР — цефтриаксон; РКМ — рокситромицин; ОКС — оксациллин.

У — устойчивость; П — промежуточный (слабый) уровень устойчивости; Ч — чувствительность.

Границы категорий устойчивости определялись согласно рекомендациям EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

2.1.2. Условия культивирования и расчёт концентрации

Культуры микроорганизмов культивировали в чашках Петри диаметром 90 мм («Медполимер», Россия) на триптон-соевом агаре (HiMedia, Индия) — твёрдой питательной среде, содержащей 1% агарозы и 3% триптон-соевого

бульона. *E. coli* ML-35p культивировали на среде с добавлением 100 мкг/мл ампициллина; MRSA ATCC 33591 на среде с добавлением 6 мкг/мл оксациллина.

Для получения суспензии микроорганизма в жидкой питательной среде в стационарной фазе роста отдельную колонию с твердой питательной среды переносили при помощи микробиологической петли в порцию стерильной жидкой питательной среды (10–15 мл), находящуюся в стеклянном флаконе с крышкой. Флаконы инкубировали при постоянном перемешивании и температуре +37°C в течение 18–20 часов.

Для получения суспензии микроорганизма в жидкой питательной среде в логарифмической (экспоненциальной) фазе роста из полученной ранее стационарной ночной культуры дозатором со стерильным наконечником отбирали 500–1000 мкл бактериальной суспензии и переносили в свежую порцию стерильной жидкой питательной среды. Новый флакон инкубировали аналогично при +37°C и постоянном перемешивании в течение 2–3 часов, после чего полученную культуру микроорганизмов немедленно использовали в эксперименте.

Концентрацию бактерий в суспензии определяли турбидиметрическим методом. Измеряли оптическую плотность суспензии против соответствующей стерильной питательной среды или буфера при длине волны 620 нм и рассчитывали концентрацию колониобразующих единиц (КОЕ) исходя из соотношения, что единица оптической плотности при длине волны 620 нм соответствует концентрации $2,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл.

2.2. Эукариотические клетки

2.2.1. Клеточные линии и условия культивирования

В исследованиях *in vitro* использовали клеточные линии эритромиелоидной лейкемии человека K562 и гистиоцитарной лимфомы человека U937 из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, РФ), а также нормальные эритроциты и мононуклеары, выделяемые из периферической крови человека.

Клетки культивировали во флаконах для суспензионных культур объёмом 50 мл в среде RPMI-1640 (Биолот, РФ) с добавлением L-глутамина, гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки [285]. Культивирование осуществляли в CO₂-инкубаторе в атмосфере, содержащей 5% CO₂, при постоянной температуре +37°C и влажности 85–95%. Обновление ½ культуральной среды проводили дважды в неделю. Перед проведением эксперимента клетки отмывали от ростовой среды, содержащей антибиотик и сыворотку: центрифугировали при 300 g и 4°C, удаляли супернатант и ресуспендировали в свежей порции культуральной среды RPMI-1640 без добавок. Процедуру повторяли дважды.

2.2.2. Определение концентрации клеток в суспензии путём микроскопического подсчёта в камере Горяева

Для определения концентрации эукариотических клеток в суспензии пользовались счётной камерой Горяева. Основой камеры является толстое стекло, на котором имеется три разделённых поперечными канавками возвышения. Центральное возвышение дополнительно разделено пополам продольной канавкой, позволяющей отдельно использовать его верхнюю и нижнюю часть. На каждой из половин нанесена счётная сетка размером 15 × 15 больших квадратов, каждый из которых имеет стороны по 1/5 мм и площадь 1/25 мм² соответственно. Часть больших квадратов дополнительно разделена на 16 малых квадратов со сторонами 1/20 мм и площадью 1/400 мм². Боковые возвышения выступают над центральным на 0,1 мм, имеют отполированную поверхность и служат для притирания покровного стекла (рис.2.1) [286]. Таким образом, при помещении суспензии с клетками под притёртое покровное стекло объём раствора, находящегося над каждым квадратом счётной сетки, оказывается известен, что позволяет путём подсчёта клеток над сеткой под микроскопом затем рассчитать и их концентрацию.

Счётную камеру и покровное стекло перед использованием тщательно промывали водой, высушивали и обезжиривали спиртом. После испарения спирта покровное стекло притирали к основанию большими пальцами обеих рук до появления радужных интерференционных колец (колец Ньютона),

свидетельствующих о плотном контакте покровного стекла с боковыми возвышениями камеры.

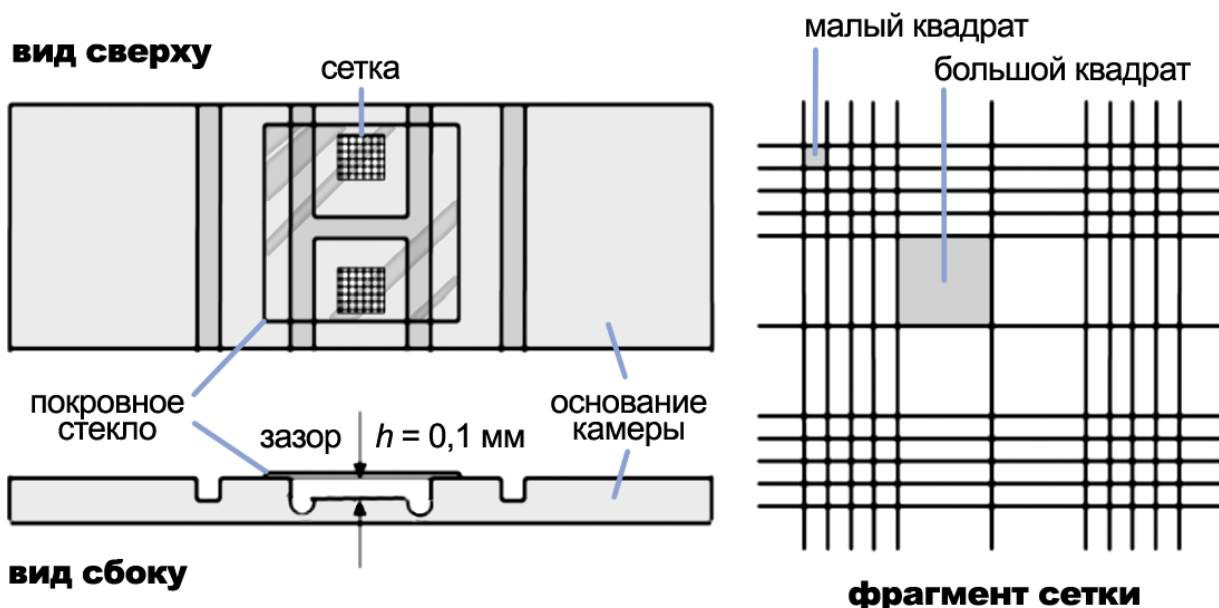


Рисунок 2.1. Устройство счётной камеры Горяева (на основе [286])

Каплю исследуемой суспензии (в случае использования дифференциальных красителей — после проведения окраски) объёмом 7 мкл подносили к боковому зазору между покровным стеклом и центральной частью основания счётной камеры. Заполненную счётную камеру сразу же помещали под световой микроскоп (использовали увеличение в 100 раз: объектив $\times 10$, окуляр $\times 10$). Учитывая сравнительно крупный размер исследовавшихся клеток, их количество подсчитывали над 20 неразлинованными большими квадратами, расположенными вдоль главной диагонали сетки. При попадании клеток на границы квадратов, руководствовались правилом Егорова: клетки, касающиеся верхней или левой границы, считали расположенными внутри данного квадрата, а клетки, попадающие на правую или нижнюю границу, — находящимися вне его. После подсчёта концентрацию клеток в 1 мл (т.е. в 1 см^3) C определяли по формуле:

$$C \text{ (клеток/мл)} = \frac{N_{\text{кл}}}{N_{\text{кв}} \cdot V_{\text{кв}}} \cdot R = \frac{N_{\text{кл}}}{N_{\text{кв}}} \cdot 250\,000 \cdot R,$$

где $N_{\text{кв}}$ — число квадратов, над которыми проводился подсчёт; $N_{\text{кл}}$ — общее число клеток над этими квадратами; $V_{\text{кв}}$ — объём жидкости над одним квадратом в мл (равен произведению площади квадрата на высоту зазора между центральной

частью камеры и покровным стеклом: для большого квадрата $V_{\text{кв}} = 1/25 \text{ мм}^2 \cdot 1/10 \text{ мм} = 1/250 \text{ мм}^3 = 1/250000 \text{ мл}$); R — кратность разведения в случае разбавления исходной суспензии из-за большой плотности клеток в ней, либо при добавлении красителя (рассчитывается как отношение общего объёма после разбавления/добавления красителя к объёму взятой исходной суспензии).

2.2.3. Приготовление эритроцитарной суспензии и выделение фракции мононуклеаров из цельной периферической крови

Нормальные мононуклеары и эритроциты человека выделяли из периферической крови здоровых доноров. Забор крови производили в соответствии с протоколом 1/20 от 27.02.2020, одобренным Этическим комитетом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», из локтевой вены в вакуумные пробирки с гепарином или ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислотой). От всех доноров предварительно было получено письменное информированное согласие.

Так как суспензию эритроцитов использовали для исследования гемолитической активности спектрофотометрическим методом, присутствие белых клеток крови не являлось критичным и их от эритроцитов не отделяли. Небольшой объём (1–1,5 мл) собранной цельной крови разводили в пропорции 1:9 стерильным, охлаждённым до $+4^\circ\text{C}$ стерильным забуференным физиологическим раствором с $\text{pH}=7,4$ (ЗФР; Вектон, Россия), содержащим 4 мМ ЭДТА, в стерильной пробирке объёмом 15 мл, после чего отмывали от плазмы путём 10-минутного центрифугирования при ускорении 350 g, температуре $+4^\circ\text{C}$ и последующего удаления надосадочной жидкости. После этого клетки крови ресуспендировали в 10 мл ЗФР без антикоагулянта и трижды проводили аналогичную отмывку. Учитывая количественное соотношение белых и красных клеток крови, содержание эритроцитов в полученном осадке считали 100%.

Для выделения фракции мононуклеаров из цельной гепаринизированной крови использовали метод седиментации в градиенте плотности (рис.2.2). В качестве градиента использовали Фиколл-400 (Pharmacia, Швеция) — раствор сополимера сахарозы и эпихлоргидрина [287] массой $\approx 400 \text{ кДа}$ с плотностью

1.077 г/см³. Плавучая плотность гранулоцитов и эритроцитов выше, чем у Фиколла, поэтому при осаждении (под действием центробежных сил в центрифуге) они опускаются сквозь него ко дну пробирки, тогда как у моноцитов и лимфоцитов, составляющих фракцию мононуклеаров, плавучая плотность меньше, и они остаются выше слоя Фиколла.

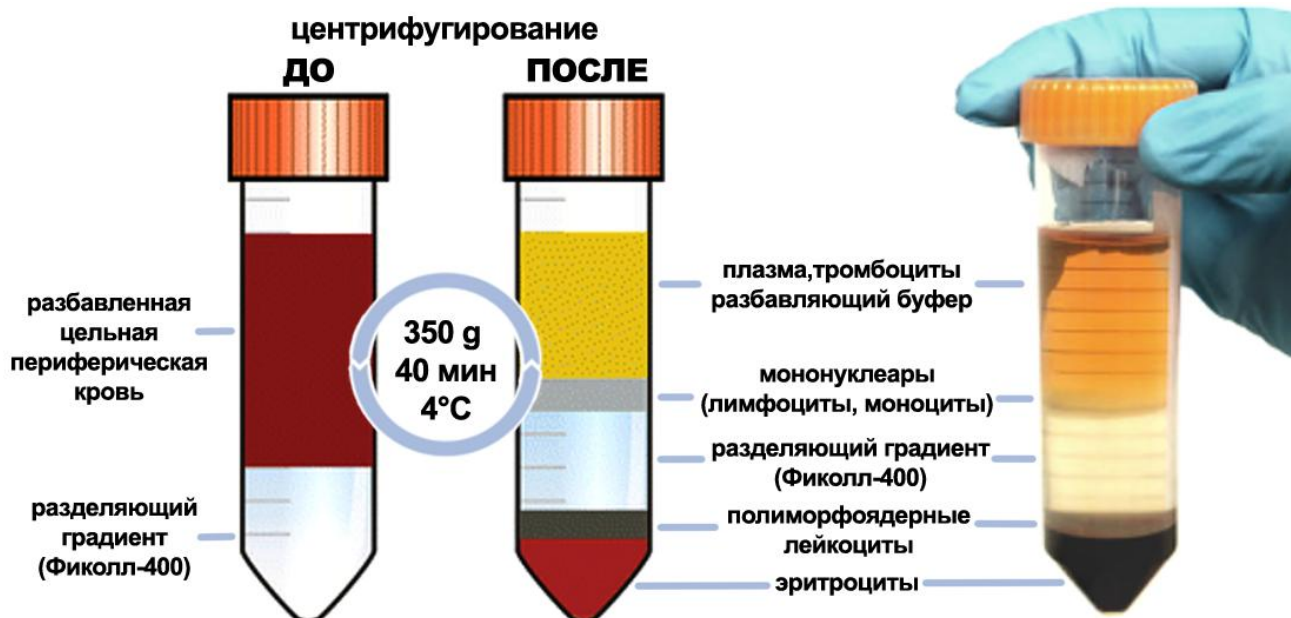


Рисунок 2.2. Выделение фракции мононуклеаров периферической крови путём седиментации в градиенте плотности (на основе [288, 289])

Для разделения использовали стерильные пластиковые пробирки объемом 50 мл, в которые предварительно вносили по 5–7 мл стерильного Фиколла-400, а затем поверх него наслаивали цельную гепаринизированную кровь, предварительно разведённую 1:1 ЗФР. Для проведения разделения пробирки центрифугировали в течение 40 минут при ускорении 350 g и температуре +4°C. Картина получающегося разделения представлена на рис.2.2. После этого образовавшуюся над слоем Фиколла интерфазную прослойку, содержащую мононуклеары, собирали стерильной трансферной пипеткой в новую стерильную пробирку и дважды отмывали ЗФР от остатков плазмы и Фиколла, центрифугируя в течение 10 мин при ускорении 350 g и температуре +4°C и затем удаляя супернатант. После последней отмывки клетки ресуспендировали в питательной среде RPMI-1640.

2.3. Методы синтеза, очистки и анализа пептидных препаратов

2.3.1. Твердофазный химический синтез пептидов

Пептиды синтезировали методом твердофазного синтеза. При твердофазном синтезе начальный конец наращиваемого олиго- или полимера ковалентно прикрепляется к нерастворимому носителю и остаётся в связанном виде до завершения синтеза, что позволяет относительно просто автоматизировать стадии наращивания цепи, так как побочные продукты и более не требующиеся компоненты реакционной смеси могут быть легко удалены отмывкой носителя и фильтрованием. Во время синтеза используют мономеры аминокислот, защищённые по боковой цепи и α -аминогруппе. Цикл наращивания строится в целом по схеме: деблокирование α -аминогруппы на конце синтезируемой цепи, заякоренной на носителе \rightarrow добавление защищённых мономеров следующей нужной аминокислоты и создание условий для их присоединения к наращиваемой цепочке \rightarrow удаление более ненужных компонентов из реакционной смеси, в частности несвязавшегося избытка аминокислотных мономеров. Такая схема с использованием защит обеспечивает прирост цепи за один шаг только на одну аминокислоту в нужном направлении [290].

В качестве твердофазного носителя использовали 2-хлортритилхлоридную смолу. Синтез проводили по стандартному протоколу с использованием Fmoc/tBu-стратегии: временную защиту α -аминогрупп осуществляли флуоренилметоксикарбонилем (Fmoc), а защиту боковых групп — трет-бутилом (tBu). Активацию проводили *in situ* с использованием связывающего реагента НСТУ (О-(1Н-6-хлоробензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий гексафлюорофосфат) в комбинации с N-этилморфолином в среде диметилформамида. Отделение готовой аминокислотной последовательности от полимерной матрицы с одновременным удалением всех защитных групп осуществляли при помощи смывающей смеси на основе трифторуксусной кислоты (ТФУ), включавшей ТФУ, триизопропилсилан, воду и этандитиол в соотношении 94:1:2,5:2,5.

В дальнейшем синтезированные пептиды очищали методом обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), как описано ниже в п.2.3.2, и высушивали на вакуумной роторной сушке Speed Vak (Savant, США).

Степень очистки полученных препаратов и соответствие синтезированных пептидов заданным аминокислотным последовательностям оценивали методами аналитической ОФ ВЭЖХ и масс-спектрометрии, как указано в п.2.3.2 и п.2.3.3, соответственно.

2.3.2. Обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

Обратно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФ ВЭЖХ) использовали для доочистки синтезированных пептидов из реакционной смеси, а затем и для анализа степени очистки полученных пептидных препаратов.

Хроматография — метод разделения веществ на основе различий в их сродстве и, соответственно, динамике сорбции/десорбции на неподвижном носителе (сорбенте) при протекании через него подвижной фазы (элюента). Высокоэффективной называется хроматография, проводимая на сорбенте с малым диаметром частиц (~10 мкм), за счёт чего увеличивается доступная площадь связывания и, соответственно, улучшается кинетика сорбции. Недостатком использования мелкозернистых сорбентов является повышение сопротивления протеканию через них элюента, в связи с чем для прокачки последнего через сорбент используют насосы высокого давления [291, 292].

Обратно-фазовая хроматография является разновидностью хроматографии, в которой используют гидрофобные (неполярные) сорбенты, связывающие, соответственно, гидрофобные соединения из водного (полярного) раствора. Связанные соединения затем последовательно элюируются в соответствии со степенью их гидрофобности (самые гидрофобные — позднее всего) постепенной сменой подвижной фазы с полярной на неполярную, что достигается изменением процентного соотношения в ней полярного и неполярного растворителей во времени. Название имеет исторические корни, поскольку такой вид

хроматографии получил распространение позднее «нормально-фазовой», в которой наоборот используют гидрофильные сорбенты [291, 293].

Очистку пептидов проводили полупрепаративным методом на хроматографе Gilson (США) с колонкой Waters SymmetryPrep C18 (9×300 мм, 100Å, 7мкм) или хроматографе Beckman Gold System (США) с колонкой Vydac C18 (10×250 мм, 100Å, 5 мкм). Разделение осуществляли в градиенте вода (с добавлением 0,1% ТФУ) — ацетонитрил; процент ацетонитрила линейно увеличивали от 0 до 70% за 1 час.

Для аналитической ОФ ВЭЖХ использовали колонку Luna C18 (4,6×250 мм, 100Å, 5 мкм), а содержание ацетонитрила в элюэнте увеличивали от 7 до 70% за 20 минут. Детекцию осуществляли при длине волны 220–230 нм.

2.3.3. Масс-спектрометрический анализ

Для подтверждения соответствия синтезированных пептидов заданной аминокислотной последовательности использовали масс-спектрометрию.

Масс-спектрометрия — метод анализа состава вещества и идентификации его компонентов, который основан на том, что по особенностям поведения заряженных частиц в электромагнитном поле можно установить отношение их массы к заряду (m/z). В целом процесс включает ионизацию молекул, поскольку для успешного действия поля частица должна иметь ненулевой заряд, затем собственно воздействие поля в атмосфере глубокого вакуума, — чтобы исключить влияние столкновений с другими атомами и молекулами на движение исследуемой частицы, — и, наконец, детекцию. В данной работе использовали времяпролётную (Time-of-flight = TOF) масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization = MALDI) [294, 295].

При времяпролётной масс-спектрометрии ионизованная частица сначала разгоняется полем заданной напряжённости (U), а затем пролетает известное расстояние (d) до детектора в отсутствии действия поля. Измеряя время пролёта частицы до детектора (t), через известные U , d и t оказывается возможно рассчитать её (частицы) m/z .

Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация — один из «мягких» методов, применяемых для ионизации сравнительно крупных нелетучих органических молекул, таких как белки и пептиды. Матрица служит «посредником», поглощающим энергию лазерного излучения и ионизирующим исследуемые молекулы за счёт переноса заряда, что предотвращает распад анализируемых веществ, высоко вероятный при действии лазерного излучения непосредственно на них [294, 295].

В качестве матрицы использовали α -циано-4-гидроксикоричную кислоту, смешанную в пропорции 1:2 с ацетонитрилом, содержащим 0,1% ТФУ. Масс-спектры были получены на приборе Ultraflextreme MALDI TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия) в режиме положительно заряженных ионов. Запись масс-спектров осуществляли при следующих условиях: ультрафиолетовый лазер с частотой 1000 Гц, мощность 20-30%, 1000–5000 лазерных импульсов, режим отражения.

2.4. Методы исследования активности пептидов в отношении бактериальных клеток

2.4.1. Исследование антимикробной активности пептидов методом серийных разведений в жидкой питательной среде, содержащей микроорганизмы

Для исследования антимикробной активности пептидов использовали метод серийных разведений тестируемого препарата в жидкой питательной среде, содержащей микроорганизмы. Мерой активности в данном тесте выступает минимальная ингибирующая концентрация (МИК), т.е. наименьшая концентрация исследуемого вещества, в присутствии которой визуально отсутствует рост микроорганизмов. За счёт простоты метод позволяет тестировать большое количество препаратов и их концентраций в одном эксперименте, что повышает в дальнейшем точность сравнения их действия между собой. Также определение активности пептидов в отношении бактерий, находящихся в виде суспензии в питательном бульоне, улучшает переносимость полученного результата (установленного значения МИК) на другие методики, осуществляемые в сходных

условиях (исследование действия пептидов на мембраны бактерий, на процесс формирования биоплёнок, рассмотрение сочетанного действия пептидов с антибиотиками), в которых диапазон исследуемых концентраций веществ рассчитывается относительно их МИК.

Тест проводили в целом в соответствии со стандартным протоколом с незначительными модификациями, предложенными ранее для исследования пептидных препаратов [296]. Использовали стерильные 60-луночные полистирольные микрокамеры Тerasaki с V-образным дном (максимальный объём раствора в лунке — 12 мкл). С целью предотвращения неспецифического связывания исследуемых пептидов с поверхностью пластика в микропланшеты перед опытом вносили 0,1% стерильный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) и инкубировали в течение часа при температуре +37°C, после чего раствор удаляли.

Проводили двукратные серийные разведения исследуемых пептидов и вносили в экспериментальный микропланшет в трёх параллелях по 5 мкл в лунку. Для разведения использовали 10 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7,4, содержащий 0,1% БСА. Бактерии культивировали в 2,1% бульоне Мюллера-Хинтон M391 (HiMedia, Индия) до получения культуры в логарифмической фазе роста, определяли концентрацию, как описано в п.2.1, после чего разводили той же питательной средой до $1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл и вносили в лунки планшета по 5 мкл. В результате начальная концентрация микроорганизмов в лунках составляла $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл в соответствии с рекомендациями [297]. Также в каждом тестовом планшете готовили по три-четыре пробы для контроля роста бактерии в отсутствие антимикробных агентов и контроля стерильности условий проведения эксперимента. Для этого вместо пептидов вносили в лунки по 5 мкл натрий-фосфатного буфера с БСА, в первый вид контролей добавляли по 5 мкл бактериальной суспензии, а во второй — по 5 мкл стерильного 2,1% бульона Мюллера-Хинтон.

Пробы инкубировали в термостате в течение ночи при температуре +37°C. Об отсутствии или наличии роста микроорганизмов в лунках судили по наличию

осадка на дне или помутнению среды. Наименьшая концентрация, начиная с которой рост бактерии отсутствовал минимум в двух из трёх параллелей, принималась за МИК.

Итоговое значение МИК рассчитывали как выборочную медиану по данным не менее трёх независимых экспериментов.

2.4.2. Оценка влияния пептидов на проницаемость наружной и внутренней мембран бактерии *E.coli* ML-35p для хромогенных маркеров спектрофотометрическим методом

При исследовании механизма микробоцидного действия АМП профессором Р.Лерером и соавторами [298] был предложен метод, позволяющий одновременно отслеживать нарушения целостности наружной и цитоплазматической мембран бактерии в реальном времени. Основой метода служат особенности используемого репортерного штамма *E.coli* ML-35p. Он был сконструирован на основе штамма *E.coli* ML-35, который ранее применялся в классических работах Андре Львоффа, посвящённых исследованию лактозного оперона, а также при изучении повреждения цитоплазматической мембраны бактерий системой комплимента [299]. Особенностью исходного штамма является отсутствие пермеаз лактозы, которые в норме осуществляют транспорт лактозы в клетку через мембраны, а также конститутивный, а не индуцибельный синтез цитоплазматической β -галактазидазы. Путём внедрения плазмиды pBR322 модифицированный штамм *E.coli* ML-35p в дополнение к особенностям родителя приобрёл также способность конститутивно синтезировать периплазматическую β -лактамазу. Таким образом, у тестовой бактерии в цитоплазме постоянно присутствует фермент β -галактазидаза, в периплазме постоянно присутствует фермент β -лактамаза, при этом субстраты данных ферментов не могут попасть внутрь клетки через мембраны бактерии до тех пор, пока те не будут повреждены (из-за отсутствия необходимых белков-переносчиков).

Если в качестве субстратов использовать маркерные молекулы, при расщеплении дающие окрашенные продукты, отличающиеся по цвету от исходного соединения, то по появлению и накоплению таких цветных продуктов

(или наоборот по убыванию субстрата, если он тоже окрашен) можно судить о повреждении мембран: в случае субстрата β -лактамазы — наружной, а в случае субстрата β -галактозидазы — внутренней. Оперативно отслеживать изменение концентрации продуктов реакции удобно спектрофотометрическим методом — по возрастанию оптической плотности реакционной смеси на длинах волн, соответствующих их (продуктов) максимумам поглощения. Таким образом, данный метод даёт возможность не только зарегистрировать факт повреждения мембран микроорганизма, но и отслеживать динамику происходящего процесса. В случае быстрого начала и развития реакции в присутствии АМП можно полагать, что непосредственной мишенью действия исследуемого пептида являются именно мембраны бактерии, в которых тот формирует неспецифические поры, через которые субстраты быстро проникают к месту расщепления их бактериальными ферментами. Значительно отсроченная по времени от момента внесения АМП регистрация повреждений может наоборот свидетельствовать о том, что разрушение мембран является лишь вторичным процессом, сопровождающим гибель микробной клетки от других причин, и не обязательно связано с действием АМП непосредственно на них.

В текущем исследовании была использована модификация описанного метода, отличающаяся от исходного протокола главным образом выбранным сочетанием хромогенных субстратов [300, 301] (рис.2.3). В качестве маркера проницаемости наружной мембраны использовали нитроцефин (Calbiochem-Novobiochem, США), продукт расщепления которого периплазматической β -лактамазой детектировали при длине волны 486 нм. В качестве маркера проницаемости внутренней (цитоплазматической) мембраны использовали о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ONPG; Sigma, США). О-нитрофенол, образующийся в результате расщепления ONPG цитоплазматической β -галактозидазой, детектировали при длине волны 420 нм.

Эксперимент проводили в прозрачных полистирольных 96-луночных планшетах с плоским дном, снабженных крышкой; конечный объём проб составлял 100 мкл. Сначала в лунки вносили по 25 мкл исследуемого пептида в

заведомо антимикробной концентрации — как правило, 8–16×МИК, что, с учётом последующего разведения другими компонентами реакционной смеси, давало конечную концентрацию 2–4×МИК.

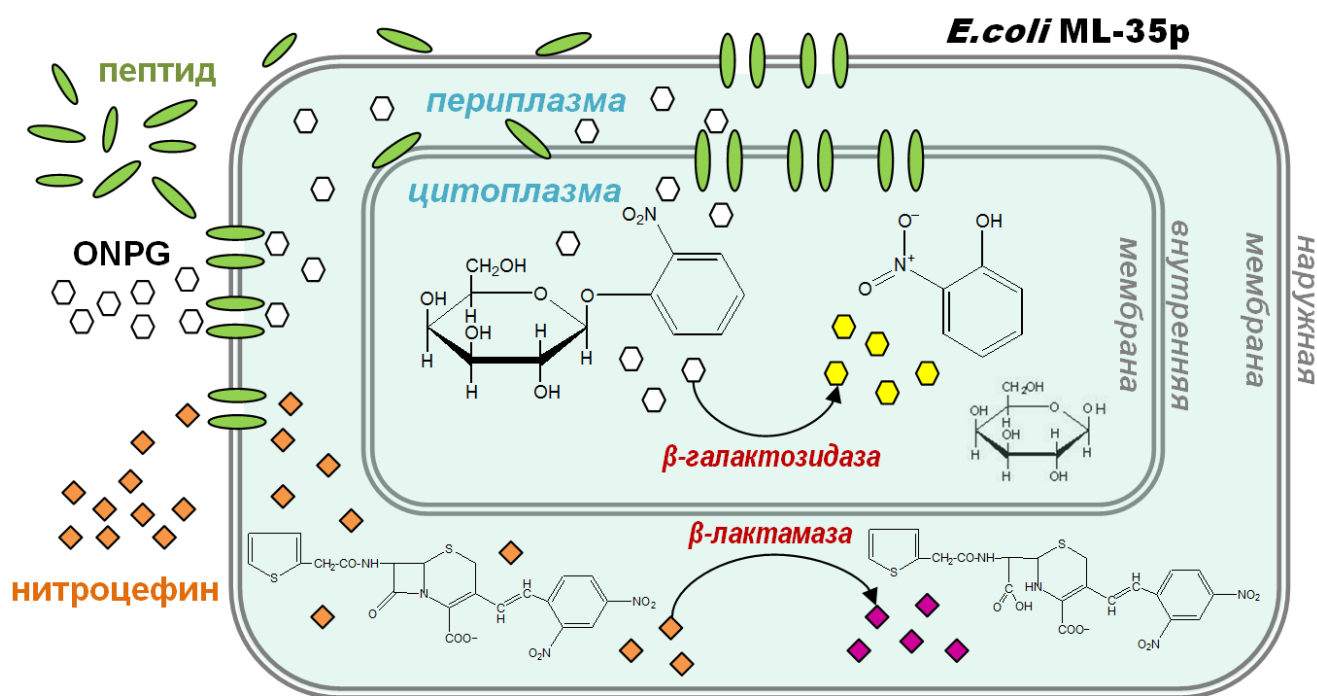


Рисунок 2.3. Принцип метода оценки проницаемости бактериальных мембран для хромогенных маркеров с использованием лабораторного штамма *E.coli* ML-35p (модифицировано из [302])

Пептиды разводили в 0,01М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4). Затем добавляли по 25 мкл стокового водного раствора одного из хромогенных маркеров. В случае нитроцефина стоковая концентрация составляла 80 мкМ, конечная — 20 мкМ. В случае ONPG стоковая концентрация составляла 10 мМ, конечная — 2,5 мМ. После этого вносили по 25 мкл 0,01 М натрий фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 450 мМ NaCl для нормализации содержания данной соли в реакционной смеси к соответствующему физиологическому раствору показателю в 150 мМ. В последнюю очередь добавляли суспензию бактерии в 0,01 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 150 мМ NaCl, в концентрации $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, что давало конечную концентрацию бактерий в пробе равную $2,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Немедленно после внесения бактериальной суспензии регистрировали показания оптической плотности.

Для проведения эксперимента использовали культуру *E. coli* ML-35 в стационарной фазе роста, выращенную в 3% триптон-соевом бульоне (Sigma, США). Перед определением концентрации КОЕ и конечным разведением бактерии трижды отмывали от питательной среды. Цикл отмывки включал в себя 10-минутное центрифугирование при ускорении 600 g и температуре +4°C, удаление надосадочной жидкости и ресуспендирование клеток в свежей порции стерильного 0,01 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 150 мМ NaCl.

Помимо экспериментальных проб также готовили контроли самопроизвольного расщепления хромогенных субстратов, не связанного с действием повреждающих мембраны бактерий агентов, которые служили базовой линией. Для этого в лунку вместо раствора АМП вносили 25 мкл 0,01М натрий-фосфатного буфера (pH 7,4).

С каждым из используемых хромогенных маркеров готовили по 2–3 параллели проб и контролей. Измерение оптической плотности проводили на планшетном спектрофотометре SpectraMax 250 (Molecular Devices, США) при температуре +37°C и периодическом перемешивании. Регистрацию показаний проводили при помощи программы SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices, США), прилагающейся к прибору, 1 раз/мин при двух длинах волн — 486 и 420 нм — для отслеживания повреждения внешней и внутренней мембран *E. coli* ML-35р соответственно. Построение полученных в эксперименте зависимостей оптической плотности проб от времени проводили с помощью программы SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., США).

2.4.3. Оценка влияния пептидов на метаболическую активность бактериальной суспензии флуориметрическим методом с использованием дыхательного маркера резазурина

Резазурин, также известный под коммерческим названием «аламаровый синий», — один из дыхательных маркеров, широко применяемых в анализе метаболической активности клеток как бактерий, так и эукариот. В исходном (окисленном) состоянии этот феноксазиновый краситель имеет синий цвет,

нетоксичен, обладает слабой флуоресценцией и способен проникать в клетки. При восстановлении он необратимо превращается в розовый флуоресцентный продукт — резорурфин. Редокс-пара резазурин-резорурфин обладает таким окислительно-восстановительным потенциалом, что может выступать промежуточным акцептором в дыхательной цепи передачи электронов на любом участке вплоть до завершающего перехода между цитохромоксидазой и кислородом (O_2). Таким образом, накопление восстановленного резорурфина свидетельствует о протекании в клетках аэробного гликолиза [303].

Детектировать превращение резазурина в резорурфин можно как спектрофотометрически — по изменению цвета, так и флуориметрическим методом. Спектры поглощения и флуоресценции резазурина и резорурфина представлены на рис.2.4.

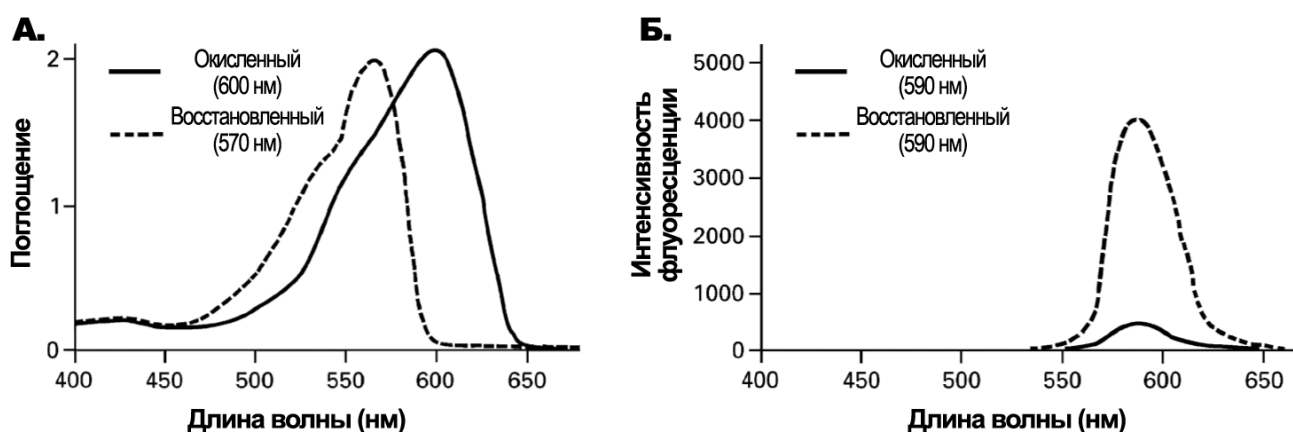


Рисунок 2.4. Спектры поглощения и флуоресценции окисленной и восстановленной форм резазурина [303]

При рассмотрении динамики подавления АМП метаболической активности бактериальных суспензий использовали флуориметрический вариант детекции. Тест проводили в 96-луночных белых непрозрачных планшетах для флуоресцентных/люминесцентных реакций с плоским дном, снабженных прозрачной крышкой. Схема эксперимента в целом совпадала с тем, как проводили исследование влияния АМП на проницаемость бактериальных мембран (см. п.2.4.2). Конечный объём проб также составлял 100 мкл. В первую очередь в лунки вносили по 25 мкл раствора пептида в 0,01 М натрий фосфатном буфере (рН 7,4) в концентрации $\times 4$ от желаемой конечной — с учётом

последующего разбавления другими компонентами. Затем добавляли по 5 мкл питательной среды — 2,1% бульона Мюллера–Хинтон — энергетического субстрата для бактериальной суспензии. Также вносили по 20 мкл стокового водного раствора резазурина с концентрацией 600 мкМ, что обеспечивало его конечную концентрацию 120 мкМ. Кроме того, добавляли по 25 мкл 0,01 М натрий фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 450 мМ NaCl для приведения ионной силы реакционной смеси к показателям физиологического раствора (150 мМ NaCl). В последнюю очередь добавляли суспензию тестируемой бактерии в 0,01 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 150 мМ NaCl, в концентрации $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, что давало конечную концентрацию бактериальных клеток в пробе равную $2,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Немедленно после внесения бактериальной суспензии планшет помещали в термостатируемый спектрофлуориметр, предварительно выведенный на режим поддержания температуры $+37^\circ\text{C}$, и регистрировали показания.

Бактериальную суспензию для эксперимента подготавливали аналогично *E. coli* ML-35 в п.2.4.2. Отрицательный контроль, иллюстрирующий протекание реакции превращения резазурина в резорурфин в отсутствие живых бактериальных клеток, готовили следующим образом. Вносили соответствующий объём 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 150 мМ NaCl вместо бактериальной суспензии. Положительный контроль, демонстрирующий уровень метаболической активности бактерий, не подвергающихся негативным влияниям со стороны тестируемых пептидов, готовили путем внесения в лунки соответствующего объёма 0,01 М натрий фосфатного буфера (рН 7,4) вместо АМП.

В эксперименте использовали 2–3 параллели проб и контролей. Измерения интенсивности флуоресценции проводили с использованием планшетного спектрофлуориметра Gemini EM (Molecular Devices, США) при температуре $+37^\circ\text{C}$ и с периодическим перемешиванием. Показания регистрировали при длине волны 590 нм с частотой 1 раз в 3 минуты на протяжении 4 часов. Возбуждение проб проводили при длине волны 560 нм. Запись данных осуществляли при

помощи прилагающегося к прибору программного обеспечения SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices, США). Построение зависимостей интенсивности флуоресценции от времени проводили с использованием программы SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., США).

2.4.4. Оценка влияния пептидов на формирование микробных биоплёнок спектрофотометрическим методом с использованием красителя кристаллического фиолетового

Биоплёнки представляют собой консолидированные сообщества бактериальных клеток, окруженных внеклеточным матриксом, состоящим из выделяемых ими высокомолекулярных соединений, и, как правило, прочно прикрепляются к поверхностям, на которых формируются [304, 305]. Одним из простых и распространённых методов количественной оценки биоплёнок является их окрашивание гистологическими красителями, в частности, кристаллическим фиолетовым. Кристаллический фиолетовый хорошо подходит для измерения общей массы биоплёнки, поскольку окрашивает как сами бактерии, так и внеклеточный матрикс. К недостаткам его использования можно отнести то, что с его помощью невозможно отличить живые бактериальные клетки в составе биоплёнки от мёртвых [306]. Тем не менее при рассмотрении влияния исследуемых соединений на процесс формирования бактериями биоплёнок, а не на уже сформированные биоплёнки, упомянутый недостаток не слишком существенен.

В данной работе о влиянии тестируемых АМП на формирование микробных биоплёнок судили по наличию статистически значимых различий в массе биоплёнок, образующихся в присутствии или в отсутствии пептидов, а количественную оценку этой массы проводили при помощи окраски кристаллическим фиолетовым и дальнейшей спектрофотометрии согласно стандартному протоколу [307].

Для постановки опыта использовали стерильные полистирольные 96-луночные планшеты с U-образным дном, снабженные крышками. Готовили двукратные серийные разведения тестируемых пептидов в той же жидкой

питательной среде, которая использовалась для культивирования бактерий (3% триптон-соевый бульон или 2,1% бульон Мюллера-Хинтон) и вносили в лунки планшета по 50 мкл в четырёх параллелях. Ночную культуру микроорганизмов в стационарной фазе роста разводили свежей питательной средой в 50 раз и также вносили по 50 мкл в лунки планшета. Объём проб составлял 100 мкл на лунку. Помимо опытных проб готовили 8–9 контролей, не содержащих АМП.

Планшеты инкубировали в течение 24 часов при температуре +37°C, после чего удаляли их содержимое и трижды отмывали чистой водой от не связавшейся бактериальной суспензии (путём погружения в заполненную водой ёмкость и последующего вытряхивания).

Затем оставшиеся на стенках лунок планшета адгезировавшиеся бактериальные клетки и компоненты матрикса окрашивали 0,1% водным раствором кристаллического фиолетового. В каждую из тестовых лунок вносили по 125 мкл красителя и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого раствор красителя удаляли, его не связавшиеся остатки отмывали чистой водой. Планшеты оставляли на воздухе до полного высыхания.

Для проведения количественного сравнения краситель, связавшийся с компонентами биоплёнки, переводили обратно в раствор. В каждую лунку добавляли по 200 мкл 30% уксусной кислоты и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. После инкубации содержимое лунок тщательно перемешивали и отбирали по 125 мкл в прозрачный 96-луночный плоскодонный планшет — для измерения оптической плотности. Измерения проводили при помощи планшетного спектрофотометра SpectraMax 250 (Molecular Devices, США) при длине волны 595 нм. Сравнение показателей для контрольных и опытных проб проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни ($p < 0,05$).

2.4.5. Оценка характера сочетанного антимикробного действия веществ в комбинации методом перекрёстного титрования. Фракционные индексы

При одновременном воздействии веществ, обладающих одним типом биологической активности (например, антимикробной), выделяют три основных сценария [308, 309]. Если присутствие одного вещества никак не влияет на

проявление активности другим веществом и наоборот, то наблюдаемый эффект их одновременного действия должен равняться простой сумме их индивидуальных эффектов. Такую ситуацию называют *аддитивностью* или *независимым действием*. Если наблюдаемый совместный эффект оказывается выше, чем ожидалось при простом суммировании, такой тип взаимодействия веществ называют *синергизмом*. Когда же наблюдаемый совместный эффект наоборот оказывается более слабым, чем ожидаемый для случая аддитивности, то говорят об *антагонизме* действия. Таким образом, основой методов исследования характера совместного действия является формальное, т.е. математически строгое, определение ситуации аддитивности.

Многообразие предложенных к настоящему времени моделей сводится к двум основополагающим подходам. В первом случае рассматриваются фиксированные дозы препаратов, а случай аддитивности описывается через соотношение величин их эффектов вместе и по отдельности. Математическое выражение для совместного аддитивного эффекта основывается на том, как в теории вероятности рассчитывается вероятность наступления хотя бы одного из набора совместных событий. Например, для двух веществ случай независимого действия будет выражаться формулой: $E_{AB} = E_A + E_B - E_A E_B$, где E_A и E_B — величины эффектов ($0 < E < 1$), оказываемых независимо веществами А и В в дозах, равных d_A и d_B , соответственно, а E_{AB} — величина эффекта от смеси веществ А и В в тех же дозах [310]. Определяемую таким образом аддитивность называют аддитивностью эффектов, гетероаддитивностью или *независимостью Бласса* [309–311].

Во втором случае наоборот выбирается фиксированный уровень эффекта и случай аддитивности определяется через соотношение доз, необходимых для достижения этого заданного уровня в случае действия веществ по отдельности, либо одновременно — в их смеси. Математическим критерием для определения аддитивности при таком подходе служит фракционный индекс I :

$$I = \left(\frac{d_A}{D_A} \right) + \left(\frac{d_B}{D_B} \right) + \left(\frac{d_C}{D_C} \right) + \dots$$

где D_A , D_B и D_C — индивидуальные дозы веществ А, В и С, обеспечивающие заданный эффект, а d_A , d_B и d_C — минимальные фракционные дозы веществ А, В и С в их смеси, демонстрирующей ту же эффективность. В идеальном случае (т.е. без учёта погрешностей) аддитивности соответствует индекс, равный единице. В основу этого соотношения положена идея о том, что вещество должно быть по определению аддитивно самому себе, т.е. если к половинной дозе вещества А добавить ещё половинную дозу того же вещества А, то эффект должен быть таким же, как от целой дозы вещества А. Более низкие значения индекса свидетельствуют о синергизме действия, более высокие — об антагонизме [310]. Такой подход называют аддитивностью доз, изоаддитивностью или *аддитивностью Лёве* [309–311].

В данной работе для анализа сочетанного антимикробного действия АМП и антибиотиков применяли метод серийных разведений по схеме «шахматной доски», также называемый методом перекрёстного титрования, в котором используется второй подход. В соответствии со схемой после приготовления двукратных серийных разведений первое вещество вносится в тестовый планшет так, что его концентрация уменьшается в направлении сверху-вниз в каждой следующей строке лунок. Второе вещество добавляется так, что его концентрация снижается в направлении справа-налево в каждом следующем столбце лунок. В первый столбец вместо второго вещества вносится аналогичный объём буфера, чтобы можно было в одном эксперименте отслеживать актуальный уровень МИК первого вещества. Аналогично в последнюю строку лунок не вносится первое вещество, чтобы можно было отслеживать МИК второго. В результате такой схемы получается полный набор возможных сочетаний концентраций первого и второго компонентов на основе их двукратных серийных разведений (рис.2.5).

Аналогично методу серийных разведений (п.2.4.1), исследование сочетанного антимикробного действия веществ проводили в стерильных 60-луночных микрокамерах Терасаки с V-образным дном. Разведения пептида и антибиотика производили в 10 мМ натрий-фосфатном буфере рН 7,4, содержащем 0,1% БСА, в лунки микропланшета вносили в объёме 2,5 мкл. Начальной

концентрацией выбирали $8 \times \text{МИК}$, что в расчёте на конечный объём 10 мкл давало концентрацию $2 \times \text{МИК}$, и производили не менее 5 последовательных разведений. В крайние левые и крайние нижние лунки, как упоминалось выше, вместо одного из компонентов вносили по 2,5 мкл буфера. Подготовку и добавление бактериальной суспензии, приготовление контролей и последующую инкубацию проводили аналогично описанному в п.2.4.1.

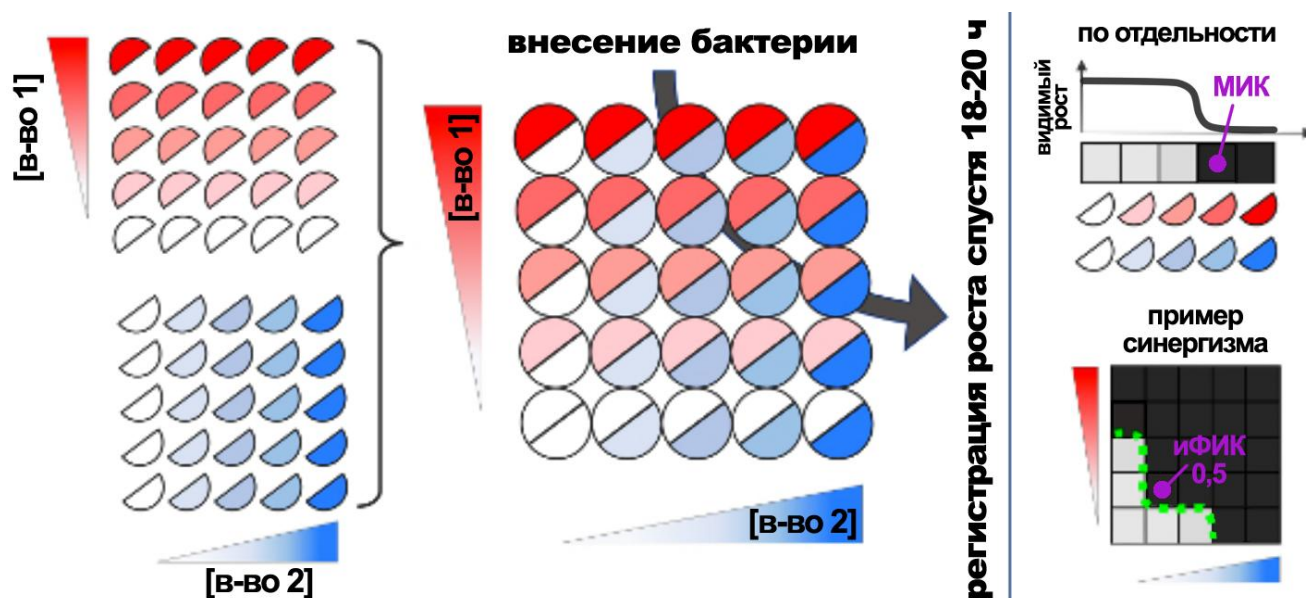


Рисунок 2.5. Схема перекрёстных серийных разведений и последующей регистрации иФИК (на основе [312])

После инкубации в каждом столбце и каждой строке планшета визуально выявляли лунки, в которых уровень эффекта соответствовал полному подавлению роста микроорганизмов и при этом концентрации веществ были наименьшими. Для таких сочетаний рассчитывали фракционный индекс, в данном случае именуемый индексом фракционной ингибирующей концентрации: $\text{иФИК} = [A]/\text{МИК}_A + [B]/\text{МИК}_B$, где МИК_A , МИК_B — значения МИК индивидуальных веществ А и В, а [А] и [В] — фракционные концентрации соответствующих веществ в их ингибирующей рост микроорганизмов комбинации. В зависимости от минимального значения индекса для пары веществ их совместное действие классифицировали как синергизм ($\text{иФИК} \leq 0,5$), аддитивность ($0,5 < \text{иФИК} \leq 1,0$), независимое действие ($1 < \text{иФИК} \leq 2$) или антагонизм ($\text{иФИК} > 2$). Граничные значения были выбраны в соответствии с рекомендациями, описанными в

литературе [313–316].

Тест повторяли 3–4 раза, итоговое значение минимального иФИК рассчитывали, как медиану.

2.5. Методы исследования активности пептидов

в отношении эукариотических клеток

2.5.1. Спектрофотометрическая оценка

гемолитической активности пептидов

Для начальной оценки цитотоксических эффектов исследуемых пептидов в отношении эукариотических клеток, в частности, их возможности повреждать эукариотические мембраны, тестировали их гемолитическую активность [317]. Использованный метод основан на количественном определении выходящего из разрушенных эритроцитов в раствор гемоглобина при помощи спектрофотометрии.

Из 100% осадка эритроцитов, полученного, как описано в п.2.2.3, отбирали 270 мкл в стерильную пробирку и доводили объём суспензии до 10 мл стерильным ЗФР. Содержание эритроцитов в приготовленной суспензии составляло 2,7%. Полученную суспензию хранили при +4°C и использовали в течение 24 часов.

Проводили двукратные серийные разведения тестируемых пептидов в ЗФР в концентрациях $\times 10$ от планируемых конечных значений. Готовили по 3 параллели проб, внося по 3 мкл раствора пептида в микропробирки с крышкой типа эппендорф объёмом 0,5 мл. После этого в пробирки добавляли по 27 мкл подготовленной суспензии эритроцитов, конечная концентрация эритроцитов составляла 2,5%. Кроме опытных проб готовили отрицательный контроль, демонстрирующий уровень спонтанного гемолиза в отсутствии цитотоксических веществ, для чего вместо раствора пептида в три микропробирки вносили аналогичный объём стерильного ЗФР. Также в трёх параллелях готовили положительный контроль, соответствующий полному лизису эритроцитов, для чего вместо пептида к суспензии эритроцитов добавляли 10% водный раствор

детергента Triton X-100. Все пробы, контрольные и опытные, инкубировали в течение 30 минут при температуре +37°C, после чего реакцию останавливали разбавлением, внося в каждую микропробирку по 90 мкл охлаждённого до температуры +4°C ЗФР. Остатки клеток осаждали центрифугированием при ускорении 8000 g в течение 4 минут, после чего по 100 мкл надосадочной жидкости переносили в плоскодонный 96-луночный планшет для последующей регистрации оптической плотности (OD). Поглощение проб определяли при длине волны 540 нм, близкой к одному из максимумов поглощения гемоглобина; с использованием планшетного спектрофотометра SpectraMax 250 (Molecular Devices, США). Процент гемолиза в экспериментальных пробах рассчитывали относительно положительного (100% гемолиз) и отрицательного (0% гемолиз) контролей по формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{OD_{540}(\text{пробы}) - OD_{540}(0\% \text{ гемолиз})}{OD_{540}(100\% \text{ гемолиз}) - OD_{540}(0\% \text{ гемолиз})} \cdot 100\%,$$

где OD_{540} пробы, 0% гемолиза и 100% гемолиза — величины оптической плотности содержащей пептид пробы, а также отрицательного и положительного контролей соответственно, измеренные при длине волны 540 нм.

Эксперимент повторяли трижды, результаты усредняли и представляли в виде «среднее \pm среднеквадратичное отклонение». Построение графиков зависимости интенсивности гемолиза от концентрации осуществляли с использованием программы SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., США).

2.5.2. Оценка цитотоксического действия пептидов при помощи МТТ-теста

Первичный анализ цитотоксических свойств пула тестируемых пептидов в отношении различных типов эукариотических клеток (нормальных и опухолевых) осуществляли при помощи МТТ-теста. Данный метод был предложен Мосманном в 1983 году [318] и явился первым быстрым колориметрическим микропланшетным тестом для оценки выживаемости клеток [319]. Благодаря высокой чувствительности и обусловленной планшетным форматом значительной пропускной способности (в сравнении с микроскопическим подсчётом) МТТ-тест

быстро стал «золотым стандартом» в области исследования клеточной выживаемости и пролиферации [320].

Непосредственно измеряемым параметром в МТТ-тесте является метаболическая активность. Используемый в тесте желтый тетразолиевый краситель МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид) в живых метаболизирующих клетках восстанавливается митохондриальными НАД(Ф)-зависимыми дегидрогеназами до нерастворимого формазана, накапливающегося в виде синих кристаллов, которые затем, при добавлении органического растворителя, дают пурпурный оттенок. Количество восстановленного продукта считают пропорциональным числу метаболизирующих клеток [319, 321].

Тест проводили в стерильных плоскодонных 96-луночных планшетах для суспензионных культур клеток с прозрачным дном (Costar, США). Лунки по краям планшета заполняли стерильным ЗФР или питательной средой для уменьшения риска контаминации экспериментальных проб и снижения испарения. Суспензии клеток в стерильной питательной среде RPMI-1640 без сыворотки в концентрации 222500 клеток/мл готовили, как описано в п.2.2. По 90 мкл подготовленной клеточной суспензии, т.е. по 20 тыс. клеток, вносили во все экспериментальные лунки, кроме контроля 0% выживаемости, куда вместо клеток вносили 90 мкл питательной среды без клеток. Двукратные серийные разведения тестируемых пептидов проводили в той же питательной среде в концентрациях $\times 10$ от планируемых конечных и вносили в тестовый планшет в трёх параллелях в объёме 10 мкл на лунку. В контроли — как 100% выживаемости (содержащие клетки), так и 0% выживаемости (не содержащие клеток) — вместо пептидов вносили по 10 мкл питательной среды. Контрольных проб готовили не менее 5–6. Тестовые планшеты на 18–20 ч помещали в CO₂-инкубатор (5% CO₂; температура +37°C). По окончании инкубации во все пробы вносили по 10 мкл водного раствора МТТ с концентрацией 2 мг/мл и инкубировали в течение 4 часов в CO₂-инкубаторе (5% CO₂; температура +37°C). После инкубации для растворения образовавшихся кристаллов формазана во все экспериментальные лунки

добавляли по 100 мкл изопропанола; содержание лунок для лучшего и полного растворения тщательно перемешивали путём многократного пипетирования. Чтобы при дальнейшем спектрофотометрическом измерении концентрации образовавшегося формазана избежать интерференции со стороны содержащегося в питательной среде индикатора рН фенолового красного [319], используемый изопропанол предварительно закисляли добавлением соляной кислоты (до концентрации 40 мМ).

Оптическую плотность экспериментальных проб измеряли с помощью планшетного спектрофотометра SpectraMax 250 (Molecular Devices, США) при двух длинах волн: 540 нм — близкой к максимуму поглощения формазана — и 690 нм — для отсекающего фонового неспецифического поглощения, равномерного по всему спектру. Процент жизнеспособных клеток (ЖК) определяли по следующей формуле:

$$\% \text{ жк} = \frac{OD_{540-690}(\text{пробы}) - OD_{540-690}(0\% \text{ жк})}{OD_{540-690}(100\% \text{ жк}) - OD_{540-690}(0\% \text{ жк})} \cdot 100\%,$$

где $OD_{540-690}$ — разность показателей оптической плотности при длинах волн 540 и 690 нм для экспериментальных проб и контролей 0% и 100% выживаемости (0% и 100% жк соответственно). На основании полученных данных с использованием программы Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., США) строили кривые доза-эффект. С помощью нелинейной регрессии находили значение 50% эффективной (в данном случае — цитотоксической) концентрации (ЭК50). Значения ЭК50 усредняли по данным трёх независимых экспериментов и представляли как выборочное среднее \pm среднеквадратичное отклонение.

2.5.3. Исследование динамики токсического действия путём микроскопического подсчёта доли погибших клеток с использованием маркера клеточной гибели трипанового синего

Окраска трипановым синим является широко распространённым методом оценки жизнеспособности клеток при микроскопии. Цитоплазматическая мембрана живых клеток непроницаема для этого красителя, поэтому их цитоплазма остается прозрачной. Когда же трипановый синий проникает в

поврежденные клетки, он связывается с внутриклеточными белками и придает им синий цвет [322]. Микроскопический метод прямого подсчёта числа погибших клеток использовали при детальном анализе динамики цитотоксического действия АМП.

Суспензии эукариотических клеток в концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде RPMI-1640 (без добавления сыворотки) готовили, как описано в п.2.2, и инкубировали с различными концентрациями исследуемых пептидов в течение различных периодов времени в CO₂-инкубаторе (5% CO₂) при температуре +37°C. Использовали стерильные микропробирки типа эппендорф с крышками объёмом 0,5 мл, куда последовательно вносили 10 мкл раствора пептида в среде RPMI-1640 в концентрации $\times 10$ от желаемой конечной и 90 мкл клеточной суспензии, и начинали отсчёт времени инкубации. В контрольные временные отметки, в которые производилось измерение соотношения живых и погибших клеток, содержимое пробирки перемешивали и отбирали по 10 мкл суспензии для анализа. Взятый образец окрашивали в течение 3 мин при комнатной температуре добавлением 5 мкл 0,2%-ного раствора красителя трипанового синего (Merck, Германия) в ЗФР, после чего подсчитывали соотношение мертвых и живых клеток под микроскопом при помощи счётной камеры Горяева согласно методике, описанной в п.2.2.2. Процент жизнеспособных клеток вычисляли следующим образом:

$$\% \text{ жизнеспособных клеток} = \frac{\text{общее количество жизнеспособных клеток}}{\text{общее количество клеток}} \cdot 100\%.$$

Для построения графиков зависимости гибели клеток от времени эксперимент повторяли трижды. Данные по каждой временной отметке представляли как среднее \pm среднеквадратичное отклонение.

2.5.4. Дифференциальный подсчёт клеток, погибающих по пути некроза или по пути апоптоза, при помощи набора красителей, включающего аннексин V с флуоресцентной меткой

За исключением некоторых специфических сценариев, таких как аутофагия или митотическая катастрофа, обычно выделяют два основных пути клеточной

гибели: некроз и апоптоз. Некроз — патологический процесс, развивающийся в случае масштабного повреждения клетки, а также в условиях энергонедостаточности. Апоптоз — более физиологичный программируемый путь клеточной смерти, являющийся основным способом избавления организма от повреждённых (мутировавших, поражённых инфекцией и т.п.) клеток. В последние годы, однако, было показано, что некроз также может иметь программируемый характер. По современным представлениям, с биологической точки зрения, принципиальным различием между этими двумя процессами является то, какие последствия гибель клетки по тому или иному механизму несет для окружающих тканей и организма в целом. Некроз всегда сопровождается развитием воспаления и иммунного ответа на антигены, содержащиеся в остатках разрушившихся клеток. При апоптозе эти процессы наоборот не характерны: апоптотические тельца выделяют определённый набор хемокинов и противовоспалительных цитокинов, имеют на поверхности мембраны специфические лиганды, определяющие их быстрый и «аккуратный» фагоцитоз макрофагами или окружающими клетками без развития воспаления [323].

Для того чтобы различить, какой из двух процессов преимущественно имеет место при воздействии на эукариотические клетки тестируемых пептидов, использовали дифференциальный метод окраски при помощи коммерческого набора «Annexin V-Cy3 Apoptosis Detection kit» (Sigma, США), в который входит два флуоресцентных красителя.

Первый — 6-карбоксифлуоресцин диацетат (6-КФДА) — в своей исходной форме не флуоресцирует, однако под воздействием эстераз в жизнеспособных (или, по крайней мере, ещё сохраняющих функциональную активность) клетках он подвергается гидролизу с образованием зелёного флуоресцентного продукта 6-карбоксифлуоресцина.

Второй — аннексин-Cy3.18 (AnnCy3) — конъюгат белка аннексина V и красного флуоресцентного цианинового красителя. Белки семейства аннексинов способны связываться с фосфолипидами в присутствии ионов кальция, в частности, аннексин V отличается высокой афинностью и селективностью к

фосфатидилсерину [324]. В норме в живых клетках фосфатидилсерин располагается на внутреннем листке плазмалеммы и может стать доступен для связывания только при существенном её повреждении, например, вследствие некроза. Асимметрия фосфолипидного состава внешнего и внутреннего слоёв цитоплазматической мембраны поддерживается работой таких клеточных ферментов, как флиппаза (Mg^{2+} -АТФ-зависимая аминоксффолипидтранслоказа). На начальной стадии апоптоза одним из важных сигналов является нарушение данной липидной асимметрии: происходит транслокация фосфотидилсерина во внешний слой мембраны, например, за счёт активации скрамблазы [325–327]. Поэтому с началом апоптотического процесса фосфатидилсерин также становится доступен для связывания с аннексином V.

Таким образом, при совместном применении двух указанных красителей живые клетки должны демонстрировать только зелёный флуоресцентный сигнал, клетки, погибшие по пути некроза, — только красный, а клетки на ранних стадиях апоптоза будут включать оба красителя.

Чтобы оценить, по какому пути преимущественно реализуется цитотоксическое действие исследуемых пептидов, суспензии эукариотических клеток инкубировали в их присутствии в течение 2 часов в тех же условиях, что и при анализе гибели клеток с использованием красителя трипанового синего (см. п.2.5.3). После окончания инкубации клетки дважды промывали ЗФР — центрифугировали при ускорении 300 g и температуре $+4^{\circ}C$ в течение 10 мин и удаляли надосадочную жидкость, а затем ресуспендировали в том же объёме в окрашивающем растворе, приготовленном в соответствии с приложенной к набору инструкцией [328] и содержащем 1 мкг/мл AnnCy3 и 0,5 мМ 6-КФДА в однократном связывающем буфере. После 10 мин инкубации при комнатной температуре клетки отмывали от избытка красителей однократным связывающим буфером, ресуспендировали и анализировали с помощью люминесцентного микроскопа (Leica DM2500, Leica Microsystems, Германия). Для каждого образца дифференциальный подсчёт производили в нескольких полях зрения, так, чтобы общее количество проанализированных клеток было не менее 400. Процент

жизнеспособных, некротизированных и вошедших в апоптоз клеток вычисляли аналогично проценту жизнеспособных клеток в п.2.5.3 и представляли как среднее \pm среднеквадратичное отклонение, рассчитанное по результатам трёх независимых экспериментов.

2.5.5. Оценка противоопухолевого действия *in vivo* в модели перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха мыши

Оценку противоопухолевого потенциала пептидов *in vivo* проводили на модели перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей в соответствии с протоколом 1/20 от 27.02.2020, одобренным Этическим комитетом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Использовали мышей-самцов гибридов первого поколения F1 C57BL/6J \times CBA/J (Питомник лабораторных животных «Рапполово», РФ) возрастом 4–6 месяцев; в экспериментальные группы отбирали животных весом 28 ± 2 г. Животные содержались в соответствии с установленными нормами в условиях стационарного вивария: при постоянной комнатной температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и 12:12 ч цикле чередования света и темноты, со свободным доступом к воде и пище на стандартном рационе. Исходная культура клеток АКЭ была любезно предоставлена д.м.н. Киселёвой Е.П. (Отдел иммунологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, РФ) и поддерживалась путём внутрибрюшинного введения здоровой мыши клеток АКЭ от мыши с развившимся асцитом каждые 10–14 дней. Для этого отобранную асцитическую жидкость разбавляли стерильным физиологическим раствором в 10 раз и вводили в объёме 0,3–0,5 мл здоровому животному при помощи шприца.

Для эксперимента забор асцитической жидкости из брюшной полости мыши проводили на 10-е сутки после исходной инокуляции клеток опухоли. Клетки дважды промывали стерильным ЗФР: центрифугировали при ускорении 300 g и температуре $+4^\circ\text{C}$, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали в свежей порции ЗФР, — после чего подсчитывали концентрацию клеток в суспензии с помощью камеры Горяева, как описано в п.2.2.2, и разбавляли до $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Затем здоровым животным подкожно вводили по 0,2 мл приготовленной суспензии клеток АКЭ ($2 \cdot 10^5$ клеток на животное) в область

верхней части спины и случайным образом делили на группы по 8 особей. Каждую группу содержали в отдельной клетке. День введения опухолевых клеток считали 0-ым днём. Начиная с 1-го дня и далее раз в неделю в течение месяца животным проводили инъекции исследуемых препаратов. Экспериментальные группы получали различные дозы пептида, растворенного в деионизированной воде; контрольная группа — эквивалентный объём деионизированной воды. Введение проводили внутривентриально в объёме 0,1 мл на животное. Среднее время выживания в экспериментальных группах сравнивали с контролем, используя U-критерий Манна–Уитни ($p \leq 0,05$). На основании данных о выживаемости также строили кривые Каплана–Мейера и проводили их сравнение при помощи логарифмического рангового критерия.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Особенности действия кателицидина ChVac3.4 на проницаемость бактериальных мембран и метаболическую активность бактериальных клеток в суспензии

Кателицидин ChVac3.4, который в данной работе является основным объектом и платформой для разработки структурных аналогов, относится к подгруппе линейных АМП с повышенным содержанием определённых аминокислот: в данном случае — пролина.

У позвоночных животных одним из наиболее многочисленных семейств пролин-богатых пептидов являются бактенецины. Название было предложено в 1989 году, когда подобные АМП были впервые выделены из лейкоцитов коровы [69], и происходит от латинских слов «*bacterium*» — бактерия и «*necare*» — убивать. Сокращённое обозначение выделенных пептидов было образовано от названия нового семейства — Vac, а следующий затем числовой номер соответствовал их молекулярной массе в кДа. Сходным по структуре пептидам, обнаруженным позднее у других видов животных, стали давать названия по той же схеме, дополняя приставкой, указывающей на источник выделения. Так ChVac3.4, наряду с несколькими другими бактенецинами: ChVac5, мини-ChVac7.5N α и β , — был выделен из лейкоцитов домашней козы *Capra hircus* [23, 72, 329].

Типичные представители семейства бактенецинов, как и многие другие обогащённые пролином АМП, характеризуются выраженным противомикробным действием преимущественно в отношении грамотрицательных микроорганизмов и низкой токсичностью в отношении клеток организма животных и человека [69, 330–332]. Ведущим путём реализации их антимикробной активности считают нелитический механизм, основанный на взаимодействии с внутриклеточными мишенями [90, 92, 93, 95]. При этом показано, что возможен энергозависимый транспорт молекул таких АМП в клетку с участием переносчика, обладающего стереоспецифичностью, например, в *E. coli* был идентифицирован мембранный

белок SbmA выполняющий такую функцию [21]. Описанную для некоторых бактенецинов способность неспецифического повышения проницаемости бактериальных мембран полагают вторичным механизмом, реализующимся в присутствии сравнительно высоких концентраций данных пептидов, в несколько раз превышающих их МИК [331].

Пептид ChVac3.4 выделяется среди других открытых бактенецинов необычно широким спектром антимикробной активности, а также цитотоксическими эффектами в отношении отдельных типов эукариотических клеток. Он демонстрирует способность эффективно подавлять рост не только грамотрицательных, но и грамположительных бактерий [23]. Также было установлено, что в сравнении с другими бактенецинами он обладает существенно более выраженным повреждающим действием на мембраны микроорганизмов, делая их проницаемыми не только для неорганических ионов, но и более крупных маркерных молекул [23], хоть его эффект и развивается медленнее, чем у таких активных мембранолитических пептидов, как мелиттин [333] или протегрин-1 свиньи [23].

Рисунок 3.1 иллюстрирует влияние различных концентраций бактенецинов ChVac5 и ChVac3.4 на проницаемость мембраны тестового штамма *E. coli* ML-35p для маркерных молекул (см. п.2.4.2). В отличие от ChVac3.4, ChVac5, как было показано ранее, проявляет активность типичную для большинства пролин-богатых пептидов, сходную, в частности, с активностью коровьего ортолога Vac5 [72].

Помимо мощного повреждающего действия на цитоплазматическую мембрану, для ChVac3.4 прослеживается выраженная зависимость скорости и амплитуды наблюдаемого эффекта от концентрации. Это косвенно указывает на то, что мембранолитический механизм играет важную роль в реализации его антимикробных свойств и вносит свой вклад даже при низких концентрациях порядка МИК.

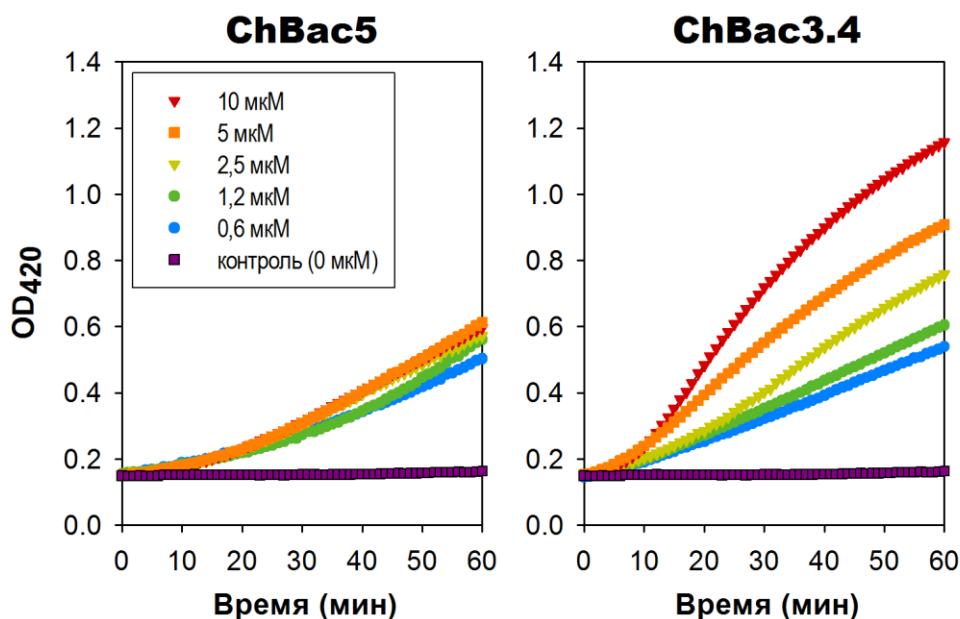


Рисунок 3.1. Кинетика накопления продукта расщепления хромогенного маркера ONPG цитоплазматической β -галактозидазой *E. coli* ML-35р, иллюстрирующая повышение проницаемости внутренней мембраны данной бактерии в присутствии различных концентраций пептидов ChBac5 и ChBac3.4 (получено по методике, описанной в п.2.4.2)

В то же время анализ динамики действия ChBac3.4 на метаболическую активность бактерий с использованием маркера дыхательной активности резазурина, проведённый как описано в п.2.4.3, в сравнении с ChBac5 и мембранолитическим пептидом протегрином-1 свиньи, показывает картину, имеющую черты, присущие как первому, так и второму (рис. 3.2). В случае *E. coli* ML-35р и *E. coli* ESBL 521/17 ChBac3.4 демонстрирует сходный с протегрином стабильный выход на плато. При этом соответствующие действию ChBac3.4 кривые имеют более резкий перегиб на начальном участке, чем более плавно восходящие кривые, отражающие эффект ChBac5 (в особенности для *E. coli* ESBL 521/17).

Однако на примере эксперимента с *A. baumannii* 7226/16 видно, что ChBac3.4 могут быть присущи и паттерны, характерные для веществ, нарушающих какие-либо внутренние обменные процессы в бактериальных клетках, когда подавление жизнедеятельности последних развивается медленнее, чем при дезинтеграции их мембран. Этим фактом может объясняться наблюдающееся ускорение накопления продукта восстановления резазурина в

присутствии ChBac3.4 (отмечено стрелкой на рис. 3.2 В), свидетельствующее об усилении дыхательной активности бактерий спустя приблизительно 2 часа от момента внесения пептида в их ростовую среду.

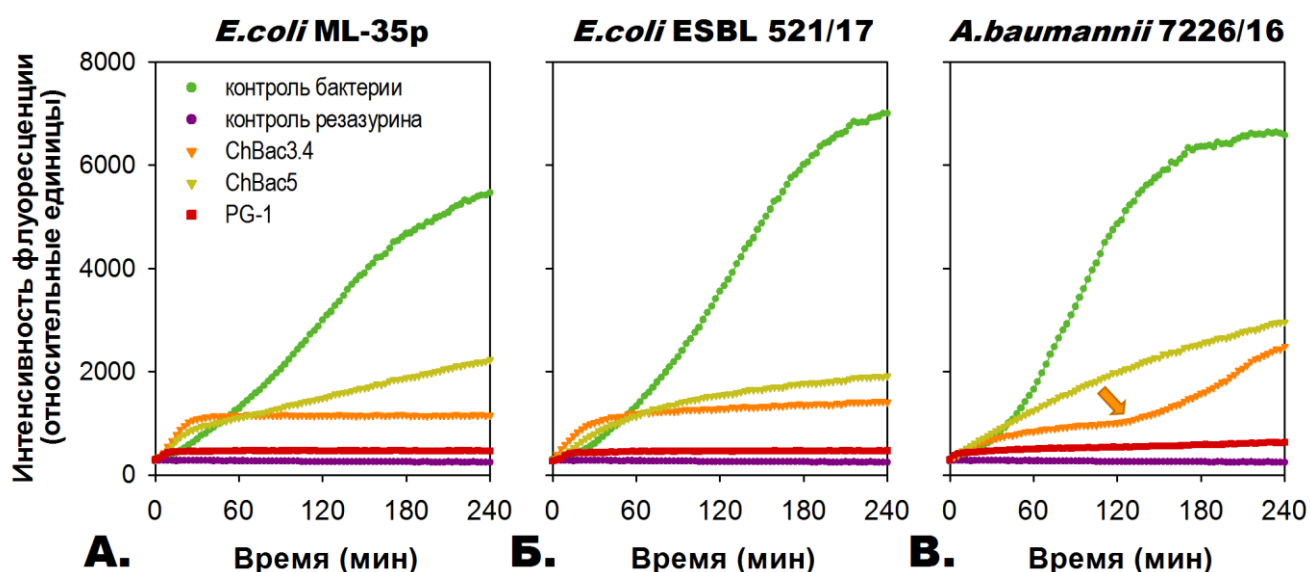


Рисунок 3.2. Кинетика превращения дыхательного маркера резазурина в восстановленный флуоресцентный продукт резорифин, отражающая метаболическую активность бактерий в присутствии АМП в концентрации, равной МИК (получено по методике, описанной в п.2.4.3). Выход кривых на плато соответствует либо полному превращению маркера в восстановленную форму (при высокой интенсивности флуоресценции), либо отсутствию активно метаболизирующих бактерий. Минимальные ингибирующие концентрации рассмотренных АМП в отношении использованных штаммов бактерий, определённые методом серийных разведений в жидких питательных средах, содержащих микроорганизмы (см. п.2.4.1), приведены ниже. Указаны медианы по результатам 3–4 независимых экспериментов.

Пептиды	МИК (мкМ) в отношении бактерий:		
	<i>E. coli</i> ML-35p	<i>E. coli</i> ESBL 521/17	<i>A. baumannii</i> 7226/16
ChBac3.4	2	4	4
ChBac5	2	3	5
PG1	3	3	3

В контексте возможного практического применения привлекательными чертами мембранолитических АМП являются быстрая реализация их противомикробного действия и неспецифичность мишени, что, по мнению исследователей, является существенными факторами, затрудняющими развитие к

ним устойчивости [334–337]. Также было показано, что такие пептиды чаще проявляют синергизм действия с антибиотиками [201], что открывает большие перспективы для создания комбинированных препаратов.

Обогащённые пролином пептиды, действующие по внутриклеточному механизму, отличаются низкой побочной токсичностью для клеток человека и животных. Также, учитывая тот факт, что богатые пролином последовательности, удовлетворяющие определённым паттернам, широко представлены в активных центрах, взаимодействующих с рядом белковых доменов, например SH3 и WW [19], пролин-богатые пептиды с высокой вероятностью могут вовлекаться в белок-белковые взаимодействия и, соответственно, существует большая вероятность обнаружить у них дополнительные биологические свойства. Так, например, для наиболее изученного пролин-богатого пептида PR-39, который имеет высокую (до 70%) структурную гомологию с бактенецинами, описаны способности стимулировать ранозаживление и ангиогенез, выступать хемоаттрактантом для нейтрофилов и повышать их фагоцитарную активность, регулировать продукцию различных цитокинов иммунными клетками, ингибировать апоптоз, оказывать избирательное онколитическое действие [55, 338, 339].

ChVac3.4 в определённой степени объединяет черты как первых, так и вторых и, таким образом, сам по себе является привлекательным кандидатом для разработки оптимизированных по биологическим свойствам вариантов с перспективой практического применения. В то же время представляет интерес и выявление конкретных молекулярных детерминант в структуре ChVac3.4, важных для реализации тех или иных аспектов его биологической активности, и анализ принципов их сопряжения в единой структуре для обеспечения необычной итоговой комбинации. Именно этим вопросам и была посвящена представленная работа.

3.2. Выбор модификаций ChVac3.4 для последующего синтеза и анализа биологической активности

Мультицелевые, но специфические к определённым мишеням механизмы действия пролин-богатых пептидов, часть из которых присуща и ChVac3.4, делают исследование взаимосвязи структуры и активности таких пептидов более сложной и менее предсказуемой задачей в сравнении с АМП, действие которых обусловлено преимущественно мембранолитической активностью. Если для последних зачастую используют подход, основанный на варьировании в первую очередь физико-химических свойств их последовательности (заряда, гидрофобности, амфипатичности, симметрии), то для пролин-богатых пептидов необходимо также учитывать эффекты присутствия и взаимного расположения отдельных аминокислотных остатков или их групп с учётом их возможной роли во взаимодействиях со специфическими молекулярными мишенями.

ChVac3.4 имеет аминокислотную последовательность **RFRLPFRRPPI RINPPPFYPPFRRFL-NH₂**, в которой прослеживается значительное сходство (66% идентичности), в особенности в *N*-концевом участке (выделен жирным шрифтом), с аминокислотной последовательностью ChVac5 (**RFRRPPIRRPPI RPPF NPPF RPPV RPPF RPPF RPPF RPPI GPFP-NH₂**). Кроме того, в составе обоих белков присутствует сигнальная последовательность амидирования на *C*-конце (GRR). Однако ChVac5 включает восемь повторов вида RPPX или NPPX, тогда как ChVac3.4 имеет только один (обозначены подчёркиванием; X — остаток одной из гидрофобных аминокислот: F, I, V), 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 сигнальную последовательность амидирования GRR).

Чтобы определить, какие структурные особенности бактенецина ChVac3.4 имеют решающее значение для реализации антибактериальной активности, а также для проявления цитотоксического действия по отношению к клеткам

млекопитающих, был разработан и синтезирован набор структурных аналогов этого пептида, представленных в таблице 3.1.

Выбранный набор структурных аналогов был продиктован тем, что, во-первых, планировали прояснить роль *C*-концевого амидирования в эффектах пептида на бактерии или эукариотические клетки. С этой целью для ряда вариантов были рассмотрены модификации, отличающиеся только наличием или отсутствием амидирования (обозначены в таблице 3.1 окончаниями $-NH_2$ или $-COOH$ после названия пептида, соответственно).

Во-вторых, хотели проверить важность *N*-концевой области пептида для осуществления различных видов активности. Было обнаружено, что для некоторых обогащённых пролином АМП млекопитающих эта область является критически необходимой для успешной реализации противомикробного эффекта [340–342]. В то же время не изучено значение этой области в случае действия пептида на клетки млекопитающих. В связи с этим в набор исследуемых модификаций были включены укороченные *N*- и *C*-концевые фрагменты ChVac3.4.

В-третьих, рассматривали возможную роль остатка гистидина (с учётом того, что он не встречается в структуре других бактенецинов, выделенных из лейкоцитов козы), поскольку эта аминокислота способна к образованию различных типов связи (водородных — с участием не только основной, но и боковой цепи; формированию солевых мостиков; стэкинг-взаимодействию с другими ароматическими аминокислотами) и, соответственно, с высокой долей вероятности может вовлекаться в процесс белок- или пептид-белковых взаимодействий [343]. Так, рассматривали аналог ChVac3.4 с делецией гистидина из участка RINPPPF (с 12 по 18 аминокислотный остаток) — ChVac3.4(H-), — а также варианты, в которых весь этот участок был удвоен, — серию ChVac3.4-1. Это также позволило исследовать возможный вклад всего данного участка, наименее гомологичного по своей последовательности ChVac5, в реализацию спектра активности ChVac3.4.

Таблица 3.1. 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>PIRHPPPFYP</u> 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>PIRHPPPFYP</u> PFRRFL-COOH	неамидированный по C-концу аналог ChBac3.4	+7
ChBac3.4-1-NH ₂	RFRLPFRR <u>IHPPPFVRIHPPPFYRRFL-NH₂</u>	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>IHPPPFVRIHPPPFYRRFL-COOH</u>	неамидированный по C-концу аналог ChBac3.4-1	+7
RFR-ChBac3.4-1-NH ₂	RFR RFRLPFRR <u>IHPPPFVRIHPPPFYRRFL-NH₂</u>	Версия ChBac3.4-1 с дополнительным триплетом RFR на N-конце молекулы; C-конец амидирован	+10
ChBac3.4-2-COOH	RFRLPFRRP W <u>PIRHPPPFYP</u> 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>PIRI</u> <u>PPPFYP</u> 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>RIHPPPFYP</u> 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>PIRHPPPFY-NH₂</u>	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>PIRH-NH₂</u>	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>PIRH-NH₂</u>	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.

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

Кроме того, на основании данных о значительном влиянии на активность первых нескольких аминокислот в *N*-концевой последовательности у ряда других бактенецинов [16], удвоение начального триплета RFR было рассмотрено в качестве возможной стратегии усиления биологических свойств подобных АМП. Дополнительный RFR-мотив был добавлен как к самому короткоцепочечному 14-аминокислотному *N*-концевому фрагменту, не включавшему 12–18 RINPPPF последовательность целиком (RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂), так и к варианту с двойным таким повтором RINPPPF (RFR-ChVac3.4-1-NH₂).

Наконец, в качестве ещё одной потенциальной стратегии повышения активности исследовали эффект от введения в последовательность ChVac3.4 остатков триптофана, поскольку другая специфическая группа АМП, богатая данной аминокислотой, известна широким спектром действия, хотя довольно часто её представители отличаются и заметными гемолитическими свойствами.

Для перечисленного в таблице 3.1 набора пептидов на основе ChVac3.4 после осуществления синтеза планировали рассмотреть влияние внесённых в структуру изменений на величину антимикробной и цитотоксической активности, на спектр и селективность действия; принять во внимание способность влиять на мембраны бактериальных и эукариотических клеток. Наиболее перспективные по эффективности и селективности варианты предполагалось исследовать дополнительно, оценив способность препятствовать образованию биоплёнок, синергетически взаимодействовать с традиционными антибиотиками и реализовать противоопухолевый потенциал не только *in vitro*, но и в *in vivo* модели (перевиваемой опухоли мыши АКЭ).

3.3. Химический синтез разработанных модифицированных вариантов

ChVac3.4 и анализ чистоты полученных препаратов

Пептиды, перечисленные в таблице 3.1, были синтезированы методом твердофазного химического синтеза, как описано в п.2.3.1, затем очищены и проанализированы для определения степени очистки методом ОФ ВЭЖХ (согласно п.2.3.2) и идентифицированы как соответствующие расчетным массам на основании соотношений массы к заряду, полученных по результатам MALDI

TOF масс-спектрометрии (сообразно п.2.3.3). Примеры хроматограмм до и после очистки представлены на рисунке 3.3. Примеры аналитических хроматограмм представлены на рисунке 3.4. Примеры масс-спектров представлены на рисунке 3.5. Сводные данные по всем синтезированным пептидам представлены в таблице 3.2.

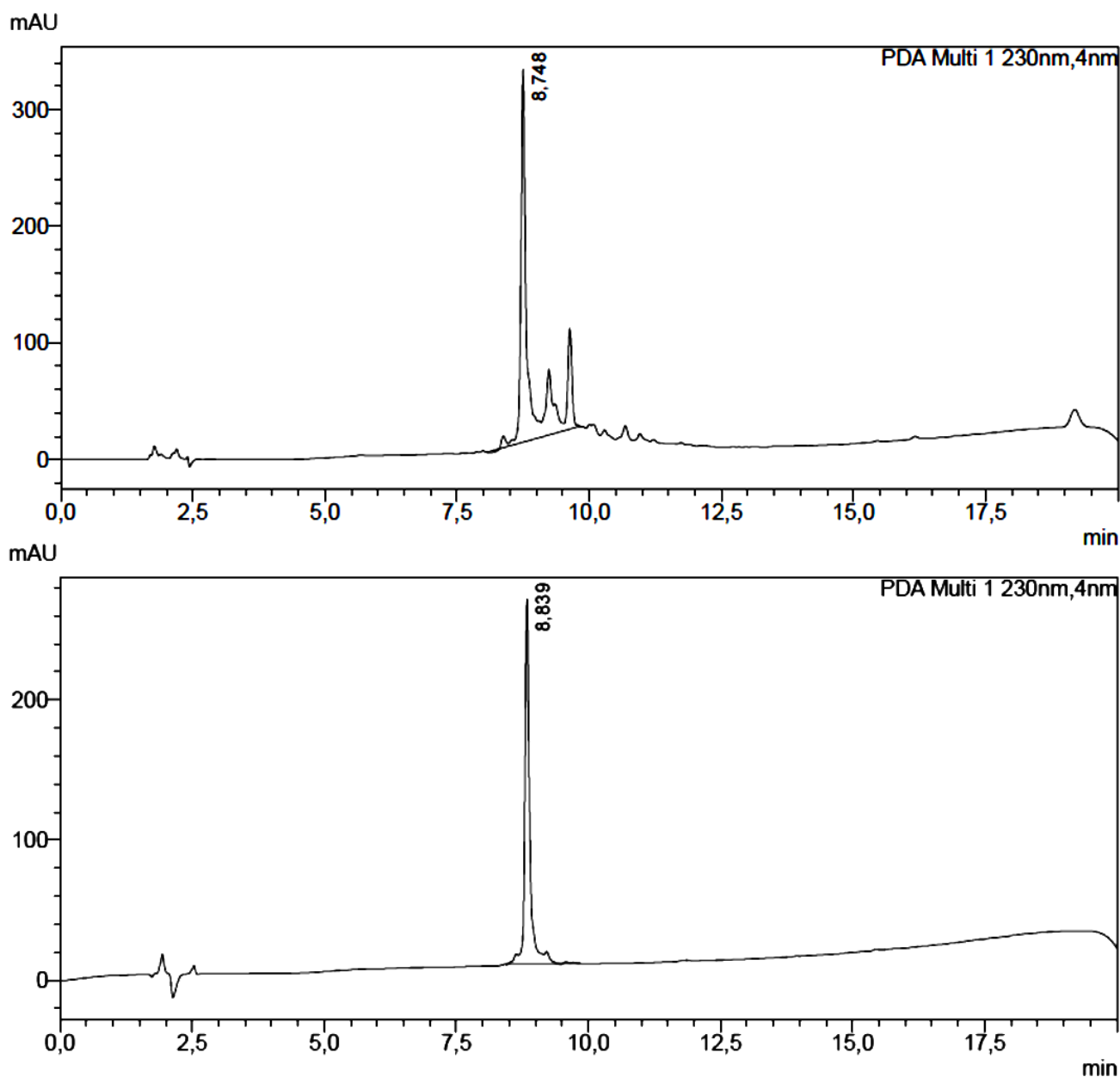


Рисунок 3.3. Хроматограммы ChBac3.4(1-14)-NH₂ до и после первого этапа очистки (получены при одинаковых условиях на колонке Shimadzu C18 в линейном градиенте ацетонитрила 0–70%)

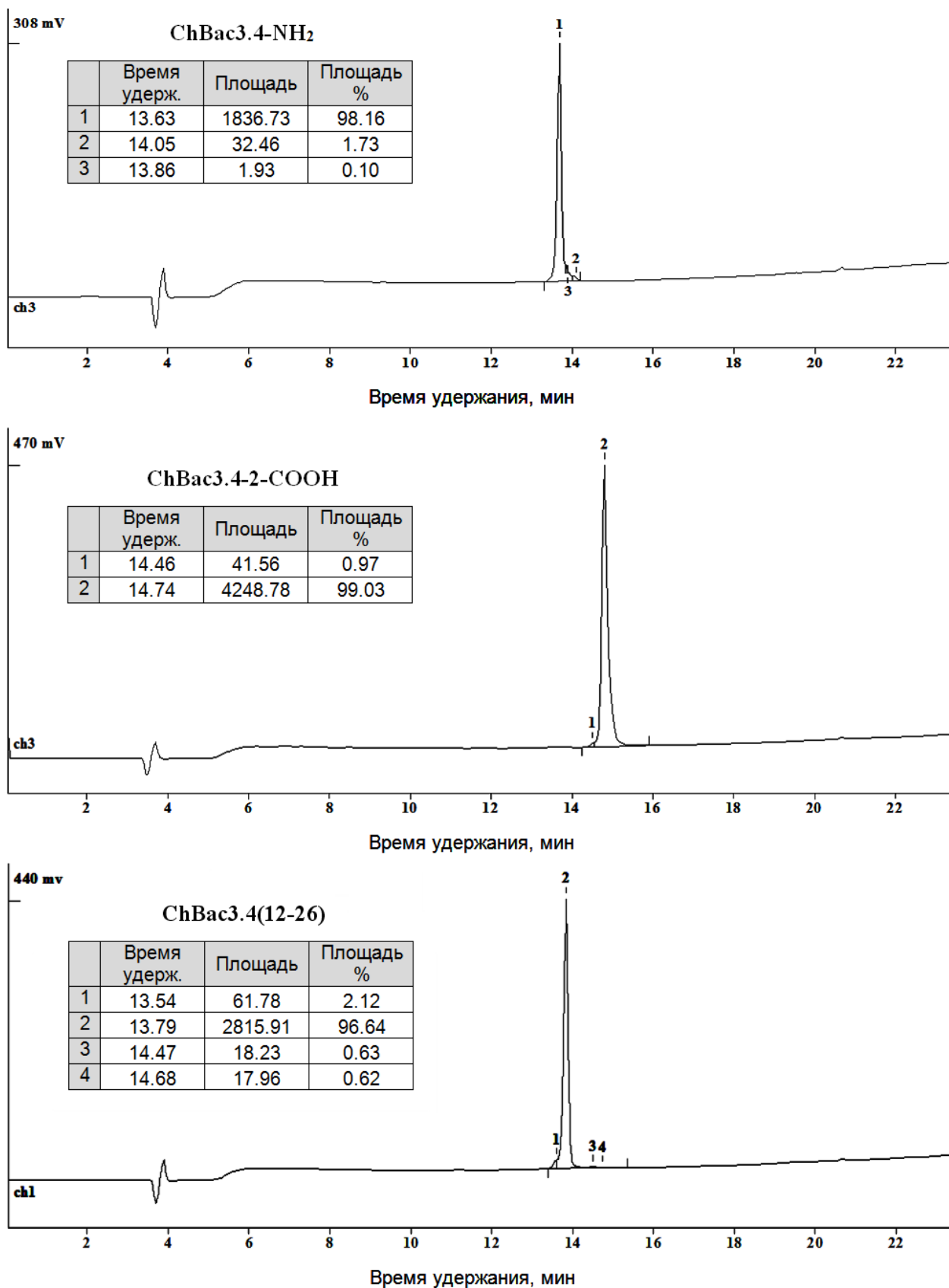


Рисунок 3.4. Примеры хроматограмм синтезированных пептидов после очистки
 Колонка: Luna C18 250×4,6 мм, 5 мкм. Подвижная фаза: 0,1% ТФУ в воде / ацетонитрил.
 Градиент: 7-70 % ацетонитрила за 20 мин. Скорость потока: 1 мл/мин. Детектор: УФ 220 нм.

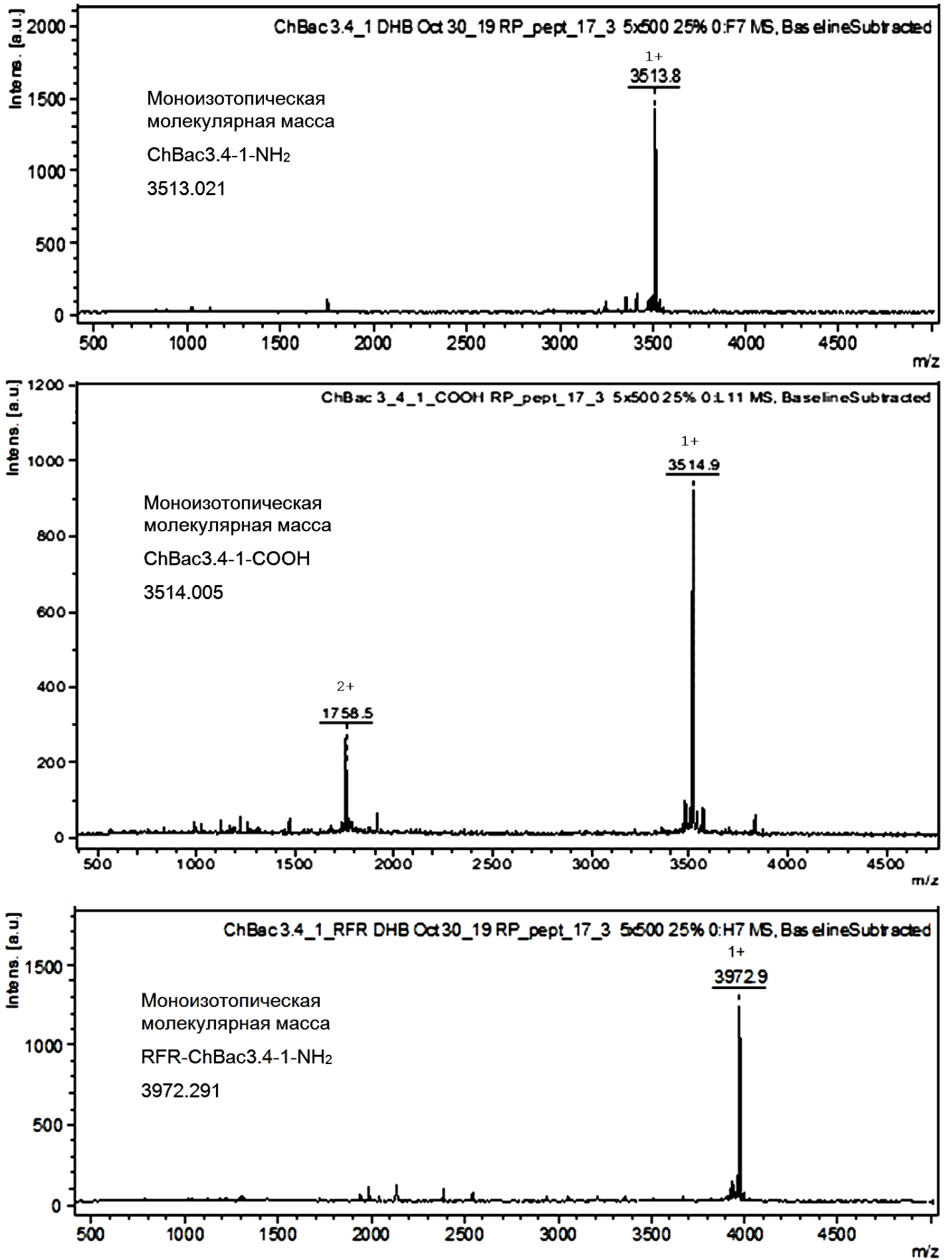


Рисунок 3.5. Примеры масс-спектров синтезированных пептидов (получено по методике, описанной в п.2.3.3)

Таблица 3.2. Характеристики полученных пептидов

Пептид	Препаративная ОФ ВЭЖХ	Аналитическая ОФ ВЭЖХ		Масс-спектрометрия	
	Чистота после синтеза, %	Чистота после очистки, %	Время удержи- вания, мин	Моноизо- топическая молекулярная масса, Да	m/z для (M+H) ⁺¹ или (M+2H) ⁺²
ChVac3.4-NH ₂	68,3	98,16	13,63	3373,95	3374,9 (+1)
ChVac3.4-COOH	69,9	96,09	13,86	3374,93	3375,9 (+1)
ChVac3.4-1-NH ₂	74,0	96,06	13,19	3513,02	3513,8 (+1)
ChVac3.4-1-COOH	79,5	96,07	13,46	3514,00	3514,9 (+1) 1758,5 (+2)
RFR-ChVac3.4-1- NH ₂	75,1	99,25	13,37	3972,29	3972,9 (+1)
ChVac3.4-2-COOH	73,6	99,03	14,74	3747,10	3748,1 (+1)
ChVac3.4(H-)	74,2	98,55	13,93	3236,94	3237,9 (+1)
ChVac3.4(12-26)	72,6	96,64	13,79	1938,08	1939,1 (+1)
ChVac3.4(1-19)-NH ₂	75,9	96,07	12,59	2460,43	2461,6 (+1) 1231,8 (+2)
ChVac3.4(1-14)-NH ₂	71,6	97,06	11,45	1859,14	1860,1 (+1)
RFR-ChVac3.4 (1-14)-NH ₂	70,3	97,81	11,49	2318,41	2319,4 (+1)

Таким образом, были успешно получены образцы выбранных модифицированных аналогов ChVac3.4 с высокой степенью очистки — 96–99%.

3.4. Эффекты модификаций ChVac3.4 на бактериальные клетки

3.4.1. Антимикробная активность в отношении планктонных бактерий

Исследование биологической активности синтезированных модификаций кателицидина ChVac3.4 было начато с определения их прямого эффекта на микроорганизмы. Чтобы оценить изменения в величине и спектре антимикробного действия минимальные ингибирующие концентрации (МИК) пептидов, в том числе исходного, идентичного природному ChVac3.4-NH₂, были определены в отношении набора грамположительных и грамотрицательных бактерий, включающего клинические изоляты с множественной лекарственной

устойчивостью (см. п.2.1.1). Для определения МИК использовали удобный для тестирования большого набора образцов и их концентраций метод серийных разведений в жидких питательных средах, содержащих микроорганизмы (см. п.2.4.1). В качестве параметра, характеризующего антимикробную активность пептида в целом (против всего тестового набора микроорганизмов) было выбрано среднее геометрическое всех измеренных МИК (ГМИК). Этот показатель в дальнейшем использовали для количественного сравнения активности модифицированных вариантов с исходным ChVac3.4-NH₂, рассчитывая отношение их ГМИК. Поскольку более низкие значения МИК соответствуют более высокой активности, т.е. активность обратно пропорциональна МИК, при расчёте коэффициента усиления антимикробной активности модифицированных пептидов в сравнении с оригинальным природным вариантом, ГМИК нативного ChVac3.4-NH₂ располагался в числителе, а ГМИК оцениваемого нового пептида — в знаменателе. В отличие от среднего арифметического, среднее геометрическое менее чувствительно к положительным выбросам (экстремальным значениям) [344], поэтому единичные случаи устойчивости бактерий к исследуемому препарату не столь значительно перевешивают показатели МИК в отношении остальных микроорганизмов. В то же время ГМИК имеет лучшую «разрешающую способность» по сравнению с другим популярным интегральным показателем антимикробного действия — медианным значением МИК (МИК₅₀), т.е. позволяет различать противомикробные агенты, демонстрирующие лишь незначительные отклонения в активности друг от друга [345]. Результаты измерения МИК и дальнейшего расчёта ГМИК и его соотношения с ГМИК оригинального пептида ChVac3.4-NH₂ представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3. Антимикробная активность ChVac3.4 и его модификаций против грамположительных и грамотрицательных бактерий

Пептиды	МИК ^a (мкМ) против бактерий								ГМИК ^b <i>общее</i> [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	<i>MRSA</i> 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 розовым или синим цветом, соответственно. Значения ГМИК, меньшие, чем у оригинального ChVac3.4-NH₂, которые свидетельствуют об усилении антимикробных свойств, отмечены звездочкой.

Подобно исходному пептиду, основная часть модификаций сохраняет несвойственную для большинства пролин-богатых АМП активность в отношении грамположительных бактерий. Однако, согласно интегральному показателю — ГМИК, усиление антимикробной активности в сравнении с оригинальным ChVac3.4-NH₂ наблюдается лишь для двух рассмотренных аналогов: ChVac3.4(H-), у которого в положении 14 был удалён остаток гистидина, и RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂, который структурно соответствовал *N*-концевому фрагменту ChVac3.4-NH₂ из 14 аминокислотных остатков, дополненному ещё одним RFR триплетом в начале последовательности. При этом количественно активность возрастает менее чем в два раза.

Среди рассматриваемых аналогов, сходных по длине с природным ChVac3.4-NH₂, значительных изменений в общем показателе активности не наблюдается. В то же время интересно отметить, что если усреднять значения МИК в отношении грамположительных и грамотрицательных штаммов по отдельности, то заметно, что 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, нехарактерной для многих других бактенецинов. 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.

В случае ChVac3.4-2-COOH можно предположить, что основной причиной является повышение общей гидрофобности молекулы за счёт введения двух остатков триптофана. Известно, что гидрофобность повышает неспецифическую

токсичность АМП [119, 346] и способствует проникновению веществ в различные клетки. Возможно, данный параметр важен для преодоления пептидогликанового слоя, имеющего у грамположительных бактерий бóльшую толщину. Если исключить отличающийся чувствительностью к действию антимикробных агентов штамм *S. aureus* SG-511, значения МИК ChVas3.4-2-COОН демонстрируют тенденцию к выравниванию по всему спектру (между устойчивыми грамположительными и грамотрицательными штаммами бактерий), что может быть признаком снижения селективности.

При сравнении эффектов пептидов, отличающихся только наличием либо отсутствием С-концевого амидирования, колебания индивидуальных МИК между амидированными и неамидированными вариантами можно оценить, как незначительные. Отсутствуют очевидные признаки того, что эта особенность играет важную и однозначную роль в антимикробном действии: так ГМИК ChVas3.4-NH₂ ниже, чем у ChVas3.4-COОН, тогда как ГМИК ChVas3.4-1-NH₂, наоборот, выше, чем у ChVas3.4-1-COОН.

Среди укороченных модификаций ChVas3.4-NH₂ прослеживается более показательная динамика антимикробных свойств. С-концевой фрагмент ChVas3.4(12-26), как и ожидалось на основе данных об исследовании бактенецинов коровы Vas5 и Vas7 [16, 341, 342], является наименее активным из всех рассмотренных вариантов. Постепенное укорочение N-концевой части природного ChVas3.4 демонстрирует, что подобная делеция в первую очередь отражается на его активности против грамположительных бактерий. Тогда как С-концевой фрагмент ChVas3.4(12-26) показывает выраженное снижение активности по всему спектру, для N-концевого фрагмента ChVas3.4(1-19) наблюдается снижение активности главным образом против трех протестированных штаммов *S. aureus*, а среди грамотрицательных бактерий активность ослабевает в большей степени против изолятов *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, показавших выраженную способность к формированию биоплёнок. Учитывая, что фрагмент с 12 по 18 остаток целиком присутствует в укороченном ChVas3.4(1-19), можно предположить, что часть детерминант, определяющих

более широкий спектр активности нативного ChVas3.4-NH₂ в сравнении с большинством других описанных к настоящему времени бактенецинов, находится дальше по направлению к C-концу исходной молекулы.

У наиболее короткоцепочечного из рассмотренных N-концевых фрагментов ChVas3.4(1-14) активность падает уже равномерно по всему спектру, как и у C-концевого ChVas3.4(12-26), хоть и в заметно меньшей степени, чем у последнего. Однако было обнаружено, что добавление дополнительного лидирующего RFR триплета к ChVas3.4(1-14) эффективно восстанавливает его антимикробную активность до уровня, сопоставимого с полноразмерным пептидом: GMIK RFR-ChVas3.4(1-14)-NH₂, как уже упоминалось, оказывается даже несколько ниже, чем у нативного ChVas3.4-NH₂. Данное наблюдение согласуется с литературными данными об анализе зависимости структура-активность, проведённом для бактеницина коровы Vas5 [16]. В этом случае, однако, трудно однозначно сказать, вносит ли в восстановление активности основной вклад присутствие дополнительной RFR-последовательности, или же повышение заряда молекулы с +6 до +8 за счёт двух дополнительных остатков аргинина. В работах, посвящённых изучению структурно-функциональных зависимостей, характерных для катионных АМП, часто отмечается, что общий заряд молекулы имеет положительную корреляцию с антимикробной активностью вплоть до некоторого максимального порога (от +4/+5 и выше) [347]. С одной стороны, добавление RFR-триплета на N-конец модификации ChVas3.4-1-NH₂, уже имеющей заряд +8, не приводит к заметному увеличению её антимикробной активности. С другой стороны, тот факт, что фрагмент ChVas3.4(1-19) имеет тот же заряд, что и фрагмент ChVas3.4(1-14), но более высокую активность, свидетельствует против простой трансляции величины заряда в эффект. К тому же отмечавшееся выше повышение активности в отношении грамположительных штаммов бактерий, наиболее выраженное у модификаций, имеющих дополнительный N-концевой RFR-фрагмент, также указывает на его специфическую роль.

3.4.2. Влияние на проницаемость бактериальных мембран

Поскольку природный пептид ChVac3.4-1-NH₂ в отличие от многих других бактенецинов оказывает заметное повреждающее действие на бактериальные мембраны, данный аспект был изучен и для всех разработанных на его основе модификаций. Спектрофотометрическая оценка проницаемости мембран для хромогенных маркеров показала, что все синтезированные пептиды начинают наносить существенный ущерб внешней мембране грамотрицательной бактерии *E. coli* ML-35p в течение первых десяти минут от начала контакта (рис. 3.6, левая часть). Большинство из них действует почти так же эффективно, как использовавшийся в качестве эталона высоко активный мембранолитический АМП свиньи протегрин-1 (PG-1). Для всех пептидов полное расщепление хромогенного маркера проницаемости нитроцефина бактериальной периплазматической β-лактамазой происходит в течение 40 минут, что свидетельствует об их мощном повреждающем эффекте на наружную мембрану, приводящем к нарушению её барьерной функции. Наименее заряженные среди показавших антимикробную активность фрагменты пептиды ChVac3.4(1-14) и ChVac3.4(1-19) ожидаемо показали сниженную динамику в повышении проницаемости внешнего мембранного барьера *E. coli* ML-35p. В то же время слабо заряженный С-концевой фрагмент ChVac3.4(12-26) оказался эффективным, что может служить аргументом в поддержку его возможной роли в обеспечении широкого спектра активности природного ChVac3.4-1-NH₂.

Влияние пептидов на целостность цитоплазматической мембраны оказалось менее единообразным (рис. 3.6, правая часть). ChVac3.4-2-COOH, ChVac3.4-1-NH₂ и RFR-ChVac3.4-1-NH₂ демонстрируют уровень активности, сходный с природным ChVac3.4-NH₂. Углы наклона кривых на графиках, иллюстрирующих действие имевших наименьшую среди фрагментов ChVac3.4-NH₂ антимикробную активность пептидов ChVac3.4(12-26) и ChVac3.4(1-14)-NH₂, являются наименьшими, а сами кривые в течение двух часов наблюдения так и не приближаются к уровню плато.

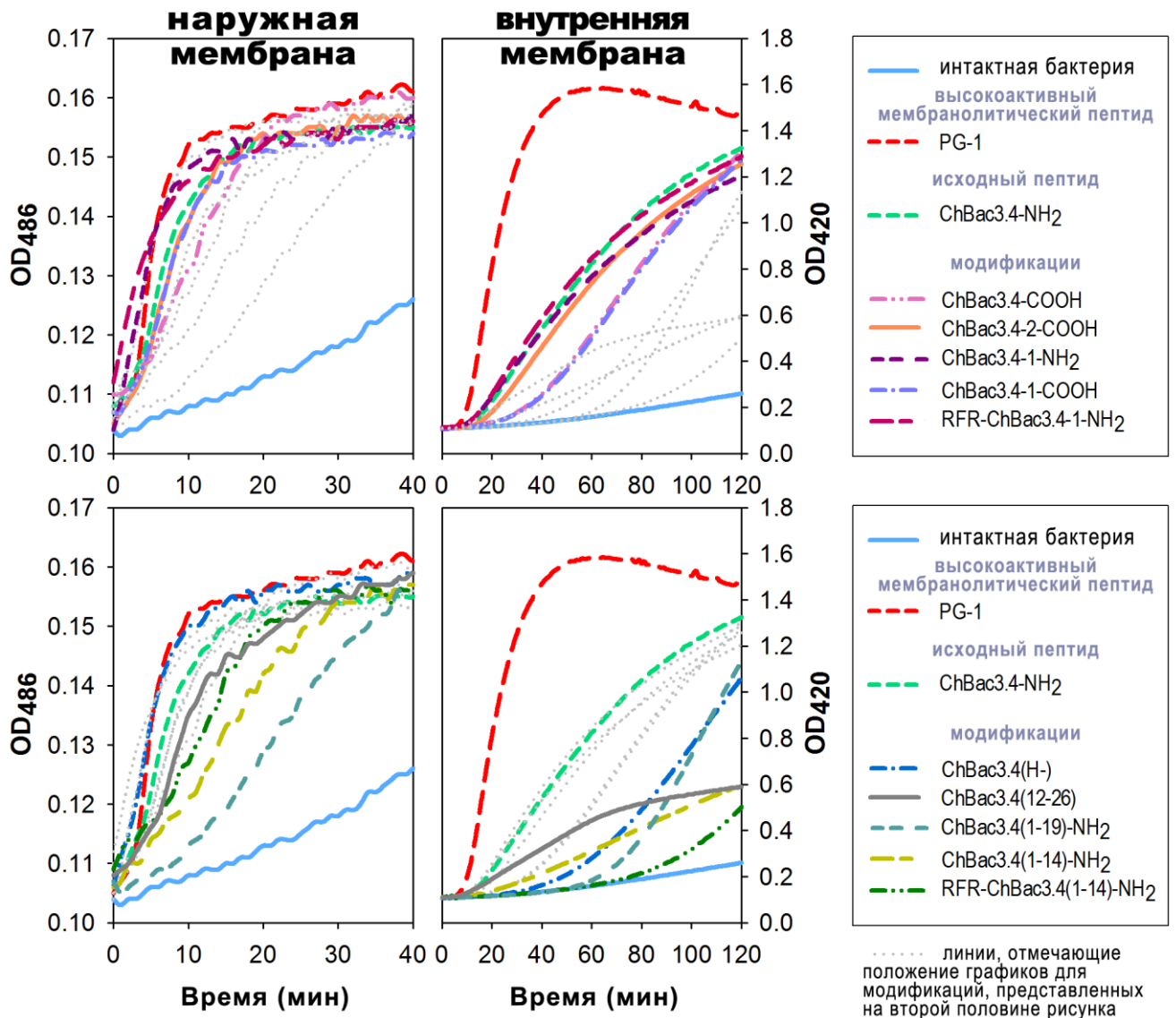


Рисунок 3.6. Влияние модификаций ChVac3.4 на проницаемость мембран *E. coli* ML-35p. Слева показаны графики изменения проницаемости внешней мембраны для хромогенного маркера нитроцефина; справа — внутренней мембраны для маркера о-нитрофенил- β -D-галактозида (ONPG). Конечная концентрация АМП в пробах соответствует $2 \times$ МИК (см. табл. 3.3). Кривые отражают накопление окрашенных продуктов после гидролиза маркерных молекул соответствующими бактериальными ферментами (нитроцефина — периплазматической β -лактамазой; ONPG — цитоплазматической β -галактозидазой), который может происходить только в том случае, если тестируемые пептиды повреждают мембраны и обеспечивают тем самым доступ субстрата к ферменту. Время от внесения пептида (0 мин) до начала роста оптической плотности (OD), период, требующийся для достижения плато и наклон кривых характеризуют скорость и силу индуцируемого пептидами повреждения мембран.

При этом 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 *E. coli* ML-35p индуцирует пептид

RFR-ChВас3.4(1-14)-NH₂, зарядом (+8) и антимикробной активностью не уступающий оригинальному ChВас3.4-NH₂. При его действии расхождение с отрицательным контролем становится заметным лишь спустя 60 минут от начала эксперимента. В то же время кривая графика, соответствующего действию пептида ChВас3.4(1-19)-NH₂, имеющего заряд +6 и более слабое противомикробное действие, имеет как меньшее время задержки, так и более крутой подъём.

Стоит также отметить, что для ряда модификаций, проявивших выраженное антибактериальное действие в антимикробном тесте, рост проницаемости цитоплазматической мембраны начинается с заметной задержкой в сравнении с исходным ChВас3.4-NH₂, хотя и характеризуется после этого быстрым прогрессом. В некоторых случаях (например, задержка в 40 мин для ChВас3.4(1-19)-NH₂) это может быть связано с более медленным развитием эффекта также и на внешнюю мембрану. Тем не менее в случае других пептидов, например ChВас3.4(H-), демонстрирующего задержку в 20 мин, и RFR-ChВас3.4(1-14)-NH₂, демонстрирующего задержку в 60 мин, такое объяснение не подходит. Отставание на 15–20 минут также отмечается у неамидированных вариантов ChВас3.4 и ChВас3.4-1. При этом, как упоминалось выше, кажется маловероятным, что это всего лишь эффект, вызванный снижением общего заряда, который может влиять на начальную стадию адсорбции пептида на бактериальной мембране из-за соответственного снижения силы электростатического притяжения. Кроме того, при рассмотрении проницаемости внешней мембраны подобных эффектов не наблюдалось. Можно предположить, что причина наблюдаемых задержек заключается в изменениях на других этапах взаимодействия АМП с поверхностью бактериальной клетки, таких как проникновение через пептидогликановый слой (а), агрегация молекул пептида на поверхности мембраны (б) или их переориентация и внедрение в липидный бислой (в). Также нельзя исключать, что в случае более длительных задержек наблюдаемое повреждение мембраны может быть вторичным, т.е. может являться

побочным эффектом от реализации пептидом бактерицидного действия через внутриклеточные мишени.

3.4.3. Ингибирование формирования бактериальных биоплёнок in vitro модификациями ChVac3.4, имеющими дополнительный N-концевой RFR-триплет

В последние годы наблюдается рост интереса исследователей к АМП как к потенциальным противобиоплёночным агентам. К преимуществам АМП в сравнении с применяемыми в настоящее время антибиотиками в случае действия в отношении бактерий в составе биоплёнки относят, в частности, возможность АМП по неспецифическому мембранолитическому механизму повреждать даже те бактериальные клетки, которые не проявляют метаболической активности. Поскольку присоединение дополнительного триплета RFR на N-конце укороченного пептида ChVac3.4(1-14) показало наиболее выраженный положительный эффект на антимикробную активность в отношении планктонных бактерий из всех рассмотренных модификаций, для включающих дополнительную RFR-последовательность вариантов ChVac3.4 была проведена также оценка возможности подавлять образование бактериальных биопленок.

Как уже упоминалось, среди тестовых бактериальных штаммов наиболее выраженную способность к формированию биоплёнок показали *P. aeruginosa* MDR 522/17 и *A. baumannii* 7226/16. Количественную оценку биоплёнок, образующихся в присутствии различных концентраций исследуемых пептидов, проводили с использованием красителя кристаллического фиолетового, как описано в 2.4.4. Противобиоплёночные эффекты выбранных модификаций резюмированы в таблице 3.4.

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 × МИК. Противобиоплёночная активность укороченного RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ в сравнении с ними несколько снижена: для 100% ингибирования формирования биоплёнки требуется концентрация 4 × МИК.

Таблица 3.4. Эффекты модификаций ChVac3.4, содержащих дополнительный лидирующий RFR-триплет, на формирование биоплёнок

Эффект	Минимальные концентрации пептидов, необходимые для достижения обозначенного эффекта против указанных бактерий					
	ChVac3.4-NH ₂		RFR-ChVac3.4-1-NH ₂		RFR-ChVac3.4(1-14)-NH ₂	
	<i>A.baumannii</i> 7226/16	<i>P.aeruginosa</i> MDR 522/17	<i>A.baumannii</i> 7226/16	<i>P.aeruginosa</i> MDR 522/17	<i>A.baumannii</i> 7226/16	<i>P.aeruginosa</i> MDR 522/17
100% ингибирование формирования биоплёнки ^a	2×МИК	МИК	МИК	2×МИК	4×МИК	4×МИК
>50% снижение формирования биоплёнки	½ МИК	1/64 МИК	¼ МИК	½ МИК	2×МИК	МИК
статистически значимое снижение формирования биоплёнки ^b	1/16 МИК	1/128 МИК	¼ МИК	1/1024 МИК	2×МИК	1/512 МИК

МИК — минимальная ингибирующая концентрация пептида против соответствующей планктонной бактерии (см. табл. 3.3).

^a Отсутствуют статистически значимые различия по U-критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$) между пробами, содержащими АМП, и отрицательным контролем формирования биоплёнки (ростовой средой не содержащей микроорганизмов).

^b Имеются статистически значимые различия по U-критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$) между пробами, содержащими АМП, и положительным контролем формирования биоплёнки (при культивировании в ростовой среде, не содержащей противомикробных веществ).

При более низких концентрациях действие тестируемых пептидов приводит к частичному ингибированию роста биоплёнки, причем биопленка, сформированная *A. baumannii*, демонстрирует более высокий уровень устойчивости. RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ вызывает статистически значимое уменьшение плотности образующейся биопленки *A. baumannii* лишь в концентрации не менее 2 × 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 1/16 МИК, однако более чем 50% эффект ($56 \pm 12\%$ ингибирования) достигается только в присутствии концентрации равной ½ 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).

Биоплёнка, сформированная *P. aeruginosa*, более восприимчива к влиянию субмикробцидных концентраций ChVac3.4 и его модификаций. Исходный пептид оказывает статистически значимый эффект против данной биоплёнки 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 штаммом *P. aeruginosa* биопленки 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.

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

Сочетанное применение веществ, способных избирательно усилить целевые эффекты друг друга, может позволить уменьшить их требующиеся действующие дозы и сопутствующее побочное действие. Снижение доз выгодно также и с экономической точки зрения, в особенности в случае пептидных препаратов. Кроме того, для антимикробных агентов стратегия совместного применения является одним из признанных способов борьбы с антибиотикорезистентностью [1, 348–350].

Ранее было установлено [201], что природный ChVac3.4-NH₂ имеет высокую склонность к проявлению синергизма антимикробной активности в сочетаниях с конвенциональными антибиотиками, даже более выраженную в случае, когда таргетные бактерии обладают устойчивостью к действию последних.

Добавление дополнительного триплета RFR к укороченному фрагменту ChVac3.4(1-14)-NH₂, которое восстанавливало его антимикробную активность до уровня оригинального ChVac3.4-NH₂, не восстанавливало при этом его токсических свойств в отношении эукариотических клеток (см. п. 3.5.2). Поэтому среди рассмотренных в текущем исследовании аналогов пептид RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ может оцениваться как наиболее перспективный в контексте потенциального противомикробного применения: по совокупности уровня антимикробной активности, селективности и длины аминокислотной последовательности. В соответствии с этим, представляло интерес проверить, сохраняет ли укороченная модификация RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ способность повышать эффективность классических антибиотиков.

Совместный эффект RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ с антибиотиками оксациллином, меропенемом, эритромицином, амикацином и офлоксацином был изучен в отношении пяти антибиотикорезистентных клинических изолятов: грамотрицательных бактерий *E. coli* ESBL 521/17, *A. baumannii* 7226/16, *P. aeruginosa* MDR 522/17, *K. pneumoniae* ESBL 344/17 и грамположительной бактерии *S. aureus* 1399/17, как описано в п.2.4.5. Соответствующие минимальные значения индексов ФИК (иФИК) представлены в таблице 3.5 совместно с иФИК для оригинального ChVac3.4-NH₂, ранее оцененными Жарковой М.С. и соавторами [201], которые приведены для удобства сравнения.

Все случаи синергетического взаимодействия, обнаруженные для исходного пептида, были подтверждены и для укороченного аналога RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂, за исключением комбинации с меропенемом в отношении *S. aureus*. В противовес последнему RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ демонстрирует четыре дополнительных случая синергизма против грамотрицательных бактерий в тех сочетаниях, где оригинальный ChVac3.4-NH₂ показывает лишь аддитивность: с эритромицином против *A. baumannii*, с меропенемом против *P. aeruginosa* и с офлоксацином против *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. Кроме того, в большинстве случаев синергизма в отношении грамотрицательных бактерий минимальные значения иФИК в комбинациях с укороченным аналогом RFR-ChVac3.4(1-14)-

NH₂ оказались ниже, чем соответствующие иФИК для комбинаций с нативным ChVac3.4-NH₂. Это говорит о том, что для RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ эффект взаимного усиления противомикробных свойств при использовании в сочетании с антибиотиками более выражен.

Таблица 3.5. 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 ^a 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 ^b	RFR-ChVac3.4 (1-14)	ChVac3.4 ^b	RFR-ChVac3.4 (1-14)	ChVac3.4 ^b	RFR-ChVac3.4 (1-14)
		оксациллин	1.12	1.12	1.12	1.12	0.25
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⁻	
		грамотрицательных:					
		<i>K. pneumonia</i> ESBL 344/17		<i>P. aeruginosa</i> MDR 522/17			
анти-биотик	АМП	ChVac3.4 ^b	RFR-ChVac3.4 (1-14)	ChVac3.4 ^b	RFR-ChVac3.4 (1-14)	иФИК > 2 антагонизм	
		оксациллин	1.12	1.12	1.12	1.12	1 < иФИК ≤ 2 независимое действие
меропенем	1.0	0.75	0.62	0.38[!]	0.19⁺	0,5 < иФИК ≤ 1 аддитивность	
эритромицин	0.25	0.06⁺	0.38	0.19⁺	0.38⁺	иФИК ≤ 0,5 синергизм	
амикацин	0.38	0.31⁺	0.5	0.38⁺	0.31[!]		
офлоксацин	0.75	0.25[!]	0.75	0.31[!]			

^a Значения индексов фракционной ингибирующей концентрации (иФИК) представлены как медианы по результатам 3–4 независимых экспериментов

^b Данные об антимикробной активности ChVac3.4 в комбинации с антибиотиками приведены по литературным данным [201] и размещены в таблице для более наглядного сравнения. Показатели иФИК, соответствующие синергизму, отмечены жирным шрифтом. Более низкие значения иФИК соответствуют более сильному синергетическому взаимодействию. Случаи, когда синергизм, демонстрируемый в сочетаниях с антибиотиками пептидом RFR-ChVac3.4(1-14), 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 «!».

Только при действии на *S. aureus* 1399/17 наблюдается хоть и менее выраженная, но противоположная тенденция, что может рассматриваться как признак определённого участия C-концевой области ChVac3.4-NH₂ в его действии на грамположительные бактерии.

3.5. Эффекты модификаций ChVac3.4 на эукариотические клетки

3.5.1. Гемолитическая активность в отношении эритроцитов человека

Большинство АМП действует по мембранолитическому механизму, и, хотя мембраны эукариотических клеток содержат меньше отрицательно заряженных компонентов, чем мембраны бактериальных клеток, обладают более низким трансмембранным потенциалом и лучше защищены от встраивания молекул пептида за счёт присутствия таких армирующих агентов, как холестерин [351], они могут оказаться вторичной мишенью. Таким образом, важно оценить возможное цитотоксическое действие АМП. Природный пептид ChVac3.4-NH₂, демонстрирует более выраженную мембранолитическую активность в отношении бактериальных клеток, чем другие обогащённые пролином АМП. В связи с этим были изучены селективность и потенциальная цитотоксичность в отношении эукариотических клеток, разработанных на основе пептида ChVac3.4-NH₂ структурных модификаций.

Гемолитический тест широко используется для экспресс-анализа токсических свойств АМП (и других соединений), связанных с их мембранолитической активностью. Для оригинального ChVac3.4-NH₂ ранее было показано, что он, как и другие бактенецины, выделенные из лейкоцитов домашней козы, не проявляет значимой гемолитической активности как минимум до концентраций, на 1–2 порядка превышающих значения его МИК против бактерий [23, 329]. Результаты оценки гемолитического действия разработанных на его основе модификаций, рассматриваемых в данной работе, в диапазоне концентраций до 64 мкМ, представлены на рис. 3.7. Для большинства из них, по крайней мере тех, что показали высокую антимикробную активность, данная концентрация на порядок превышает их ГМИК.

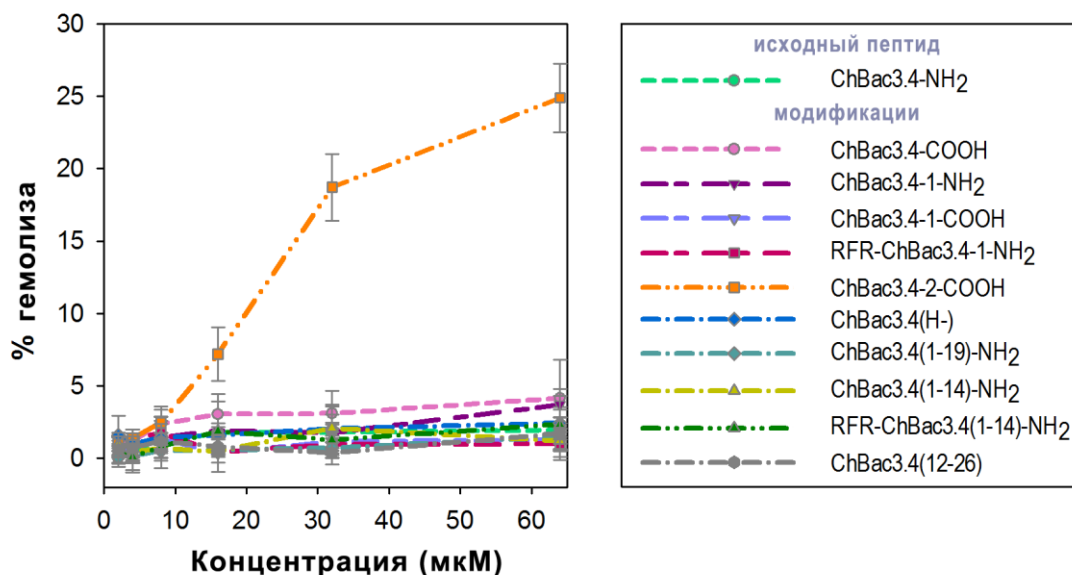


Рисунок 3.7. Гемолитическая активность ChBac3.4 и его модификаций в отношении эритроцитов человека. Узловые точки с планками погрешностей соответствуют средним значениям и среднеквадратическим отклонениям по результатам трёх независимых экспериментов, в каждом из которых было по три параллели пробы.

Среди предложенных аналогов ChBac3.4-NH₂ только ChBac3.4-2-COOH демонстрирует четкую тенденцию к дозозависимому лизису эритроцитов человека: эффект очевидно возрастает от $7 \pm 2\%$ эритроцитов, лизирующихся в присутствии 16 мкМ данного пептида, до $19 \pm 2\%$ в присутствии 32 мкМ и $25 \pm 2\%$ в присутствии 64 мкМ (см. рис. 3.7), хотя и остаётся в рассмотренном диапазоне концентраций в границах умеренной токсичности. Рост гемолитической активности данной модификации может быть связан с повышением гидрофобности молекулы из-за введения двух дополнительных остатков триптофана в исходную аминокислотную последовательность. Как уже указывалось в п. 3.4.1, гидрофобность в работах, посвящённых анализу взаимосвязи структуры и активности различных АМП, часто ассоциируется с ростом неспецифической токсичности.

Для других модификаций ChBac3.4-NH₂ признаков повышения гемолитической активности в рассмотренном диапазоне концентраций не выявляется, доля подвергшихся лизису эритроцитов не превышает 5%, что находится в пределах погрешности от базового уровня.

3.5.2. Цитотоксическое действие в отношении нормальных и опухолевых клеток in vitro

Цитотоксический потенциал модифицированных вариаций ChVac3.4-NH₂ также был оценен с использованием МТТ-теста в отношении фракции мононуклеарных клеток, выделенной из периферической крови здоровых доноров, и двух линий опухолевых клеток: эритромиелоидной лейкемии человека K562 и гистиоцитарной лимфомы человека U937. Соответствующие величины средних (полумаксимальных) эффективных концентраций ЭК₅₀ представлены в таблице 3.6.

В отличие от ситуации с антимикробной активностью и гемолизом, модифицированные пептиды, сходные по длине с природным ChVac3.4-NH₂, в данном случае демонстрируют более заметные сдвиги в цитотоксическом действии по сравнению с оригинальным пептидом. Это позволяет предположить, что внесённые в их первичную структуру изменения в большей степени влияют на их взаимодействие с эукариотическими клетками, нежели с бактериальными.

ChVac3.4-1-NH₂ оказался наиболее цитотоксическим среди всех протестированных вариантов в отношении как опухолевых, так и нормальных клеток. Для каждого исследованного типа клеток значение его ЭК₅₀ практически в два раза ниже соответствующей концентрации оригинального ChVac3.4-NH₂.

В отношении клеточной линии U937 пептиды RFR-ChVac3.4-1-NH₂ и ChVac3.4-2-COOH проявляют токсичность на уровне, сопоставимом с таковым у ChVac3.4-1-NH₂. Однако активность ChVac3.4-2-COOH по отношению к клеткам линии K562 ненамного превышает показатели исходного ChVac3.4-NH₂, а RFR-ChVac3.4-1-NH₂ не показывает значимого увеличения токсичности в сравнении с последним ни в отношении опухолевой линии K562, ни в отношении нормальных мононуклеаров периферической крови человека.

Неамидированные по С-концевой аминокислоте пептиды ChVac3.4-COOH и ChVac3.4-1-COOH демонстрируют более низкий уровень цитотоксичности, чем их амидированные аналоги, в отношении всех протестированных типов клеток.

Таблица 3.6. Цитотоксические свойства ChBac3.4 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 ChBac3.4-NH ₂]	ИС _{н/о} ^в ЭК ₅₀ ^{МОНОНУКЛ.} $\sqrt{\text{ЭК}_{50}^{\text{K562}} \cdot \text{ЭК}_{50}^{\text{U937}}}$ [^г соотношение с ChBac3.4-NH ₂]
	нормальных клеток:	опухолевых клеток:			
	мононуклеары	K562	U937		
ChBac3.4-NH ₂	18.6 ± 0.8	15.5 ± 0.3	8.1 ± 0.4	4.0 [=]	1.7 [=]
ChBac3.4-COOH	36.2 ± 6.9	24.4 ± 4.0	12.9 ± 0.3	6.0 [1.5]	2.0 [1.2]
ChBac3.4-1-NH ₂	12.1 ± 0.8	8.4 ± 1.1	4.5 ± 1.6	2.1 [0.5]	2.0 [1.2]
ChBac3.4-1-COOH	33.7 ± 3.2	16.5 ± 1.3	9.8 ± 0.5	7.0 [1.7]	2.7 [1.6]*
RFR-ChBac3.4-1-NH ₂	18.3 ± 4.1	20.0 ± 3.4	3.2 ± 0.4	3.5 [0.9]	2.3 [1.4]
ChBac3.4-2-COOH	20.2 ± 4.5	13.7 ± 2.3	4.1 ± 0.3	3.7 [0.9]	2.7 [1.6]*
ChBac3.4 (H-)	34.7 ± 7.3	25.0 ± 3.5	11.5 ± 0.5	8.9 [2.2]	2.0 [1.2]
ChBac3.4 (12-26)	43.3 ± 7.7	39.4 ± 2.3	17.0 ± 1.1	1.0 [0.2]	1.7 [1.0]
ChBac3.4 (1-19)-NH ₂	>64	28.0 ± 6.5	>64	>4.7 [>1.2]	~1.5 [~0.9]
ChBac3.4 (1-14)-NH ₂	>64	33.6 ± 4.1	>64	>3.7 [>0.9]	~1.4 [~0.8]
RFR-ChBac3.4 (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, рассчитанные с использованием Sigma Plot Standard Curve Analysis по данным 3 независимых экспериментов (МТТ-тестов, см. п.2.5.2), приведены как среднее ± среднеквадратичное отклонение.

^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. 3.3).

^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, вычисляемому как показано в формуле в шапке соответствующего столбца таблицы.

^г Для оценки прироста селективности действия модифицированных пептидов в сравнении с исходным рассчитывали отношение значения индекса (ИС) соответствующего пептида к значению того же индекса для ChBac3.4-NH₂. Полученный результат приведён в квадратных скобках, наилучшие значения отмечены звёздочкой.

Это 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 [347, 352].

У пептида с делецией гистидина в положении 14 (ChVac3.4(H-)) цитотоксическая активность в сравнении с природным пептидом значительно снижается: его показатели $ЭК_{50}$ оказываются на 42–86% выше в зависимости от типа клеток, что с учётом сохранения высокой антимикробной активности приводит к росту показателя селективности в отношении бактерий в 2,2 раза.

Что касается активности укороченных вариантов ChVac3.4-NH₂, все они 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 существенной роли.

Для численной оценки избирательности действия различных модификаций ChVac3.4-NH₂ были рассчитаны два индекса селективности $ИС_{э/б}$ и $ИС_{н/о}$ (см. таблицу 3.6). В первом случае сравнивали влияние пептидов на бактериальные клетки с их же активностью в отношении нормальных мононуклеаров периферической крови человека. Во втором рассматривали соотношение эффективности их цитотоксического действия против нормальных и против опухолевых эукариотических клеток. В качестве интегрального показателя, резюмирующего эффект отдельного пептида в отношении набора эукариотических или бактериальных клеток, было использовано среднее геометрическое измеренных параметров ($ЭК_{50}$ или МИК). Точные формулы расчёта индексов селективности приведены в таблице. Несмотря на использование при расчёте исключительно витральных данных, подобные индексы позволяют в определённой степени оценить гипотетическую ширину «терапевтического окна» с учётом возможного использования рассматриваемых пептидов при разработке антибактериальных или противоопухолевых средств.

Следует отметить, что обе модификации, показавшие более высокую антимикробную активность в сравнении с исходным пептидом, а именно ChBac3.4(H-) и RFR-ChBac3.4(1-14)-NH₂, также оказались наиболее селективными в отношении бактерий. RFR-ChBac3.4(1-14)-NH₂ имел больший ИС_{э/б} — свыше 17.3, что более чем в 4 раза превышало данный показатель для оригинального ChBac3.4-NH₂.

Прирост селективности действия модифицированных пептидов в отношении опухолевых клеток в сравнении с нормальными был менее значительным. Результат, характеризующийся повышением соответствующего индекса селективности ИС_{н/о} в 1,6 раза, показали пептиды ChBac3.4-2-COOH и ChBac3.4-1-COOH. Интересно, что оба они отличаются несколько большей гидрофобностью, чем природный ChBac3.4-NH₂, о чем можно судить по увеличению времени их удерживания на колонке при проведении ОФ ВЭЖХ (см. табл. 3.2). Роль гидрофобности в повышении цитотоксической активности АМП хорошо известна [346, 119, 347]. 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.

3.5.3. Динамика развития цитотоксического эффекта и соотношение некротических/апоптотических клеток при действии пептида ChBac3.4-1-COOH на опухолевые клетки

По совокупности индексов селективности и индивидуальной активности в отношении как бактериальных, так и опухолевых клеток пептид ChBac3.4-1-COOH был выбран для более детального исследования цитотоксических свойств.

С использованием витального красителя трипанового синего действие пептида на клетки линии K562 было рассмотрено в динамике: производился микроскопический подсчет доли живых и погибших клеток на ранних сроках инкубации клеточной суспензии с различными концентрациями ChBac3.4-1-COOH (рис.3.8 А).

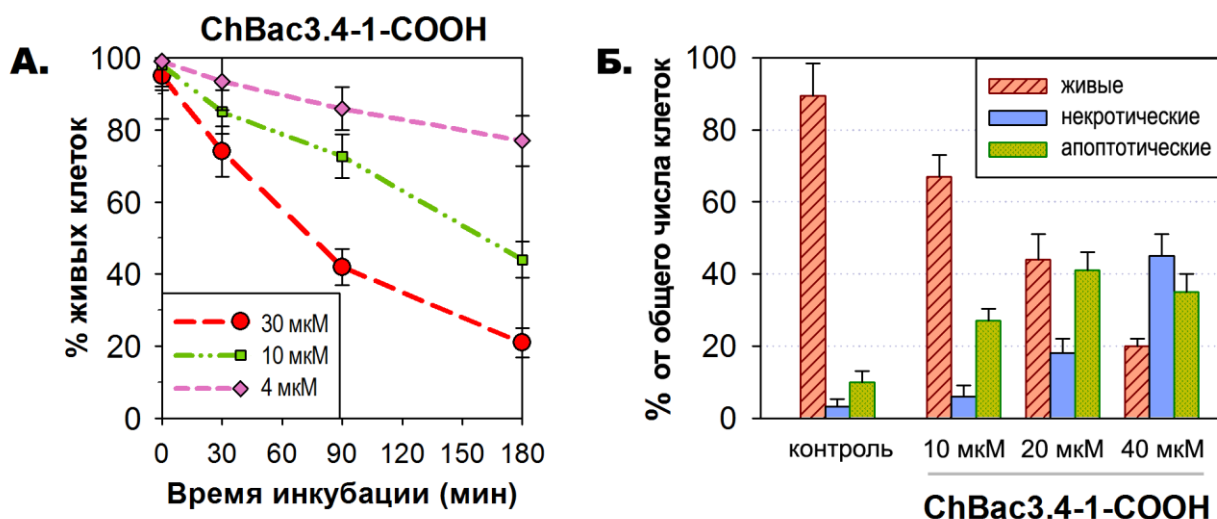


Рисунок 3.8. Динамика и характер цитотоксического действия ChBac3.4-1-COOH на клетки линии K562. А) Кривые клеточной гибели от времени, иллюстрирующие развитие цитоцидного эффекта для различных концентраций пептида в течение первых трех часов инкубации, основанные на данных микроскопического подсчёта доли живых и мёртвых клеток с использованием красителя трипанового синего (см. п.2.5.3). 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 V (см. п.2.5.4).

Как было показано ранее на примере активного мембранолитического и цитотоксического АМП протегрин-1 (PG-1), для пептидов мембранолитического типа характерно стремительное развитие цитоцидного эффекта в первые 15–30 минут от начала воздействия, после чего кривая клеточной гибели практически выходит на плато. При этом концентрация мало влияет на форму кривой и отражается, главным образом, на проценте живых клеток, соответствующем устанавливаемому уровню плато [302]. Для исходного природного ChBac3.4-NH₂, однако, была описана более медленная динамика, чем для мембранолитических пептидов: сокращение популяции жизнеспособных клеток в его присутствии происходит постепенно, тем быстрее, чем выше его концентрация. Так, спустя 3 часа от начала инкубации в присутствии 40 мкМ ChBac3.4-NH₂ кривая гибели клеток линии K562 достигала уровня, соответствующего 0% жизнеспособных клеток, в присутствии 20 мкМ — 15 ± 1%, в присутствии 10 мкМ — 43 ± 5%, а в присутствии 5 мкМ — лишь 58 ± 5% [302].

Как видно из рис.3.8 А, действие модифицированного пептида ChVac3.4-1-COON развивалось даже медленнее, чем у нативного ChVac3.4-NH₂, несмотря на отсутствие значимых различий в величине их ЭК₅₀ в отношении клеток рассматриваемой линии (см. табл. 3.6). Так, в присутствии 30 мкМ ChVac3.4-1-COON спустя 3 часа от начала инкубации процент жизнеспособных клеток снижался до 21 ± 4% (что выше, чем аналогичный показатель в присутствии лишь 20 мкМ ChVac3.4-NH₂), в присутствии 10 мкМ ChVac3.4-1-COON наблюдалось снижение до аналогичных уровней, показанным для ChVac3.4-NH₂, а именно, 44 ± 5%, а в присутствии 4 мкМ — только до 77 ± 7%. Возможно, наблюдаемая картина и обнаруженный ранее эффект небольшого отставания в действии ChVac3.4-1-COON на цитоплазматическую мембрану бактерий в сравнении с нативным ChVac3.4-NH₂ (см. п 3.4.2) имеют некоторые общие предпосылки.

Среди клеток, подвергшихся токсическому влиянию ChVac3.4-1-COON, также была определена доля погибающих по пути некроза либо апоптоза (рис.3.8 Б). Для дифференциации таких клеток использовали набор флуоресцентных красителей «Annexin V-Cy3 Apoptosis Detection kit», как описано в п. 2.5.4. Для мембранолитических пептидов, например протегрина-1, в аналогичном эксперименте было показано, что практически все повреждённые клетки погибают по некротическому пути — их доля во всём диапазоне рассмотренных концентраций (от 10 до 40 мкМ) существенно преобладает над долей клеток, вошедших в апоптоз [302]. При действии ChVac3.4-1-COON, однако, процент некротических клеток начинает преобладать над процентом апоптотических клеток только в присутствии высоких концентраций пептида (см. рис 3.8 Б), что согласуется с полученными ранее данными для нативного ChVac3.4-NH₂ [302].

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 ChVac3.4-1-COON (40 мкМ) наблюдается более высокий

процент клеток, погибающих в результате апоптоза ($35 \pm 5\%$), и более низкий процент клеток, подвергающихся некрозу ($45 \pm 6\%$), чем сообщалось для оригинального ChVac3.4-NH₂ ($30 \pm 5\%$ и $56 \pm 6\%$, соответственно [302]). Более высокое отношение апоптотических клеток к некротическим может свидетельствовать о снижении мембранолитических свойств и / или усилении внутриклеточной активности модифицированного пептида в сравнении с исходным.

3.5.4. Противоопухолевая активность ChVac3.4-1-COOH in vivo в модели перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха мыши

Потенциал ChVac3.4-1-COOH как противоопухолевого пептида был также оценен *in vivo* в модели перевиваемой карциномы Эрлиха мыши, как описано в п. 2.5.5. В этих экспериментах использовался рекомбинантный ChVac3.4-1-COOH, который был любезно предоставлен 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. Получение штамма-продуцента на основе клеток *E.coli*, а также дальнейшая наработка биомассы, выделение и очистка целевого пептида описан в [353].

Чтобы удостовериться в отсутствии различий в биологических свойствах между рекомбинантным пептидом, продуцируемым бактериальными клетками *E. coli*, трансформированными соответствующей плазмидой, и пептидом, синтезированным химическим путем, предварительно было проведено сравнение их антибактериальной активности и токсического действия в отношении клеток человека *in vitro*. Антимикробная активность рекомбинантного пептида была измерена как описано в п.3.4.1, результаты сравнения с данными для синтетического ChVac3.4-1-COOH представлены в таблице 3.7. Результаты оценки цитотоксических эффектов рекомбинантного пептида в отношении нормальных и опухолевых клеток человека, полученные аналогично п.3.5.2 при помощи МТТ-теста, а именно соответствующие значения ЭК50 и индексов селективности, приведены в таблице 3.8. Существенных отклонений в активности рекомбинантного пептида от синтетического аналога выявлено не было.

Таблица 3.7. Сравнение антимикробной активности ChVac3.4-1-COОН, полученного путём твердофазного химического синтеза (синт.) или по технологии рекомбинантных ДНК (рек.)

Пептиды	МИК ^а (мкМ) против бактерий								ГМИК ^б
	грамотрицательных:				грамположительных:				
	<i>E. coli</i> ML-35p	<i>A. baum.</i> 7226/16	<i>K. pneum.</i> ESBL 344/17	<i>P. aerug.</i> M DR 522/17	<i>E. coli</i> ESBL 521/17	<i>S. aureus</i> SG-511	MRSA ATCC 33591	<i>S. aureus</i> 1399/17	
ChVac3.4-1-COОН (синт.)	2-4	4	8	16	4-8	0.25	16	8	4.8
ChVac3.4-1-COОН (рек.)	4	4	8	16	4-8	0.25	16	8	5.0

^{а,б} см. табл. 3.3

Таблица 3.8. Сравнение цитотоксических свойств и индексов селективности ChVac3.4-1-COОН, полученного путём твердофазного химического синтеза (синт.) или по технологии рекомбинантных ДНК (рек.)

Пептиды	Цитотоксические ЭК ₅₀ ^а (мкМ) против			ИС ₅₀ ^б ЭК ₅₀ ^{моноукл.} ГМИК	ИС ₅₀ ^в ЭК ₅₀ ^{моноукл.} $\sqrt{\text{ЭК}_{50}^{\text{K562}} \cdot \text{ЭК}_{50}^{\text{U937}}}$
	нормальных клеток:	опухолевых клеток:			
	мононуклеары	K562	U937	[^г соотношение с ChVac3.4-NH ₂]	[^г соотношение с ChVac3.4-NH ₂]
ChVac3.4-1-COОН (синт.)	33.7 ± 3.2	16.5 ± 1.3	9.8 ± 0.5	7.0 [1.7]	2.7 [1.6]*
ChVac3.4-1-COОН (рек.)	40.8 ± 9.1	15.6 ± 4.8	9.7 ± 0.3	8.1 [2.0]	3.3 [1.9]

^{а,б,в,г} см. табл. 3.6

Способность увеличивать период выживания мышей, подкожно инокулированных клетками АКЭ в область холки, была протестирована для двух различных доз ChVac3.4-1-COОН: сравнительно низкой, составлявшей 1 мкг пептида на животное, и более высокой, равной 100 мкг пептида на животное. Пептид вводили внутривентриально в указанной дозировке один раз в неделю. Как показывают кривые выживаемости Каплана–Мейера (рис. 3.9), ChVac3.4-1-COОН *in vivo* оказывает умеренный положительный эффект на продолжительность жизни животных с опухолью как в низкой, так и в высокой дозе. Среднее время выживания от момента введения опухолевых клеток в группе, получавшей 100

мкг пептида на животное в неделю, составило $26,5 \pm 2,9$ ($M \pm \sigma$) дней, а в группе, получавшей 1 мкг, — $27,9 \pm 4,8$ дня, что в обоих случаях статистически значимо превысило среднее время выживания в контрольной группе, равное $23,2 \pm 1,5$ дням (U-критерий Манна–Уитни; $p < 0,05$). Медианное время выживания в названных группах составило 25, 28 и 23 дня, соответственно.

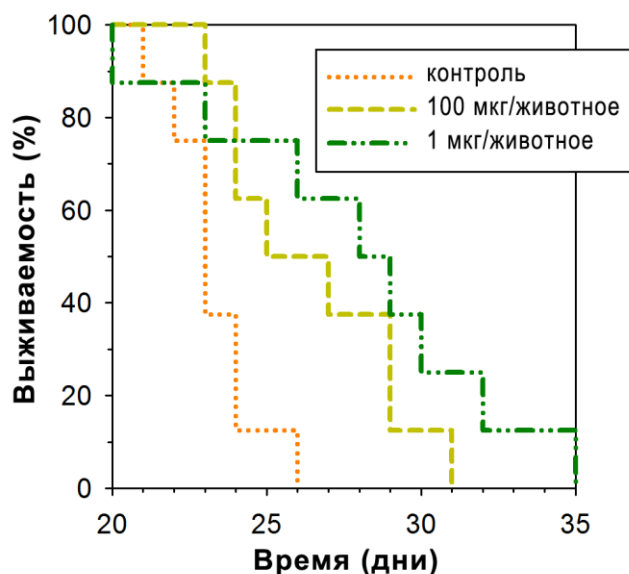


Рисунок 3.9. Кривые выживаемости Каплана–Мейера для мышей, получавших ChBac3.4-1-COOH, в модели введённой подкожно перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха. Мышам опытных групп вводили обозначенные дозы пептида в 0,1 мл деионизованной воды один раз в неделю. Контрольной группе вводили такое же количество 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.

Увеличение продолжительности жизни мышей также подтверждается сравнением кривых Каплана–Мейера с использованием логарифмического рангового критерия; группы, получавшие 100 или 1 мкг ChBac3.4-1-COOH, показали статистически значимую разницу в сравнении с не получавшим экспериментальных препаратов контролем: достигаемые P-значения составили 0,039 и 0,034, соответственно. Тем не менее какая-либо очевидная зависимость между вводимой дозой ChBac3.4-1-COOH и величиной противоопухолевого эффекта отсутствует. Поскольку ранее никаких видимых признаков токсического действия для протестированных доз ChBac3.4-1-COOH при стандартной проверке острой токсичности (данные не приводятся) выявлено не было, представляется

маловероятным, что наблюдаемую картину можно объяснить тем, что при повышении концентрации токсичность пептида начинает преобладать над его противоопухолевой активностью. Наблюдаемое противоопухолевое действие, возможно, реализуется за счёт менее зависимых от концентрации механизмов, — например, иммуномодулирующих эффектов, — которые могут как включать, так и не включать непосредственный контакт пептида с опухолевыми клетками, нежели за счёт прямой цитотоксической активности пептида в отношении этих клеток.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Перед современной медициной остро стоит проблема роста и распространения устойчивости бактерий к широко применяемым антибиотикам; уровень смертности от бактериальных инфекций по прогнозам к 2050 году может достигнуть 10 миллионов человек в год. В связи с этим актуален вопрос о поиске новых классов антимикробных препаратов. Этот вопрос решается на стыке научных направлений — как патофизиологии, в задачи которой входит разработка принципов новых эффективных методов лечения заболеваний, поиск средств коррекции патологических процессов и расшифровка механизмов их действия на биомишени, так и биохимии, изучающей на молекулярном уровне свойства биологически-активных соединений, в том числе пептидов.

Одним из потенциальных источников новых антибиотиков может выступать иммунная система многоклеточных организмов, в процессе эволюции накопившая внушительный арсенал механизмов для борьбы с патогенами. В частности, уже на протяжении нескольких десятилетий АМП врождённого иммунитета, способные быстро и эффективно инактивировать микроорганизмы, привлекают внимание исследователей в этой связи.

Однако практическое внедрение данных природных соединений осложнено рядом проблем. Несмотря на все преимущества, АМП имеют и ряд недостатков, включающих сравнительно слабую селективность и побочные повреждающие эффекты на организм животных и человека (прямой токсичности, запуска дегрануляции тучных клеток и продукции провоспалительных цитокинов и т.п.), устойчивости в биологических средах и фармакокинетики, цены производства и др. [6]. Исследователями рассматриваются различные пути решения данных проблем, как правило, сводящиеся к модификации структуры природных пептидов, синтезу аналогов АМП *de novo* или же переходу к пептидомиметикам. Тем не менее, все эти подходы требуют детального понимания структурно-функциональных зависимостей, присущих АМП, особенностей реализации их активности, вовлекающихся в процесс мишеней действия, таким образом, определяя важность исследования указанных аспектов.

Различные структурные классы АМП имеют свои достоинства и недостатки для разработки терапевтических препаратов на их основе. Так, например, пептиды, имеющие дисульфидные связи, обладают более высокой стабильностью, но представляют более сложный объект для синтеза. Более простые в производстве линейные пептиды более уязвимы к ферментативному расщеплению в биологических жидкостях. На этом фоне интересной группой являются линейные пептиды с повышенным содержанием остатков пролина. Их достаточно легко синтезировать с хорошим выходом, при этом высокое содержание пролина делает их более устойчивыми к действию протеаз, синтезируемых как макро-, так и микроорганизмами. Кроме того, одной из консервативных особенностей данной группы АМП является крайне низкая токсичность в отношении клеток животных и человека.

Пролин-богатые пептиды обладают уникальными свойствами, обусловленными высоким содержанием остатков пролина. Многие пролин-богатые белковые последовательности имеют конформацию левозакрученной полипролиновой спирали (полипролиновая спираль II типа). Полипролиновая спираль II типа является относительно открытой структурой и практически не имеет внутримолекулярных водородных связей, в отличие, например, от α -спирали. Поэтому основной особенностью таких молекул является их способность вступать в межмолекулярные белок-белковые взаимодействия с рядом пролин-распознающих участков, присутствующих в SH3 (Src homology 3), WW, GYF, EVH1 (enabled/VASP homology 1), профилино-подобных доменах белков, которые участвуют в ключевых биохимических каскадах реакций, ответственных за передачу сигналов, регуляцию клеточного роста, организацию цитоскелета и многих других [354, 355]; эта способность, в свою очередь, обеспечивает присущий таким пептидам широкий спектр биологических свойств. Здесь следует отметить, что нарушение белок-белковых взаимодействий, в частности, между молекулами, имеющими пролин-распознающие домены и пролин-богатыми пептидами или белками, играет немаловажную роль в патогенезе болезни Хантингтона, Альцгеймера, опухолевых заболеваний [356].

Таким образом, изучение пролин-богатых пептидов, структурно-функциональных особенностей реализации их биологических функций, важно в том числе для установления молекулярных механизмов развития различных патологических процессов и дальнейшего определения средств коррекции подобных нарушений.

С точки зрения получения прототипов новых антибиотиков наиболее перспективными представляются пролин-богатые пептиды, являющиеся молекулярными эффекторами системы врожденного иммунитета, т.е. относящиеся к антимикробным пептидам и реализующие соответствующие биологические функции в природе. В то же время, участвующие в иммунной защите пролин-богатые пептиды могут дополнительно демонстрировать корректирующие свойства в отношении других патологий, связанных с белок-белковыми взаимодействиями, и наоборот — пролин-богатые пептиды, выделенные из других источников, в частности, ЦНС, могут проявлять антимикробные и иммуномодулирующие свойства.

Несколько многообещающих терапевтических агентов предложено на базе пролин-богатых антимикробных пептидов насекомых. Модифицированные пептиды на основе апидаецинов и онкоцинов Api88, Api137, Onc72 демонстрируют высокие протективные свойства *in vivo* в модели летальной инфекции у мышей, вызванной грамотрицательными возбудителями, в том числе *E. coli* и устойчивой к карбапенемам *K. pneumoniae* [357, 358]. Смоделированный синтетический димерный АМП АЗ-АРО эффективен в различных моделях раневых и лёгочных бактериальных инфекций у мышей, осложнённых множественной лекарственной устойчивостью [359]. Api88, Api137 и АЗ-АРО демонстрируют также эффекты длительного действия на *Enterobacteriaceae* и *P. aeruginosa* [360]. Кроме того, имеются успешные работы по разработке методов введения этих пептидов в эффективных дозах [361]. Показано, что они действуют не только как противомикробные препараты, но также могут оказывать мощное иммуномодулирующее действие, что может объяснить более высокую эффективность этих пептидов *in vivo*, чем можно было ожидать на основе витральных данных [359].

У позвоночных, в частности млекопитающих, в группе кателицидинов пролин-богатые антимикробные пептиды также представлены. Они выявлены главным образом у представителей отряда китопарнокопытных и также рассматриваются в числе АМП с многообещающими перспективами практического использования. В качестве иллюстрации этого мнения можно отметить созданный в 80-х годах XX века препарат на основе комплекса богатых пролином полипептидов из молозива овцы, названный колостринином, обладающий иммуномодулирующим, нейротекторным, противовоспалительным действием, а также прокогнитивным эффектом [362], который в пероральной таблетированной форме был введен в медицинскую практику для лечения болезни Альцгеймера [363].

Выделенный из гипоталамуса коровы пролин-богатый пептид галармин показал эффективность *in vivo* в модели летальной стафилококковой (вызванной MRSA) инфекции у мышей, хотя и не за счёт прямого действия, редко демонстрируемого пептидами данной группы в отношении грамположительных бактерий, а также за счёт иммуномодулирующего эффекта: привлечения иммунокомпетентных клеток в очаг и регуляции выброса про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-1 β , ФНО- α) [364].

Таким образом, с учётом перспектив разработки новых иммуномодулирующих и противомикробных препаратов богатые пролином АМП млекопитающих заслуживают всестороннего и детального изучения. К текущему моменту наиболее подробно изученными из них являются бактенецины коровы, для которых, как и для их фрагментов, продемонстрированы мощные эффекты против мультирезистентных грамотрицательных патогенов [365, 366].

Настоящее исследование было посвящено детальному изучению взаимосвязи структуры и биологической активности кателицидина ChVac3.4, также относящегося к семейству бактенецинов, который был ранее выделен из лейкоцитов домашней козы [23] наравне с другими представителями данной группы пролин-богатых АМП — мини-ChVac7.5N α и β и ChVac5 [72, 329]. Эти пептиды показали выраженную активность в отношении клинически

изолированных штаммов грамотрицательных бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [367]. В то время как минибактенецины и ChVac5 продемонстрировали сходные свойства с соответствующими ортологами из нейтрофилов коровы, ChVac3.4 показал более широкий спектр антимикробной активности, в том числе в отношении грамположительных бактерий, против которых у большинства пептидов группы бактенецинов активность заметно слабее выражена, чем против грамотрицательных [23]. Кроме того, было установлено, что он способен в значительной степени повреждать бактериальные мембраны, тогда как остальные бактенецины начинают оказывать мембранолитическое действие лишь в высоких концентрациях. Учитывая ряд отличительных черт мембранолитических пептидов, таких как быстрое развитие бактерицидного эффекта и неспецифичность мишени, затрудняющие выработку к ним резистентности [334–337], это добавляет ChVac3.4 потенциальной привлекательности с точки зрения возможных практических разработок на его основе. Таким образом, представлялось актуальным провести углублённый анализ необходимых для проявления данным пептидом активности структурных детерминант с целью определения путей оптимизации его свойств и селективности действия на бактериальные клетки без повреждения клеток макроорганизма.

Также интересно отметить, что характерной особенностью обогащенных пролином пептидов, выраженной и у многих представителей бактенецинов и родственных им АМП, является наличие повторяющихся структурных мотивов. Например, Vac5 быка имеет многократные RPPX повторы (где X — неполярная аминокислота). Vac-7 содержит характерные паттерны вида P-R-P со вставкой одиночных гидрофобных аминокислот в промежутках. PR-39 свиньи имеет структурную гомологию с Vac7 в N-концевой области и также ряд повторяющихся паттернов, включающих остатки аргинина и пролина. Показана его способность селективно связываться за счёт них с цитоплазматическими белками, содержащими SH3 домен [340]. Для ряда подобных пептидов подтверждено, что их биологически активной конформацией является именно

полипролиновая спираль II типа, о которой упоминалось ранее [368], и формированию которой способствует присутствие остатков пролина в структуре с определённым шагом.

Бактенецин ChVac3.4, однако, несмотря на то, что содержание остатка пролина в его структуре остается высоким, выделяется отсутствием большого числа повторяющихся регулярно пролин-(аргинин)-содержащих мотивов, что может быть ещё одним фактором, лежащим в основе отличий его свойств от других бактенецинов и повышает интерес к его структурно-функциональному анализу.

За счёт определённого дизайна и последующего синтеза набора модифицированных вариантов на основе ChVac3.4 исследовали ряд основных особенностей его первичной структуры. Были проведены исследования с целью определения участков молекулы, отвечающих за реализацию наблюдаемых эффектов ChVac3.4 в отношении бактериальных и эукариотических клеток и получения представлений о молекулярных мишенях его действия. Кроме того, анализировали потенциал тех или иных модификаций для оптимизации характеристик пептида как потенциального антибактериального или, возможно, даже противоопухолевого агента.

Исследование укороченных вариантов ChVac3.4 показало, что даже короткоцепочечный *N*-концевой фрагмент, включающий 14 первых аминокислотных остатков исходной последовательности, сохраняет активность против грамотрицательных бактерий. Это наблюдение согласуется с данными Mardirossian и коллег для укороченных фрагментов Vac5 коровы. Так, *N*-концевые участки Vac5(1-25) и Vac5(1-21) демонстрируют антимикробную активность и способность ингибировать синтез белка в бактериальной клетке, а наиболее короткоцепочечным фрагментом с выраженной активностью и влиянием на процесс трансляции является Vac5(1-17) [369].

Полученные данные подтверждают имеющиеся наблюдения о важности *N*-концевого участка для реализации пептидом его противомикробной функции [340–342]. Интересно отметить, что в процессе укорочения последовательности

падение активности ChVac3.4 происходит не равномерно по всему спектру: в первую очередь снижаются показатели против грамположительных бактерий, в отношении которых менее активны и другие представители семейства бактенецинов. Данный феномен замечен уже на примере ChVac3.4(1-19), который целиком включает наименее гомологичный белку ChVac5 участок последовательности ChVac3.4 с 12-го по 18-ый аминокислотный остаток, что приводит к мысли о том, что как минимум часть детерминант, обеспечивающих необычно широкий спектр антимикробного действия ChVac3.4 располагается дальше в C-концевом участке последовательности. Возможно, косвенным подтверждением этого предположения является то, что показавший крайне слабую антимикробную активность C-концевой фрагмент ChVac3.4(12-26), тем не менее, обеспечивает более быстрый эффект на проницаемость наружной мембраны тестового штамма *E. coli* ML-35p, чем более активные N-концевые фрагменты ChVac3.4(1-14) и ChVac3.4(1-19).

Исследование токсических свойств синтезированных фрагментов в отношении нормальных и опухолевых клеток человека демонстрирует, что снижение цитотоксической активности, наоборот, более ярко проявляется у N-концевых пептидов. Таким образом, данный участок не имеет первостепенной роли в реализации указанного эффекта. Можно заключить, что особенности структуры, отвечающие за повреждающее действие ChVac3.4 в отношении бактериальных и в отношении эукариотических клеток частично пространственно разобщены, что открывает перспективы для повышения селективности его действия как антимикробного агента.

С одной стороны, наблюдаемая картина может в некоторой степени являться следствием неравномерного распределения заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков и укладываться в известные представления о преимущественном вкладе заряда в антимикробную активность, а гидрофобности — в неспецифическую клеточную токсичность [119, 347]. При сравнении зарядовых характеристик N- и C-концевых фрагментов (см. табл. 3.1) и времени удержания на колонке при ОФ ВЭЖХ (см. табл. 3.2) видно, что заряд

сосредоточен преимущественно в *N*-концевой части, а степень гидрофобности выше у *C*-концевой. Тем не менее, с учётом имеющихся признаков наличия у ChVac3.4 внутриклеточных мишеней, нельзя полностью исключать вовлечение других, более специфических механизмов, учитывающих не только общие физико-химические характеристики молекулы.

Исследование роли *C*-концевого амидирования в реализации биологических свойств ChVac3.4 и его аналогов на примере вариантов, отличавшихся только отсутствием или наличием данной модификации, не выявило существенного влияния данной особенности на спектр и величину антимикробной активности. Тем не менее, при рассмотрении динамики повреждающего действия пептидов на цитоплазматическую мембрану *E. coli* ML-35p было замечено 15-минутное отставание в реализации эффектов неамидированных вариантов от амидированных, а сравнение значений ЭК₅₀ в отношении эукариотических клеток показало практически двукратное снижение токсичности неамидированных пептидов. Также при более подробном анализе цитотоксического действия ChVac3.4-1-COOH на начальных сроках наблюдалось замедление развития эффекта в сравнении с оригинальным амидированным пептидом. Наблюдающийся масштаб расхождений активности амидированных и неамидированных вариантов не может объясняться лишь разницей заряда на единицу и соответственными незначительными сдвигами (на фоне общей величины заряда +7/+8) в силе электростатических взаимодействий пептида с отрицательно заряженными компонентами целевых клеток.

Интересно отметить, что имеющиеся на данный момент сведения о биологическом значении обсуждаемой посттрансляционной модификации касаются в большей степени экскреции веществ из клетки, а также участия в сигнальной трансдукции [370, 371]. Практически половина известных природных биологически активных пептидов, в особенности секретируемых, подвергается *C*-концевому амидированию. Данная стадия является финальной, лимитирующей весь процесс по скорости этапом их синтеза и, соответственно, объектом регуляции [370]. Амидированные пептиды, как правило, менее чувствительны к

протеолитической деградации и имеют большее время полужизни, а соответственно, и циркуляции в кровотоке. Тогда как карбоксильная группа при физиологических условиях может протонироваться и депротонироваться, амидная группа оказывается менее чувствительной к колебаниям рН в живом организме. Также показано, что амидирование может существенно влиять на аффинность связывания пептидов с рецепторами, сопряженными с G-белками. Часто именно C-концевая амидированная группа пептида тесно взаимодействует с трансмембранным рецептором, обеспечивая более прочное связывание и усиление сигнальной трансдукции. В отсутствие C-концевого амидирования биологическая активность таких пептидов как вазопрессин, окситоцин и тиреолиберин значительно снижается [371]. Установлена роль нарушений C-концевого амидирования в развитии различных патологических процессов, в том числе дисфункций нервной системы [372] и гипертонии [373].

Таким образом, применительно к АМП можно сделать предположение в пользу вовлечения C-концевой амидированной группы во взаимодействие с мембранными белками-транспортёрами или, в случае действия на эукариотические клетки, в активацию сигнальных путей через мембранные рецепторы, как одного из возможных объяснений наблюдаемой разницы в активности амидированных и неамидированных вариантов.

Здесь следует подчеркнуть, что так как большинство описанных ранее богатых пролином АМП в отличие от ChVac3.4 характеризуется тем, что начинает вызывать выраженное повреждение бактериальных мембран только при концентрациях, намного превышающих их МИК, а на начальных этапах преимущественно реализует своё действие через внутриклеточные механизмы, то это предполагает преодоление ими мембраны другим способом. Так, для бактенецинов коровы Vac5 и Vac7, а также родственного бактенецинам кателицидина PR-39 свиньи была показана возможность транслокации через внутреннюю мембрану грамотрицательных бактерий без образования пор с помощью транспортеров SbmA и/или YjiL/MdtM [21, 338, 374, 375]. Более выраженная мембранолитическая активность ChVac3.4 не исключает

потенциальной возможности его дополнительного транспорта в клетку по сходным механизмам.

Исследование роли остатка гистидина в положении 14 в аминокислотной последовательности ChVac3.4 демонстрирует картину, сходную с данными по амидированию, что позволяет делать аналогичные предположения об участии в специфическом взаимодействии с мембранными белками. Хотя делеция остатка гистидина незначительно повышает антимикробную активность пептида, при этом происходит задержка в развитии его повреждающего действия на цитоплазматическую мембрану бактерии более выраженная, чем у неамидированных пептидов, и наблюдается практически двукратное повышение полумаксимальных токсических концентраций в отношении клеток человека.

Интересно, что при рассмотрении всей наименее гомологичной другим бактенецинам области ChVac3.4 с 12-го по 18-ый аминокислотный остаток, пептиды с удвоением данного участка (и, соответственно, гистидина в нём) показывают более яркие отличия от оригинала во взаимодействии с эукариотическими клетками, а не с бактериальными. Именно пептид ChVac3.4-1-NH₂ был самым цитотоксическим из всех рассмотренных вариантов, его ЭК₅₀ в отношении опухолевых клеточных линий были практически в 2 раза ниже, чем у исходного ChVac3.4-NH₂. При этом для более подробно исследованного неамидированного варианта с удвоением участка 12–18 — ChVac3.4-1-COOH — было выявлено повышение доли клеток, погибающих по пути апоптоза. Таким образом, данный регион в большей степени определяет реализацию цитотоксических эффектов, которые также отличают ChVac3.4 от большинства других бактенецинов. Смещение баланса среди гибнущих клеток в сторону апоптотических по сравнению с некротическими указывает на вероятное вовлечение участка 12–18 во взаимодействие со специфическими молекулярными мишенями, обеспечивающими запуск соответствующих сигнальных каскадов в клетках.

Добавление второго триплета RFR к N-концу молекулы показало себя перспективной стратегией, в особенности на примере усечённого пептида

ChVac3.4(1-14)-NH₂. Как упоминалось выше, этот самый короткоцепочечный из рассмотренных *N*-концевых фрагментов в сравнении с оригиналом сохранял лишь остаточную активность в отношении грамотрицательных бактерий. Однако удвоение лидирующего RFR-триплета не только восстанавливало его антимикробную активность против планктонных бактерий по всему спектру — и против грамотрицательных, и против грамположительных — до уровня полноразмерного ChVac3.4-NH₂, но даже усиливало её.

С одной стороны, RFR-мотив содержит два остатка аргинина, несущих положительный заряд, что потенциально может давать вклад в усиление микробоцидного действия. Выявленная положительная корреляция заряда и антимикробной активности была выявлена ранее для α -спиральных и β -складчатых пептидов, хотя на примере магейнина 2 и его аналогов отмечалось, что оптимальным диапазоном суммарного заряда молекулы является промежуток от +4 до +6, после чего влияние на антимикробную активность снижается и может сменяться ростом токсичности для эукариотических клеток и потерей селективности [347, 352, 376]. Добавление RFR к ChVac3.4(1-14)-NH₂ повышало заряд с +6 до +8, а ГМИК уменьшало с 17,4 до 3,7 мкМ; в то же время в случае другой модификации — ChVac3.4-1-NH₂ — при добавлении к ней RFR заряд возрастал с +8 до +10, но такого же значительного прироста активности не наблюдалось: разница в ГМИК составила всего 0,4 мкМ. Нельзя исключать, что для бактенецинов оптимум заряда может быть выше, в диапазоне от +7 до +8.

С другой стороны, имеются основания предположить, что главной причиной наблюдаемого изменения активности является не повышение заряда, а модуляция взаимодействия пептида с его специфическими молекулярными мишенями данным конкретным аминокислотным триплетом. Указанием на это служит динамика влияния пептидов на проницаемость бактериальных мембран. В случае RFR-ChVac3.4-1-NH₂ существенных сдвигов ни от версии без дополнительного триплета, ни от оригинального ChVac3.4-NH₂ не отмечается, мембранолитическая активность этих трёх пептидов остаётся высокой. Для RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂ же наблюдается абсолютно другая картина: эффект

повышения проницаемости менее выражен по сравнению с исходным пептидом, а в отношении цитоплазматической мембраны — даже по сравнению малоактивным в отсутствие дополнительного RFR фрагментом ChVac3.4(1-14)-NH₂. Таким образом, несмотря на то, что добавление RFR восстанавливает уровень антимикробной активности укороченного N-концевого фрагмента до уровня исходного полноразмерного ChVac3.4-NH₂, механизм, по которому она реализуется, претерпевает изменения или на первый план выходит повреждение внутриклеточных мишеней, которое в случае полноразмерных вариантов, включая ChVac3.4-NH₂ или другой рассмотренный пептид с RFR — RFR-ChVac3.4-1-NH₂, маскируется более быстро развивающимся бактериальным киллингом за счёт нарушения барьерной функции бактериальных мембран.

Литературные данные также свидетельствуют в пользу версии о важности лидирующих остатков аргинина именно для взаимодействия со специфическими мишенями. Изначально их критическая роль в реализации антимикробного действия была выявлена на примере фрагментов бактенецинов коровы Vac5 и Vac7, а также богатого пролином кателицидина свиньи PR-39 [16, 342, 377]. Падение активности при удалении 1–4 фрагмента RRIR из пептидов Vac7(1-35) и Vac7(1-23), либо 1–3 фрагмента RFR из Vac5(1-31) может достигать до двух порядков [342]. Пептид Vac5(4-23) и более короткоцепочечные последовательности полностью утрачивают антимикробную активность. Также установлено, что к снижению эффективности антимикробного действия приводит не только полное удаление, но и замена аргинина другой положительно заряженной аминокислотой — лизином: 2–8-кратный рост значений МИК был выявлен на примере соответствующих модификаций Vac7 и PR-39 [16, 342, 377]. Это показывает, что в лидирующем N-концевом участке пептидов важны не только величина заряда и его расположение, но и другие параметры аминокислотных остатков, что играет роль в специфических межмолекулярных взаимодействиях. Кроме того, как минимум до высоких концентраций, в несколько раз превышающих МИК, активность Vac5, Vac7 и большинства других богатых пролином пептидов реализуется именно через специфические

внутриклеточные мишени. В качестве одной из них для *Vac7* и фрагментов ортолога овцы *OaVac7.5* идентифицирован бактериальный шаперон *DnaK*, действуя на который пептиды нарушают фолдинг белка [90, 92, 93]. Кроме того, для фрагментов как *Vac7*, так и *Vac5* показана способность связываться с выходным туннелем рибосом, ингибируя трансляцию [95, 374].

Несмотря на то, что для оригинального *ChVac3.4-NH₂* внутриклеточные молекулярные мишени напрямую на сегодняшний день не выявлены, с учётом всех обнаруженных в данной работе признаков, в частности особенностей динамики подавления метаболической активности бактерий в суспензии в пограничной, равной МИК концентрации, и утраты некоторыми модификациями мембранолитических свойств при сохранении и даже повышении общего уровня активности, можно с уверенностью говорить, что такие мишени существуют. Принимая во внимание гомологию его *N*-концевого участка с *ChVac5*, который в свою очередь является ортологом *Vac5*, *ChVac3.4* и его модификации также способны связываться с 70S субъединицей бактериальных рибосом в зоне выходного туннеля. Таким образом, можно предполагать, что именно этот аспект действия пептида усиливается присоединением дополнительного RFR-триплета. На примере *Vac7*, было показано вовлечение *N*-концевых участков бактенецинов и в их взаимодействие с упоминавшимися специфическими мембранными транспортерами, необходимыми для проникновения пептида в цитоплазму бактерии [378]. Однако добавление RFR восстанавливало и усиливало антимикробную активность модификаций *ChVac3.4* в том числе (и даже в большей степени) в отношении грамположительных бактерий, которые этих транспортеров не экспрессируют, чем, скорее всего, и обуславливается низкая активность большинства богатых пролином пептидов против данной группы микроорганизмов.

Выявленное повышение активности при добавлении дополнительного RFR-триплета согласуется с сообщавшимися ранее данными об усилении антимикробных свойств фрагмента коровьего бактенецина *Vac5(1-23)* в 2–8 раз при присоединении к *N*-концу последовательности одного или двух остатков

аргинина [342]. Отсутствие видимого эффекта в случае пептида RFR-ChVac3.4-1-NH₂, как упоминалось, скорее всего объясняется тем, что усиление блокировки синтеза белка на рибосомах или действия на другие внутриклеточные мишени маскируется более быстро развивающимся киллингом по мембранолитическому механизму. Хотя нельзя полностью исключать, что повышение активности может зависеть и от длины фрагмента, ярче проявляясь у более короткоцепочечных пептидов.

Другим положительным моментом использования дополнительного RFR-триплета было то, что в отличие от противомикробного, цитотоксическое действие пептидов на эукариотические клетки при данной модификации даже незначительно снижалось. Таким образом, в случае короткоцепочечного *N*-концевого фрагмента RFR-ChVac3.4(1-14) удавалось не только добиться сохранения величины антимикробной активности на уровне исходного пептида при значительном уменьшении длины, но и существенно — более чем четырёхкратно — повысить селективность действия именно в отношении бактериальных клеток. Кроме того, усиливался и сочетанный эффект пептида с антибиотиками против антибиотикорезистентных штаммов бактерий, в особенности грамотрицательных: в сравнении с исходным ChVac3.4 укороченный RFR-ChVac3.4(1-14) демонстрировал как более низкие значения иФИК, так и большее число случаев синергизма. Как отмечалось выше, для укороченного пептида RFR-ChVac3.4(1-14) характерна существенная задержка (более 60 мин при концентрации 2×МИК) и снижение роста мембранной проницаемости в сравнении с ChVac3.4.

Учитывая выявленные преимущества удвоения *N*-концевого RFR-триплета, эффективность пептидов с данной модификацией была дополнительно протестирована и в отношении микробных биоплёнок. Полученные данные дополняют имеющиеся представления о спектре активности пролин-богатых пептидов, поскольку ранее противобиоплёночная активность ChVac3.4 ещё не рассматривалась.

Образование биоплёнок — одна из основных бактериальных стратегий по защите от неблагоприятных факторов окружающей среды, в том числе от действия различных антимикробных соединений и реакций иммунной системы организма-хозяина [304, 379, 380]. Более половины случаев госпитализации, связанных с персистирующей бактериальной инфекцией (по различным оценкам, 65–80%), обусловлены развитием биоплёнок [381–383]. При такой форме существования микробного консорциума бактериальные клетки в нём оказываются защищены плотным внеклеточным матриксом, ограничивающим к ним доступ как эффекторных элементов иммунной системы, так и экзогенных антимикробных препаратов. Более того, элиминация метаболически неактивных клеток-персистеров, присутствующих в составе биоплёнки, представляет серьёзную проблему для большинства классов применяемых на сегодняшний день антибиотиков [304, 382]. В последние десять лет АМП успели привлечь внимание исследователей и зарекомендовать себя как многообещающий источник не только противомикробных, но и противобиоплёночных средств, несмотря на то, что к настоящему моменту лишь небольшая часть идентифицированных АМП была надлежащим образом изучена в данном аспекте [384].

Способность АМП, имеющих своей мишенью бактериальную мембрану, действовать практически без потери эффективности и на метаболически неактивные бактерии может быть успешно использована для уничтожения клеток-персистеров в сочетании с применяемыми в настоящее время противомикробными препаратами: для ряда последних был продемонстрирован синергизм с АМП против биоплёнок [383, 385]. Также было показано, что сами по себе различные АМП не только уничтожают планктонные бактерии, но и ослабляют первичную адгезию бактериальных клеток к поверхности, а внутри сформированных биоплёнок могут нарушать взаимодействие между элементами внеклеточного матрикса и находящимися внутри него бактериями. Помимо этого, для ряда пептидов, проявляющих выраженные противобиоплёночные свойства, были идентифицированы более специфические механизмы. Была показана способность модулировать подвижность бактериальных клеток, негативно влиять

на межклеточную сигнализацию, обеспечивающую чувство кворума, нарушать работу алармона гуанозина тетра-/пентафосфата (p)ppGpp и, как следствие, снижать интенсивность синтеза различных матричных элементов или вызывать их деградацию [304, 383, 386, 387].

Основываясь на данных, полученных в ходе текущего исследования, можно заключить, что исходный природный кателицидин ChBac3.4-NH₂ обладает противобиоплённым потенциалом. Для кателицидин человека LL-37 показана способность снижать образование биоплёнок *P. aeruginosa* в субмикробоцидных концентрациях вплоть до $\frac{1}{128}$ его МИК, а не менее чем 50% ингибирование наблюдалось начиная с $\frac{1}{16}$ МИК и выше [388]. ChBac3.4-NH₂ проявляет противобиоплённую активность против *P. aeruginosa* в том же диапазоне субмикробоцидных концентраций, а более чем 50% ингибирование выявлено в концентрациях вплоть до $\frac{1}{64}$ его МИК.

Активность ChBac3.4-NH₂ и сходной с ним по длине цепи модификации RFR-СBac3.4-1-NH₂ против биоплёнки, образованной клиническим изолятом *A. baumannii*, согласуется с литературными данными активности бактенецина быка Bac7(1-35) [389], и проявляется заметно ниже уровня МИК. В то же время влияние Bac7(1-35) на формирование биоплёнок *P. aeruginosa* выражено слабее в сравнении с упомянутым выше эффектом, наблюдавшимся для ChBac3.4-NH₂ против данного вида бактерий. Согласно данным Runti et al. [390], статистически значимое ингибирование образования биоплёнок пептидом Bac7(1-35) в концентрациях ниже $\frac{1}{2}$ МИК было выявлено в отношении только одного из четырех протестированных изолятов *P. aeruginosa*, причём этот изолят был также наиболее чувствителен к действию Bac7(1-35) по результатам анализа антимикробной активности в отношении планктонных бактерий.

Выявленное для укороченного пептида RFR-ChBac3.4(1-14)-NH₂ снижение способности к полному (100%) подавлению формирования биоплёнок может указывать на его более низкую эффективность против клеток-персистеров в связи с ослабленными в сравнении с исходным ChBac3.4 мембранолитическими свойствами. С другой стороны, С-концевая часть ChBac3.4-NH₂, отсутствующая у

RFR-ChVac3.4(1-14)-NH₂, возможно, содержит какие-либо специфические структурные детерминанты, определяющие успешное и полное предотвращение образования бактериями биоплёнок. Для рациональной разработки модификаций с повышенными противобиоплёнными свойствами требуется более тщательное исследование механизма действия ChVac3.4 в этом аспекте. Изучение деталей реализации эффекта ChVac3.4 на биоплёнки актуально и в более широком смысле, поскольку большинство известных на данный момент противобиоплённых АМП с идентифицированными специфическими мишенями имеет значительные структурные отличия от богатых пролином пептидов. Таким образом, анализ действия последних может выявить ранее неизвестные мишени и механизмы, и ответственные за их реализацию структурные детерминанты, которые в дальнейшем могут быть использованы при конструировании химерных пептидов, объединяющих преимущества различных структурных классов АМП.

По результатам данной работы было показано, что в случае предотвращения формирования биоплёнок большее значение имеет присутствие C-концевого фрагмента или, как минимум, длина аминокислотной последовательности, тогда как удвоение N-концевого RFR-триплета, очевидно, не показывает такой же эффективности, как при действии на планктонные бактерии, хотя и способно в ряде случаев расширить диапазон субмикробоцидных концентраций, в которых обнаруживается частичное ингибирование образования биоплёнок.

Другой рассмотренной в текущей работе модификацией, направленной на потенциальное усиление и оптимизацию антимикробных свойств было внесение в молекулу ChVac3.4 остатков аминокислоты триптофана. Богатые триптофаном пептиды являются одной из перспективных групп АМП. Ряд представителей данной группы хорошо известен выраженной антимикробной активностью широкого спектра, сочетающейся при этом ещё и с малой длиной молекулы. Так, например, высокоактивные триптофан-богатые кателицидины индолицидин коровы и тритрптицин свиньи включают всего по 13 аминокислотных остатков [117, 391]. При этом пептидные модификации на основе индолицидина уже

находятся на этапе клинических испытаний. Наиболее удачная из них — омиганан (Omiganan, CLS001), который на данный момент проходит III фазу клинических испытаний в качестве средства для поверхностного применения при лечении розацеа и II фазу клинических испытаний как препарат для лечения акне, атопического дерматита и вагинальной интраэпителиальной неоплазии [9].

Однако внедрение двух остатков триптофана, в положениях 10 и 22, симметрично относительно области 12–18, в молекулу ChVac3.4-2-COON оказалось не столь удачным и скорее привнесло характерные для триптофан-богатых пептидов проблемы токсичности [392]: данный пептид оказался единственным среди рассмотренных модификаций, проявившим гемолитические свойства. Проявление гемолитических свойств согласуется с представлениями о положительной корреляции между усилением токсичности и повышением гидрофобности, которая возросла при внесении дополнительных остатков триптофана. При этом по сравнению с оригинальным пептидом антимикробная активность ChVac3.4-2-COON и его селективность в отношении бактериальных клеток не усилились. Наблюдался небольшой рост индекса селективности в отношении опухолевых клеток в сравнении с нормальными, но он не превышал того же показателя у модификации ChVac3.4-1-COON с удвоенным участком 12–18, которая при этом гемолитических свойств не демонстрировала.

Рассмотрение селективности не только в отношении бактерий, но и против опухолевых эукариотических клеток было связано с оценкой возможных перспектив ChVac3.4 в качестве противоопухолевого агента. В настоящее время АМП с противоопухолевыми свойствами некоторые исследователи рассматривают именно как класс противоопухолевых пептидов и сокращённо обозначают ACPs — anticancer peptides [393]. Также, безотносительно их собственных противоопухолевых качеств, возможно применение АМП в качестве проникающих в клетку пептидных векторов (cell-penetrating peptides) для доставки непосредственно в малигнизированные клетки лекарственных средств с необходимым действием [394]. Так или иначе, одним из потенциальных преимуществ АМП при этом является то, что препараты на их основе будут

обладать сразу двойным действием: не только против опухолей, но и против инфекций, которые из-за серьёзного ослабления иммунной системы при лучевой или химиотерапии являются частым сопутствующим осложнением.

Ранее было установлено, что белок ChVac3.4 обладает выраженным цитотоксическим действием в отношении некоторых линий опухолевых клеток *in vitro*, в том числе против линии K562, устойчивой к доксорубину [23, 24]. При этом отсутствие у него, как и у других бактенецинов, гемолитической активности является важным преимуществом перед некоторыми АСР, такими как, например, ВМАР, мелиттином и др. [339].

В данной работе цитотоксические свойства структурных аналогов ChVac3.4 были исследованы в отношении линий клеток эритромиелоидной лейкемии человека K562 и клеток гистиоцитарной лимфомы человека U937, а также нормальных эритроцитов и мононуклеаров периферической крови человека. Большинство структурных модификаций, как и оригинал, проявляли цитотоксическую активность в отношении трансформированных клеток без заметных гемолитических эффектов в применяемом диапазоне концентраций. При сравнении активности различных модификаций, как упоминалось выше, было выявлено, что С-концевое амидирование и участок с 12 по 18 аминокислотный остаток преимущественно влияют на проявление пептидами цитотоксических свойств. Удвоение участка 12–18 в комбинации с отсутствием С-концевого амидирования у пептида ChVac3.4-1-COОН, несмотря на некоторое снижение активности, позволило повысить селективность действия в отношении опухолевых клеток в сравнении с нормальными *in vitro*, при этом, в отличие от обогащённого триптофаном ChVac3.4-2-COОН — без усиления гемолитических свойств. Дальнейший анализ действия ChVac3.4-1-COОН показал повышение доли клеток, погибающих по пути апоптоза, в сравнении с оригинальным природным ChVac3.4-NH₂. Несмотря на возрастающий интерес к процессам некроптоза и аутофагии, как к возможным индуцируемыми путям элиминации малигнизированных клеток, в частности устойчивых к применяемым в настоящее время противоопухолевым препаратам, селективный апоптоз всё ещё остаётся

преимущественным выбором при разработке новых терапевтических агентов в данной области — в частности, из-за лучшей селективности и отсутствия сопутствующих осложнений, связанных риском развития системной воспалительной реакции [395–399]. Наблюдаемый в присутствии ChVac3.4-1-COON апоптоз, предположительно, происходит по каспазозависимому пути, поскольку ранее в экспериментах на клетках U937 и K562, обработанных ChVac3.4-NH₂ в концентрации, близкой к ЭК₅₀, было показано увеличение активности каспазы 3 [302].

Противоопухолевый эффект ChVac3.4-1-COON был также оценён в *in vivo* модели перевиваемой АКЭ мыши, в которой пептид показал способность увеличивать продолжительность жизни экспериментальных животных в относительно низкой дозе (1 мкг/животное 1 раз в неделю). В то же время отсутствие прямой зависимости эффекта от дозы заставляет предполагать скорее иммуномодулирующие механизмы в основе наблюдаемого действия ChVac3.4-1-COON.

В ходе дальнейшего изучения действие аналогов ChVac3.4 может быть усилено, при этом не только за счёт непосредственной оптимизации структуры. Возможно также применить и другие подходы: сочетанное введение пептида с другими противоопухолевыми препаратами (например, для АМП PG1 *in vitro* был выявлен синергизм противоопухолевого действия с доксорубицином [201]); создание химерных пептидов, включающих фрагменты, распознающие опухоль, для улучшения индекса селективности; использование наноконтейнеров для таргетной доставки пептидов, предотвращения их протеолитического расщепления и увеличения биодоступности мишеней; применение для оптимизации структуры пептида и улучшения его активности методов компьютерного моделирования, в том числе основанных на алгоритмах машинного обучения [400].

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 субмикробоцидных 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 ChVac3.4 и других бактенецинов. Подобные пептиды представляются перспективными кандидатами для разработок лекарственных препаратов на их основе.

Наблюдаемое цитотоксическое действие ChVac3.4 и некоторых его структурных вариантов по отношению к опухолевым клеткам в культуре, а также противоопухолевый эффект выбранного аналога (ChVac3.4-1-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 ChVac3.4, за исключением обогащённого триптофаном варианта с повышенной гидрофобностью, сохраняют низкую гемолитическую активность в отношении эритроцитов человека.
6. N-концевые фрагменты ChVac3.4 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 C-концевого амидирования снижает цитотоксическое действие пептида. Сочетание структурных особенностей — отсутствия C-концевого амидирования с удвоением участка 12–18, как продемонстрировано на примере пептида ChVac3.4-1-COON, — позволяет повысить селективность токсического действия ChVac3.4 в отношении опухолевых клеток без усиления гемолитичности.
8. В экспериментах *in vitro* на линии клеток K-562 и *in vivo* на модели перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха мыши показано противоопухолевое действие ChVac3.4-1-COON. 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 СОКРАЩЕНИЙ

6-КФДА — 6-карбоксифлуоресцин диацетат

AnnCy3 — аннексин-Cy3.18

СРБ — С-реактивный белок

DAMP — (Damage-Associated Molecular Patterns) ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны

ESBL — (Extended Spectrum Beta-Lactamase) β-лактамаза расширенного спектра

ГМИК — геометрическое среднее минимальных ингибирующих концентраций

НСТУ — [O-(1H-6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate] O-(1H-6-хлоробензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий гексафлюорофосфат

MRSA — устойчивый к метициллину (methicillin-resistant) *Staphylococcus aureus*

NETs — (neutrophil extracellular traps) нейтрофильные внеклеточные ловушки

OD — (optical density) оптическая плотность

ONPG — O-нитрофенил-β-D-галактопиранозид

АКЭ — асцитная карцинома Эрлиха

АМП — антимикробные пептиды

БСА — бычий сывороточный альбумин

ГКГС — главный комплекс гистосовместимости

ЕАТ — естественные антитела

ЕК — естественные киллеры

ЗФР — забуференный физиологический раствор

ИЛ — интерлейкин

ИС — индекс селективности

иФИК — индекс фракционной ингибирующей концентрации

ИФН — интерферон

ИЭЛ — интраэпителиальные лимфоциты

КОЕ — колониеобразующие единицы

ЛПС — липополисахарид

МИК — минимальная ингибирующая концентрация

МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид

ОФ ВЭЖХ — обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ПАМП — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

ПЭГ — полиэтиленгликоль

ТРФ — трансформирующий ростовой фактор

ТФУ — трифторуксусная кислота

ФНО — фактор некроза опухоли

ФС — фосфатидилсерин

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭК50 — 50%-ая (полумаксимальная) эффективная концентрация

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ventola, C.L. The antibiotic resistance crisis: part 2: management strategies and new agents / C.L. Ventola // *Pharmacy and Therapeutics*. — 2015. — V.40, №5. — P.344–352.
2. Batoni, G. Therapeutic Potential of Antimicrobial Peptides in Polymicrobial Biofilm-Associated Infections / G. Batoni, G. Maisetta, S. Esin // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — V.22, №2. — 482. doi: 10.3390/ijms22020482.
3. Deslouches, B. Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications / B. Deslouches, Y.P. Di // *Oncotarget*. — 2017. — V.8, №28. — P.46635–46651. doi: 10.18632/oncotarget.16743.
4. Chatterjee, S. Mechanisms of resistance against cancer therapeutic drugs / S. Chatterjee, S.G. Damle, A.K. Sharma // *Curr. Pharm. Biotechnol.* — 2014. — V.15. — P.1105–1112. doi: 10.2174/1389201015666141126123952.
5. Riera Romo, M. Innate immunity in vertebrates: an overview / M. Riera Romo, D. Pérez-Martínez, C. Castillo Ferrer // *Immunology*. — 2016. — V.148, №2. — P.125–139. doi: 10.1111/imm.12597.
6. Mookherjee, N. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential / N. Mookherjee, M.A. Anderson, H.P. Haagsman, D.J. Davidson // *Nature Reviews Drug Discovery*. — 2020. — V.19, №5. — P.311–332. doi:10.1038/s41573-019-0058-8.
7. Zanetti, M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals / M. Zanetti // *Curr. Issues Mol. Biol.* — 2005. — V.7, №2. — P.179–196.
8. Dijksteel, G.S. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs) / G.S. Dijksteel, M.M.W. Ulrich, E. Middelkoop, B.K.H.L. Boekema // *Front. Microbiol.* — 2021. — V.12. — 616979. doi: 10.3389/fmicb.2021.616979.
9. Koo, H.B. Antimicrobial peptides under clinical investigation / H.B. Koo, J. Seo // *Pept. Sci.* — 2019. — V.111. — e24122. doi: 10.1002/pep2.24122.
10. Balandin, S.V. Molecular mechanisms of antitumor effect of natural antimicrobial peptides / S.V. Balandin, A.A. Emelianova, M.B. Kalashnikova, V.N. Kokryakov, O.V. Shamova, T.V. Ovchinnikova // *Russ. J. Bioorg. Chem.* — 2016. — V.42, №6. — P.575–589. doi: 10.1134/S1068162016060029.
11. Tornesello, A.L. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities / A.L. Tornesello, A. Borrelli, L. Buonaguro, F.M. Buonaguro, M.L. Tornesello // *Molecules*. — 2020. — V.25, №12. — 2850. doi: 10.3390/molecules25122850.
12. Felício, M.R. Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities / M.R. Felício, O.N. Silva, S. Gonçalves, N.C. Santos, O.L. Franco // *Front. Chem.* — 2017. — V.5. — 5. doi: 10.3389/fchem.2017.00005.
13. Otvos, L. Host Defense Peptides and Cancer; Perspectives on Research Design and Outcomes / L. Otvos // *Protein Pept. Lett.* — 2017. — V.24, №10. — P.879–886. doi: 10.2174/0929866524666170202153501.
14. Кокряков В.Н. Биология антибиотиков животного происхождения / В.Н. Кокряков. — СПб.: Наука, 1999. — 162 с.

15. Huan, Y. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields / Y. Huan, Q. Kong, H. Mou, H. Yi // *Front. Microbiol.* — 2020. — V.11. — 582779. doi: 10.3389/fmicb.2020.582779.
16. Gennaro, R. Pro-rich Antimicrobial Peptides from Animals: Structure, Biological Functions and Mechanism of Action / R. Gennaro, M. Zanetti, M. Benincasa, E. Podda, M. Miani // *Curr. Pharm. Des.* — 2002. — V.8, № 9. — P.763–778. doi:10.2174/1381612023395394.
17. Graf, M. Intracellular Antimicrobial Peptides Targeting the Protein Synthesis Machinery / M. Graf, D.N. Wilson // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2019. — V.1117. — P.73–89. doi: 10.1007/978-981-13-3588-4_6.
18. Graf, M. Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis / M. Graf, M. Mardirossian, F. Nguyen, A.C. Seefeldt, G. Guichard, M. Scocchi, C.A. Innis, D.N. Wilson // *Nat. Prod. Rep.* — 2017. — V.34, №7. — P.702–711. doi: 10.1039/c7np00020k.
19. Kay, B.K. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains / B.K. Kay, M.P. Williamson, M. Sudol // *FASEB J.* — 2000. — V.14, №2. — P.231-41. doi: 10.1096/fasebj.14.2.231.
20. Srinivasan, M. Proline rich motifs as drug targets in immune mediated disorders / M. Srinivasan, A.K. Dunker // *Int. J. Pept.* — 2012. — V.2012. — 634769. doi: 10.1155/2012/634769.
21. Mattiuzzo, M. Role of the Escherichia coli SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides / M. Mattiuzzo, A. Bandiera, R. Gennaro, M. Benincasa, S. Pacor, N. Antcheva, M. Scocchi // *Mol Microbiol.* — 2007. — V.66, № 1. — P.151-63. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05903.x.
22. Krizsan, A. Short Proline-Rich Antimicrobial Peptides Inhibit Either the Bacterial 70S Ribosome or the Assembly of its Large 50S Subunit / A. Krizsan, C. Prahll, T. Goldbach, D. Knappe, R. Hoffmann // *Chembiochem.* — 2015. — V.16, №16. — P.2304–2308. doi: 10.1002/cbic.201500375.
23. Shamova, O. ChBac3.4: A novel proline-rich antimicrobial peptide from goat leukocytes / O. Shamova, D. Orlov, C. Stegemann, P. Czihal, R. Hoffmann, K. Brogden, N. Kolodkin, G. Sakuta, A. Tossi, H.-G. Sahl, V. Kokryakov, R.I. Lehrer // *Int. J. Pept. Res. Therap.* — 2009. — V.15, №1. — P.31–42. doi: 10.1007/s10989-009-9170-7.
24. Shamova, O.V. Effects of a proline-rich peptide of the innate immune system – ChBac3.4 on human tumor cells / O.V. Shamova, T.Yu. Pazina, M.S. Zharkova, A.Yu. Artamonov, V.A. Yukhnev, T.M. Grinchuk, D.S. Orlov // *Abstracts of the IV International Interdisciplinary Conference “Modern Problems of System Regulation of Physiological Functions”* — 17–18 September. — 2015. — Moscow. — P. 687–689.
25. Iwasaki, A. Control of adaptive immunity by the innate immune system / A. Iwasaki, R. Medzhitov // *Nat. Immunol.* — 2015. — V.16, №4. — P.343–353. doi: 10.1038/ni.3123.
26. Ip, W.K. Mannose-binding lectin and innate immunity / W.K. Ip, K. Takahashi, R.A. Ezekowitz, L.M. Stuart // *Immunol. Rev.* — 2009. — V.230, №1. — P.9–21. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00789.x.
27. Newton, K. Signaling in innate immunity and inflammation / K. Newton, V.M. Dixit // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* — 2012. — V.4, №3. — a006049. doi: 10.1101/cshperspect.a006049.

28. Takeuchi, O. Pattern recognition receptors and inflammation / O. Takeuchi, S. Akira // *Cell*. — 2010. — V.140, №6. — P.805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
29. Abbas, A.K. Cellular and Molecular Immunology / A.K. Abbas, A.H. Lichtman, Sh. Pillai. — 9th ed. — Philadelphia: Elsevier, 2017. — 608 p.
30. Matsui, T. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum / T. Matsui, M. Amagai // *Int. Immunol.* — 2015. — V.27, №6. — P.269–280. doi: 10.1093/intimm/dxv013.
31. Bowdish, D.M. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity / D.M. Bowdish, D.J. Davidson, R.E. Hancock // *Curr. Protein Pept. Sci.* — 2005. — V.6, №1. — P.35–51. doi: 10.2174/1389203053027494.
32. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms / M. Zasloff // *Nature*. — 2002. — V.415, №6870. — P.389–395. doi: 10.1038/415389a.
33. Netea, M.G. Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence / M.G. Netea // *Eur. J. Clin. Invest.* — 2013. — V.43, №8. — P.881–884. doi: 10.1111/eci.12132.
34. Li, J. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities / J. Li, D.R. Barreda, Y.A. Zhang, H. Boshra, A.E. Gelman, S. Lapatra, L. Tort, J.O. Sunyer // *Nat. Immunol.* — 2006. — V.7, №10. — P.1116–1124. doi: 10.1038/ni1389.
35. Nauseef, W.M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view / W.M. Nauseef // *Immunol. Rev.* — 2007. — V.219. — P.88–102. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x.
36. Sinyakov, M.S. Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish / M.S. Sinyakov, M. Dror, H.M. Zhevelev, S. Margel, R.R. Avtalion // *Vaccine*. — 2002. — V.20, №31–32. — P.3668–74. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00379-1.
37. Zimmerman, L.M. Phagocytic B cells in a reptile / L.M. Zimmerman, L.A. Vogel, K.A. Edwards, R.M. Bowden // *Biol. Lett.* — 2010. — V.6, №2. — P.270–273. doi: 10.1098/rsbl.2009.0692.
38. Parra, D. Pivotal advance: peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells / D. Parra, A.M. Rieger, J. Li, Y.A. Zhang, L.M. Randall, C.A. Hunter, D.R. Barreda, J.O. Sunyer // *J. Leukoc. Biol.* — 2012. — V.91, №4. — P.525–536. doi: 10.1189/jlb.0711372.
39. Caligiuri, M.A. Human natural killer cells / M.A. Caligiuri // *Blood*. — 2008. — V.112, №3. — P.461–469. doi: 10.1182/blood-2007-09-077438.
40. Hayday, A. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology / A. Hayday, E. Theodoridis, E. Ramsburg, J. Shires // *Nat. Immunol.* — 2001. — V.2, №11. — P.997–1003. doi: 10.1038/ni1101-997.
41. Wu, Y.L. $\gamma\delta$ T cells and their potential for immunotherapy / Y.L. Wu, Y.P. Ding, Y. Tanaka, L.W. Shen, C.H. Wei, N. Minato, W. Zhang // *Int. J. Biol. Sci.* — 2014. — V.10, №2. — P.119–135. doi: 10.7150/ijbs.7823.
42. O'Shea, J.J. Cytokines and autoimmunity / J.J. O'Shea, A. Ma, P. Lipsky // *Nat. Rev. Immunol.* — 2002. — V.2, №1. — P.37–45. doi: 10.1038/nri702.

43. Goodbourn, S. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures / S. Goodbourn, L. Didcock, R.E. Randall // *J. Gen. Virol.* — 2000. — V.81, Pt. 10. — P.2341–2364. doi: 10.1099/0022-1317-81-10-2341.
44. Taylor AW. Review of the activation of TGF-beta in immunity / A.W. Taylor // *J. Leukoc. Biol.* — 2009. — V.85, №1. — P.29–33. doi: 10.1189/jlb.0708415.
45. Cray, C. Acute phase response in animals: a review / C. Cray, J. Zaias, N.H. Altman // *Comp. Med.* — 2009. — V.59, №6. — P.517–526.
46. Boyden SV. Natural antibodies and the immune response / S.V. Boyden // *Adv. Immunol.* — 1966. — V.5. — P.1–28. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60271-0.
47. Maddur, M.S. Natural Antibodies: from First-Line Defense Against Pathogens to Perpetual Immune Homeostasis / M.S. Maddur, S. Lacroix-Desmazes, J.D. Dimitrov, M.D. Kazatchkine, J. Bayry, S.V. Kaveri // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* — 2020. — V.58, №2. — P.213–228. doi: 10.1007/s12016-019-08746-9.
48. Holodick, N.E. Defining Natural Antibodies / N.E. Holodick, N. Rodríguez-Zhurbenko, A.M. Hernández // *Front. Immunol.* — 2017. — V.8. — 872. doi: 10.3389/fimmu.2017.00872.
49. Dunkelberger, J.R. Complement and its role in innate and adaptive immune responses / J.R. Dunkelberger, W.C. Song // *Cell Res.* — 2010. — V.20, №1. — P.34–50. doi: 10.1038/cr.2009.139.
50. Kang, Y.H. Target pattern recognition by complement proteins of the classical and alternative pathways / Y.H. Kang, L.A. Tan, M.V. Carroll, M.E. Gentle, R.B. Sim // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2009. — V.653. — P.117–128. doi: 10.1007/978-1-4419-0901-5_8.
51. Irwin, D.M. Evolution of the mammalian lysozyme gene family / D.M. Irwin, J.M. Biegel, C.B. Stewart // *BMC Evol. Biol.* — 2011. — V.11. — 166. doi: 10.1186/1471-2148-11-166.
52. Patrulea, V. An Update on Antimicrobial Peptides (AMPs) and Their Delivery Strategies for Wound Infections / V. Patrulea, G. Borchard, O. Jordan // *Pharmaceutics.* — 2020. — V.12, №9. — 840. doi: 10.3390/pharmaceutics12090840.
53. Gomes, A. Wound-Healing Peptides for Treatment of Chronic Diabetic Foot Ulcers and Other Infected Skin Injuries / A. Gomes, C. Teixeira, R. Ferraz, C. Prudêncio, P. Gomes // *Molecules.* — 2017. — V.22, №10. — 1743. doi: 10.3390/molecules22101743.
54. Mangoni, M.L. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations / M.L. Mangoni, A.M. McDermott, M. Zasloff // *Exp. Dermatol.* — 2016. — V.25, №3. — P.167–173. doi: 10.1111/exd.12929.
55. Holani, R. Proline-arginine rich (PR-39) cathelicidin: Structure, expression and functional implication in intestinal health / R. Holani, C. Shah, Q. Haji, G.D. Inglis, R.R.E. Uwiera, E.R. Cobo // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* — 2016. — V.49. — P.95–101. doi: 10.1016/j.cimid.2016.10.004.
56. Jenssen, H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R.E. Hancock // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2006. — V.19, №3. — P.491–511. doi: 10.1128/CMR.00056-05.
57. Perumal, P. Antimicrobial peptides: the role of hydrophobicity in the alpha helical structure / P. Perumal, V.P. Pandey // *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* — 2013. — V.1, №2 — P.39–53.

58. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете / В.Н. Кокряков. — СПб : Наука, 2006. — 261 с.
59. Chaudhuri, D. Using backbone-cyclized Cys-rich polypeptides as molecular scaffolds to target protein-protein interactions / D. Chaudhuri, T. Aboye, J.A. Camarero // *Biochem. J.* — 2019. — V.476, №1. — P.67–83. doi: 10.1042/BCJ20180792.
60. Jiang, Y. Antifungal activity of recombinant mouse beta-defensin 3 / Y. Jiang, Y. Wang, B. Wang, D. Yang, K. Yu, X. Yang, F. Liu, Z. Jiang, M. Li // *Lett. Appl. Microbiol.* — 2010. — V.50, №5. — P.468–473. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02824.x.
61. Lehrer, R.I. Multispecific myeloid defensins / R.I. Lehrer // *Curr. Opin. Hematol.* — 2007. — V.14, №1. — P.16–21. doi: 10.1097/00062752-200701000-00005.
62. Tang, Y.Q. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins / Y.Q. Tang, J. Yuan, G. Osapay, K. Osapay, D. Tran, C.J. Miller, A.J. Ouellette, M.E. Selsted // *Science.* — 1999. — V.286, №5439. — P.498–502. doi: 10.1126/science.286.5439.498.
63. Conibear, A.C. Insights into the molecular flexibility of θ -defensins by NMR relaxation analysis / A.C. Conibear, C.K. Wang, T. Bi, K.J. Rosengren, J.A. Camarero, D.J. Craik // *J. Phys. Chem. B.* — 2014 — V.118, №49 — P.14257–14266. doi: 10.1021/jp507754c.
64. Li, Y. Full Sequence Amino Acid Scanning of θ -Defensin RTD-1 Yields a Potent Anthrax Lethal Factor Protease Inhibitor / Y. Li, A. Gould, T. Aboye, T. Bi, L. Breindel, A. Shekhtman, J.A. Camarero // *J. Med. Chem.* 2017. — V.60, №5. — P.1916–1927. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01689.
65. Alford, M.A. Cathelicidin Host Defense Peptides and Inflammatory Signaling: Striking a Balance / M.A. Alford, B. Baquir, F.L. Santana, E.F. Haney, R.E.W. Hancock // *Front. Microbiol.* — 2020. — V.11. — 1902. doi: 10.3389/fmicb.2020.01902.
66. Zanetti, M. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain / M. Zanetti, R. Gennaro, D. Romeo // *FEBS Lett.* — 1995. — V.374. — P.1–5.
67. Zaiou, M. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics / M. Zaiou, R.L. Gallo // *J. Mol. Med.* — 2002. — V.80, №9. — P.549–561.
68. Choi, M.K. Genome-level identification, gene expression, and comparative analysis of porcine β -defensin genes / M.K. Choi, M.T. Le, D.T. Nguyen, H. Choi, W. Kim, J.H. Kim, J. Chun, J. Hyeon, K. Seo, C. Park // *BMC Genet.* — 2012. — V.13. — 98. doi: 10.1186/1471-2156-13-98.
69. Gennaro, R. Purification Composition and Activity of two Bactenicins Antibacterial Peptides of Bovine Neutrophils / R. Gennaro, B. Skerlavaj, D. Romeo // *Infect. Immun.* — 1989. — V.57. — P.3142–3146. doi: 10.1128/iai.57.10.3142-3146.1989.
70. Agerberth, B. Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides/ B. Agerberth, J.Y. Lee, T. Bergman, M. Carlquist, H.G. Boman, V. Mutt, H. Jörnvall // *Eur. J. Biochem.* — 1991. — V.202, №3. — P.849–854. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16442.x.

71. Huttner, K.M. Localization and genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes / K.M. Huttner, M.R. Lambeth, H.R. Burkin, D.J. Burkin, T.E. Broad // *Gene*. — 1998. — V.206, №1. — P.85–91. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00569-6.
72. Shamova, O. Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes / O. Shamova, K.A. Brogden, C. Zhao, T. Nguyen, V.N. Kokryakov, R.I. Lehrer // *Infect. Immun.* — 1999. — V. 67, №8. — P.4106–4111. doi: 10.1128/iai.67.8.4106-4111.1999.
73. Mardirossian, M. The Dolphin Proline-Rich Antimicrobial Peptide Tur1A Inhibits Protein Synthesis by Targeting the Bacterial Ribosome / M. Mardirossian, N. Pérébasquine, M. Benincasa, S. Gambato, S. Hofmann, P. Huter, C. Müller, K. Hilpert, C.A. Innis, A. Tossi, D.N. Wilson // *Cell Chem. Biol.* — 2018. — V.25, №5. — P.530–539.e7. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.02.004.
74. Baggiolini, M. Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. Ultrastructure of circulating and maturing cells / M. Baggiolini, U. Horisberger, R. Gennaro, B. Dewald // *Lab. Invest.* — 1985. — V.52, №2. — P.151–158.
75. Stensvåg, K. Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus* / K. Stensvåg, T. Haug, S.V. Sperstad, O. Rekdal, B. Indrevoll, O.B. Styrvold // *Dev. Comp. Immunol.* — 2008. — V.32, №3. — P.275–285. doi: 10.1016/j.dci.2007.06.002.
76. Bulet, P. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution / P. Bulet, J.L. Dimarcq, C. Hetru, M. Lagueux, M. Charlet, G. Hegy, A. Van Dorsselaer, J.A. Hoffmann // *J. Biol. Chem.* — 1993. — V.268, №20. — P.14893–14897.
77. Casteels, P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees / P. Casteels, C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, P. Tempst // *EMBO J.* — 1989. — V.8, №8. — P.2387–2391.
78. Casteels, P. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*) / P. Casteels, C. Ampe, L. Riviere, J. Van Damme, C. Elicone, M. Fleming, F. Jacobs, P. Tempst // *Eur. J. Biochem.* — 1990. — V.187, №2. — P.381–386. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15315.x.
79. Chernysh, S. The inducible antibacterial peptides of the Hemipteran insect *Palomena prasina*: Identification of a unique family of prolinerich peptides and of a novel insect defensin / S. Chernysh, S. Cociancich, J.-P. Briand, C. Hetru, P. Bulet // *Journal of Insect Physiology*. — 1996. — V.42, №1. — P.81–89. doi:10.1016/0022-1910(95)00085-2.
80. Cociancich, S. Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus* / S. Cociancich, A. Dupont, G. Hegy, R. Lanot, F. Holder, C. Hetru, J.A. Hoffmann, P. Bulet // *Biochem. J.* — 1994. — V.300, Pt.2. — P.567–575. doi: 10.1042/bj3000567.
81. Knappe, D. Oncocin (VDKPPYLPRPRPPRIYNR-NH₂): a novel antibacterial peptide optimized against gram-negative human pathogens / D. Knappe, S. Piantavigna, A. Hansen, A. Mechler, A. Binas, O. Nolte, L.L. Martin, R. Hoffmann // *J. Med. Chem.* — 2010. — V.53, №14. — P.5240–5247. doi: 10.1021/jm100378b.
82. Schneider, M. Differential infectivity of two *Pseudomonas* species and the immune response in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Insecta: Hemiptera) / M. Schneider, A. Dorn // *J. Invertebr. Pathol.* — 2001. — V.78, №3. — P.135–140. doi: 10.1006/jipa.2001.5054.

83. Brogden K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? / K.A. Brogden // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2005. — V.3, №3. — P.238–250. doi: 10.1038/nrmicro1098.
84. Casteels, P. Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity / P. Casteels, P. Tempst // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1994. — V.199, №1. — P.339–345. doi: 10.1006/bbrc.1994.1234.
85. Castle, M. Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets / M. Castle, A. Nazarian, S.S. Yi, P. Tempst // *J. Biol. Chem.* — 1999. — V.274, №46. — P.32555–32564. doi: 10.1074/jbc.274.46.32555.
86. Otvos, L. Jr. The short proline-rich antibacterial peptide family / L. Otvos Jr. // *Cell. Mol. Life. Sci.* — 2002. — V.59, №7. — P.1138–1150. doi: 10.1007/s00018-002-8493-8.
87. Scocchi, M. Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action / M. Scocchi, A. Tossi, R. Gennaro // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2011. — V.68, №13. — P.2317–2330. doi: 10.1007/s00018-011-0721-7.
88. Runti, G. Functional characterization of SbmA, a bacterial inner membrane transporter required for importing the antimicrobial peptide Bac7(1-35) / G. Runti, C. Lopez Ruiz Mdel, T. Stoilova, R. Hussain, M. Jennions, H.G. Choudhury, M. Benincasa, R. Gennaro, K. Beis, M. Scocchi // *J. Bacteriol.* — 2013. — V.195, №23. — P.5343–5351. doi: 10.1128/JB.00818-13.
89. Otvos, L. Jr. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides / L. Otvos Jr., I. O. M.E. Rogers, P.J. Consolvo, B.A. Condie, S. Lovas, P. Bulet, M. Blaszczyk-Thurin // *Biochemistry.* — 2000. — V.39, №46. — P.14150–14159. doi: 10.1021/bi0012843.
90. Scocchi, M. The Proline-rich Antibacterial Peptide Bac7 Binds to and Inhibits in vitro the Molecular Chaperone DnaK / M. Scocchi, C. Lüthy, P. Decarli, G. Mignogna, P. Christen, R. Gennaro // *Int. J. Pept. Res. Therapeut.* — 2009. — V.15, №2. — P.147–155. doi: 10.1007/s10989-009-9182-3.
91. Knappe, D. Rational design of oncocin derivatives with superior protease stabilities and antibacterial activities based on the high-resolution structure of the oncocin-DnaK complex / D. Knappe, M. Zahn, U. Sauer, G. Schiffer, N. Sträter, R. Hoffmann // *Chembiochem.* — 2011. — V.12, №6. — P.874–876. doi: 10.1002/cbic.201000792.
92. Zahn, M. Structural studies on the forward and reverse binding modes of peptides to the chaperone DnaK / M. Zahn, N. Berthold, B. Kieslich, D. Knappe, R. Hoffmann, N. Sträter // *J. Mol. Biol.* — 2013. — V.425, № 14. — P.2463–2479. doi: 10.1016/j.jmb.2013.03.041.
93. Zahn, M. Structural identification of DnaK binding sites within bovine and sheep bactenecin Bac7 / M. Zahn, B. Kieslich, N. Berthold, D. Knappe, R. Hoffmann, N. Sträter // *Protein Pept. Lett.* — 2014. — V.21. — P.407–412. doi: 10.2174/09298665113206660111.
94. Krizsan, A. Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70S ribosome / A. Krizsan, D. Volke, S. Weinert, N. Sträter, D. Knappe, R. Hoffmann // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2014. — V.53, №45. — P.12236–12239. doi: 10.1002/anie.201407145.
95. Mardirossian, M. The host antimicrobial peptide Bac71-35 binds to bacterial ribosomal proteins and inhibits protein synthesis / M. Mardirossian, R. Grzela, C. Giglione, T. Meinnel, R. Gennaro, P.

- Mergaert, M. Scocchi // *Chem. Biol.* — 2014. — V.21. — P.1639–1647. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.10.009.
96. Roy, R.N. The mechanism of inhibition of protein synthesis by the proline-rich peptide oncocin / R.N. Roy, I.B. Lomakin, M.G. Gagnon, T.A. Steitz // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2015. — V.22, №6. — P.466–469. doi: 10.1038/nsmb.3031.
97. Seefeldt, A.C. The proline-rich antimicrobial peptide Onc112 inhibits translation by blocking and destabilizing the initiation complex / A.C. Seefeldt, F. Nguyen, S. Antunes, N. Pérébasquine, M. Graf, S. Arenz, K.K. Inampudi, C. Douat, G. Guichard, D.N. Wilson, C.A. Innis // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2015. — V.22, №6. — P.470–475. doi: 10.1038/nsmb.3034.
98. Gagnon, M.G. Structures of proline-rich peptides bound to the ribosome reveal a common mechanism of protein synthesis inhibition / M.G. Gagnon, R.N. Roy, I.B. Lomakin, T. Florin, A.S. Mankin, T.A. Steitz // *Nucleic Acids Res.* — 2016. — V.44, № 5. — P.2439–2450. doi: 10.1093/nar/gkw018.
99. Seefeldt, A.C. Structure of the mammalian antimicrobial peptide Bac7(1-16) bound within the exit tunnel of a bacterial ribosome / A.C. Seefeldt, M. Graf, N. Pérébasquine, F. Nguyen, S. Arenz, M. Mardirossian, M. Scocchi, D.N. Wilson, C.A. Innis // *Nucleic Acids Res.* — 2016. — V.44, № 5. — P.2429–2438. doi: 10.1093/nar/gkv1545.
100. Florin, T. An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome / T. Florin, C. Maracci, M. Graf, P. Karki, D. Klepacki, O. Berninghausen, R. Beckmann, N. Vázquez-Laslop, D.N. Wilson, M.V. Rodnina, A.S. Mankin // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2017. — V.24, №9. — P.752–757. doi: 10.1038/nsmb.3439.
101. Kunda, N.K. Antimicrobial peptides as novel therapeutics for non-small cell lung cancer / N.K. Kunda // *Drug Discov. Today.* — 2020. — V.25. — P.238–247. doi: 10.1016/j.drudis.2019.11.012.
102. Falanga, A. Membranotropic peptides mediating viral entry / A. Falanga, M. Galdiero, G. Morelli, S. Galdiero // *Pept. Sci.* — 2018. — V.110. — e24040. doi: 10.1002/pep2.24040.
103. Giuliani, A. Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics / A. Giuliani // *Cent. Eur. J. Biol.* — 2007. — V.2. — P.1–33. doi: 10.2478/s11535-007-0010-5.
104. Baxter, A.A. Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: Novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects / A.A. Baxter, F.T. Lay, I.K.H. Poon, M. Kvensakul, M.D. Hulett // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2017. — V.74. — P.3809–3825. doi: 10.1007/s00018-017-2604-z.
105. Sitaram, N. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: Structural and charge requirements for activity / N. Sitaram, R. Nagaraj // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1999. — V.1462. — P.29–54. doi: 10.1016/S0005-2736(99)00199-6.
106. Ebenhan, T. Antimicrobial peptides: Their role as infection-selective tracers for molecular imaging / T. Ebenhan, O. Gheysens, H.G. Kruger, J.R. Zeevaart, M.M. Sathekge // *BioMed Res. Int.* — 2014. — V.2014. — 867381. doi: 10.1155/2014/867381.

107. Piotrowska, U. Current state of a dual behaviour of antimicrobial peptides-therapeutic agents and promising delivery vectors / U. Piotrowska, M. Sobczak, E. Oledzka // *Chem. Biol. Drug Des.* — 2017. — V.90. — P.1079–1093. doi: 10.1111/cbdd.13031.
108. Ruan, Y. Antimicrobial peptide LL-37 attenuates LTA induced inflammatory effect in macrophages / Y. Ruan, T. Shen, Y. Wang, M. Hou, J. Li, T. Sun // *Int. Immunopharmacol.* — 2013. — V.15. — P.575–580. doi: 10.1016/j.intimp.2013.01.012.
109. Shang, D. The effects of lps on the activity of trp-containing antimicrobial peptides against gram-negative bacteria and endotoxin neutralization / D. Shang, Q. Zhang, W. Dong, H. Liang, X. Bi // *Acta Biomater.* — 2016. — V.33. — P.153–165. doi: 10.1016/j.actbio.2016.01.019.
110. Hancock, R.E. Peptide antibiotics / R.E. Hancock // *Lancet.* — 1997. — V.349. — P.418–422. doi: 10.1016/S0140-6736(97)80051-7.
111. Артамонов, А.Ю. Биологическая активность и молекулярно-клеточные механизмы действия антимикробных пептидов человека и животных / А.Ю. Артамонов, Е.Г. Рыбакина, Д.С. Орлов, Е.А. Корнева // *Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина (Серия 11).* — 2014. — №1. — С.5–25.
112. Schäfer, A.B. A How-To Guide for Mode of Action Analysis of Antimicrobial Peptides / A.B. Schäfer, M. Wenzel // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* — 2020. — V.10. — 540898. doi: 10.3389/fcimb.2020.540898.
113. Mihajlovic, M. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores / M. Mihajlovic, T. Lazaridis // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2010. — V.1798, №8. — P.1485–1493. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.04.004.
114. Ciumac, D. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides / D. Ciumac, H. Gong, X. Hu, J.R. Lu // *J. Colloid Interface Sci.* — 2019 — V.537 — P.163–185. doi: 10.1016/j.jcis.2018.10.103.
115. Miteva, M. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin / M. Miteva, M. Andersson, A. Karshikoff, G. Otting // *FEBS Lett.* — 1999. — V.462, №1-2. — P.155–158. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01520-3.
116. Pokorny, A. Kinetics of dye efflux and lipid flip-flop induced by delta-lysin in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, alpha-helical peptides / A. Pokorny, P.F. Almeida // *Biochemistry.* — 2004. — V.43, №27. — P.8846–8857. doi: 10.1021/bi0497087.
117. Chan, D.I. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action / D.I. Chan, E.J. Prenner, H.J. Vogel // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2006. — V.1758, №9. — P.1184–1202. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.04.006.
118. Wimley, W.C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model / W.C. Wimley // *ACS Chem. Biol.* — 2010. — V.5, №10. — P.905–917. doi: 10.1021/cb1001558.

119. Teixeira, V. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes / V. Teixeira, M.J. Feio, M. Bastos // *Prog. Lipid Res.* — 2012. — V. 51, №2. — P.149–177. doi: 10.1016/j.plipres.2011.12.005.
120. Liu, S. Bacterial Persister-Cells and Spores in the Food Chain: Their Potential Inactivation by Antimicrobial Peptides (AMPs) / S. Liu, S. Brul, S.A.J. Zaat // *Int. J. Mol. Sci.* — 2020. — V.21, №23. — 8967. doi: 10.3390/ijms21238967.
121. Borrelli, A. Cell penetrating peptides as molecular carriers for anti-cancer agents / A. Borrelli, A.L. Tornesello, M.L. Tornesello, F.M. Buonaguro // *Molecules.* — 2018. — V.23. — 295. doi: 10.3390/molecules23020295.
122. Last, N.B. A common landscape for membrane-active peptides / N.B. Last, D.E. Schlamadinger, A.D. Miranker // *Protein Sci.* — 2013. — V.22. — P.870–882. doi: 10.1002/pro.2274.
123. Sale, A.J. Effects of high electric fields on micro-organisms. 3. Lysis of erythrocytes and protoplasts / A.J. Sale, W.A. Hamilton // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1968. — V.163, №1. — P.37–43. doi: 10.1016/0005-2736(68)90030-8.
124. Neumann, E. The electroporation hysteresis / E. Neumann // *Ferroelectrics.* — 1988. — V.86, №1. — P.325–333. doi: 10.1080/00150198808227023.
125. Grein, F. Docking on lipid II—a widespread mechanism for potent bactericidal activities of antibiotic peptides / F. Grein, T. Schneider, H.G. Sahl // *J. Mol. Biol.* — 2019. — V.431. — P.3520–3530. doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.014.
126. de Leeuw, E. Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II / E. de Leeuw, C. Li, P. Zeng, C. Li, M. Diepeveen-de Buin, W.Y. Lu, E. Breukink, W.Lu // *FEBS Lett.* — 2010. — V.584, №8. — P.1543–1548. doi: 10.1016/j.febslet.2010.03.004.
127. Sass, V. Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in staphylococci / V. Sass, T. Schneider, M. Wilmes, C. Körner, A. Tossi, N. Novikova, O. Shamova, H.G. Sahl // *Infect. Immun.* — 2010. — V.78, №6. — P.2793–2800. doi: 10.1128/IAI.00688-09.
128. Subbalakshmi, C. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin / C. Subbalakshmi, N. Sitaram // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1998. — V.160, №1. — P.91–96. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12896.x.
129. He, S.W. A TFPI-1 peptide that induces degradation of bacterial nucleic acids, and inhibits bacterial and viral infection in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* / S.W. He, J. Zhang, N.Q. Li, S. Zhou, B. Yue, M. Zhang // *Fish Shellfish Immunol.* — 2017. — V.60. — P.466–473. doi: 10.1016/j.fsi.2016.11.029.
130. Kim, J.Y. Human fungal pathogens: Why should we learn? / J.Y. Kim // *J. Microbiol.* — 2016. — V.54, №3. — P.145–148. doi: 10.1007/s12275-016-0647-8.
131. Menzel, L.P. Potent in vitro and in vivo antifungal activity of a small molecule host defense peptide mimic through a membrane-active mechanism / L.P. Menzel, H.M. Chowdhury, J.A. Masso-Silva, W. Ruddick, K. Falkovsky, R. Vorona, A. Malsbary, K. Cherabuddi, L.K. Ryan, K.M. DiFranco, D.C. Brice, M.J. Costanzo, D. Weaver, K.B. Freeman, R.W. Scott, G. Diamond // *Sci. Rep.* — 2017. — V.7, №1. — 4353. doi: 10.1038/s41598-017-04462-6.

132. Ordonez, S.R. Fungicidal mechanisms of cathelicidins LL-37 and CATH-2 revealed by live-cell imaging / S.R. Ordonez, I.H. Amarullah, R.W. Wubbolts, E.J. Veldhuizen, H.P. Haagsman // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2014. — V.58, №4. — P.2240–2248. doi: 10.1128/AAC.01670-13.
133. den Hertog, A.L. Candidacidal effects of two antimicrobial peptides: histatin 5 causes small membrane defects, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane / A.L. den Hertog, J. van Marle, H.A. van Veen, W. Van't Hof, J.G. Bolscher, E.C. Veerman, A.V. Nieuw Amerongen // *Biochem. J.* — 2005. — V.388, Pt. 2. — P.689–695. doi: 10.1042/BJ20042099.
134. Puri, S. How does it kill?: understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5 / S. Puri, M. Edgerton // *Eukaryot. Cell.* — 2014. — V.13, №8. — P.958–964. doi: 10.1128/EC.00095-14.
135. Brice, D.C. LL-37 disrupts the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus envelope and inhibits infection in oral epithelial cells / D.C. Brice, Z. Toth, G. Diamond // *Antiviral Res.* — 2018. — V.158. — P.25–33. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.07.025.
136. Pachón-Ibáñez, M.E. Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides / M.E. Pachón-Ibáñez, Y. Smani, J. Pachón, J. Sánchez-Céspedes // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2017. — V.41, №3. — P.323–342. doi: 10.1093/femsre/fux012.
137. Sousa, F.H. Cathelicidins display conserved direct antiviral activity towards rhinovirus / F.H. Sousa, V. Casanova, F. Findlay, C. Stevens, P. Svoboda, J. Pohl, L. Proudfoot, P.G. Barlow // *Peptides.* — 2017. — V.95. — P.76–83. doi: 10.1016/j.peptides.2017.07.013.
138. Tenge, V.R. Delineation of interfaces on human alpha-defensins critical for human adenovirus and human papillomavirus inhibition / V.R. Tenge, A.P. Gounder, M.E. Wiens, W. Lu, J.G. Smith // *PLoS Pathog.* — 2014. — V.10, №9. — e1004360. doi: 10.1371/journal.ppat.1004360.
139. Wang, A. Enhancement of antiviral activity of human alpha-defensin 5 against herpes simplex virus 2 by arginine mutagenesis at adaptive evolution sites / A. Wang, F. Chen, Y. Wang, M. Shen, Y. Xu, J. Hu, S. Wang, F. Geng, C. Wang, X. Ran, Y. Su, T. Cheng, J. Wang // *J. Virol.* — 2013. — V.87, №5. — P.2835–2845. doi: 10.1128/JVI.02209-12.
140. Furci, L. Alpha-defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4 / L. Furci, F. Sironi, M. Tolazzi, L. Vassena, P. Lusso // *Blood.* — 2007. — V.109, №7. — P.2928–2935. doi: 10.1182/blood-2006-05-024489.
141. Siczekarski, S.B. Role of protein kinase C betaII in influenza virus entry via late endosomes / S.B. Siczekarski, H.A. Brown, G.R. Whittaker // *J. Virol.* — 2003. — V.77, №1. — P.460–469. doi: 10.1128/jvi.77.1.460-469.2003.
142. Doss, M. Hapivirins and diprovirins: novel θ -defensin analogs with potent activity against influenza A virus / M. Doss, P. Ruchala, T. Tecle, D. Gantz, A. Verma, A. Hartshorn, E.C. Crouch, H. Luong, E.D. Micewicz, R.I. Lehrer, K.L. Hartshorn // *J. Immunol.* — 2012. — V.188, №6. — P.2759–2768. doi: 10.4049/jimmunol.1101335.
143. Hashim, D. The global decrease in cancer mortality: trends and disparities / D. Hashim, P. Boffetta, C. La Vecchia, M. Rota, P. Bertuccio, M. Malvezzi, E. Negri // *Ann. Oncol.* — 2016. — V.27. — P.926–933. doi: 10.1093/annonc/mdw027.

144. Torre, L.A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update / L.A. Torre, R.L. Siegel, E.M. Ward, A. Jemal // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* — 2016. — V.25. — P.16–27. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578.
145. Saxena, A. Cancer chemotherapy and its side effect management / A. Saxena // *Nurs J. India.* — 2006. — V.97. — P.109–110.
146. Steckbeck, J.D. Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? / J.D. Steckbeck, B. Deslouches, R.C. Montelaro // *Expert. Opin. Biol. Ther.* — 2014. — V.14. — P.11–14. doi: 10.1517/14712598.2013.844227.
147. Mangoni, M.L. Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H / M.L. Mangoni, N. Papo, J.M. Saugar, D. Barra, Y. Shai, M. Simmaco, L. Rivas // *Biochemistry.* — 2006. — V.45. — P.4266–4276. doi: 10.1021/bi052150y.
148. Papo, N. Inhibition of tumor growth and elimination of multiple metastases in human prostate and breast xenografts by systemic inoculation of a host defense-like lytic peptide / N. Papo, D. Seger, A. Makovitzki, V. Kalchenko, Z. Eshhar, H. Degani, Y. Shai // *Cancer Res.* — 2006. — V.66. — P.5371–5378. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4569.
149. Kenis, H. Targeting phosphatidylserine in anti-cancer therapy / H. Kenis, C. Reutelingsperger // *Curr. Pharm. Des.* — 2009. — V.15. — P.2719–2723. doi: 10.2174/138161209788923903.
150. Bevers, E.M. Getting to the Outer Leaflet: Physiology of Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane / E.M. Bevers, P.L. Williamson // *Physiol. Rev.* — 2016. — V.96. — P.605–645. doi: 10.1152/physrev.00020.2015.
151. Connor, J. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells / J. Connor, C.C Pak, A.J. Schroit // *J. Biol. Chem.* — 1994. — V.269. — P.2399–2404.
152. Utsugi, T. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes / T. Utsugi, A.J. Schroit, J. Connor, C.D. Bucana, I.J. Fidler // *Cancer Res.* — 1991. — V.51. — P.3062–3066.
153. Lee, S.H. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm / S.H. Lee, X.W. Meng, K.S. Flatten, D.A. Loegering, S.H. Kaufmann // *Cell Death Differ.* — 2013. — V.20. — P.64–76. doi: 10.1038/cdd.2012.93.
154. Fadnes, B. The anticancer activity of lytic peptides is inhibited by heparan sulfate on the surface of the tumor cells / B. Fadnes, O. Rekdal, L. Uhlin-Hansen // *BMC Cancer.* — 2009. — V.9. — P.183. doi: 10.1186/1471-2407-9-183.
155. Sok, M. Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer / M. Sok, M. Sentjurs, M. Schara, J. Stare, T. Rott // *Ann. Thorac. Surg.* — 2002. — V.73. — P.1567–1571. doi: 10.1016/s0003-4975(02)03458-6.
156. Berger, M. Membrane fluidity and adherence to extracellular matrix components are related to blast cell count in acute myeloid leukemia / M. Berger, C. Motta, N. Boiret, B. Aublet-Cuvelier, J.

- Bonhomme, P. Travade // *Leukem. & lymphom.* — 1994. — V.15. — P.297–302. doi: 10.3109/10428199409049727.
157. Li, X. Antitumor effects of cecropin B-LHRH' on drug-resistant ovarian and endometrial cancer cells / X. Li, B. Shen, Q. Chen, X. Zhang, Y. Ye, F. Wang, X. Zhang // *BMC Cancer.* — 2016. — V.16. — 251. doi: 10.1186/s12885-016-2287-0.
158. Suttman, H. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells / H. Suttman, M. Retz, F. Paulsen, J. Harder, U. Zwergel, J. Kamradt, B. Wullich, G. Unteregger, M. Stockle, J. Lehmann // *BMC Urol.* — 2008. — V.8. — 5. doi: 10.1186/1471-2490-8-5.
159. Liu, Y. Lovastatin enhances adenovirus-mediated TRAIL induced apoptosis by depleting cholesterol of lipid rafts and affecting CAR and death receptor expression of prostate cancer cells / Y. Liu, L. Chen, Z. Gong, L. Shen, C. Kao, J.M. Hock, L. Sun, X. Li // *Oncotarget.* — 2015. — V.6. — P.3055–3070. doi: 10.18632/oncotarget.3073.
160. Zhuang, L. Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells / L. Zhuang, J. Lin, M.L. Lu, K.R. Solomon, M.R. Freeman // *Cancer Res.* — 2002. — V.62. — P.2227–2231.
161. Mulder, K.C. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides / K.C. Mulder, L.A. Lima, V.J. Miranda, S.C. Dias, O.L. Franco // *Front. Microbiol.* — 2013. — V.4. — 321. doi: 10.3389/fmicb.2013.00321.
162. Chan, S.C. Enhancement of the cytolytic effect of anti-bacterial cecropin by the microvilli of cancer cells / S.C. Chan, L. Hui, H.M. Chen // *Anticancer Res.* — 1998. — V.18. — P.4467–4474.
163. Ma, R. In Vitro and MD Simulation Study to Explore Physicochemical Parameters for Antibacterial Peptide to Become Potent Anticancer Peptide / R. Ma, S.W. Wong, L. Ge, C. Shaw, S.W.I. Siu, H.F. Kwok // *Mol. Ther. Oncolytics.* — 2019. — V.16. — P.7–19. doi: 10.1016/j.omto.2019.12.001.
164. Cruciani, R.A. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation / R.A. Cruciani, J.L. Barker, M. Zasloff, H.C. Chen, O. Colamonici // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1991. — V.88, №9. — P.3792–3796. doi: 10.1073/pnas.88.9.3792.
165. Westerhoff, H.V. Interactions between a new class of eukaryotic antimicrobial agents and isolated rat liver mitochondria / H.V. Westerhoff, R.W. Hendler, M. Zasloff, D. Juretić // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1989. — V.975. — P.361–369. doi: 10.1016/S0005-2728(89)80344-5.
166. Domingues, T.M. Revealing the lytic mechanism of the antimicrobial peptide gomesin by observing giant unilamellar vesicles / T.M. Domingues, K.A. Riske, A. Miranda // *Langmuir.* — 2010. — V.26. — P.11077–11084. doi: 10.1021/la100662a.
167. Rodrigues, E.G. Effective topical treatment of subcutaneous murine B16F10-Nex2 melanoma by the antimicrobial peptide gomesin / E.G. Rodrigues, A.S. Dobroff, C.F. Cavarsan, T. Paschoalin, L. Nimrichter, R.A. Mortara, E.L. Santos, M.A. Fázio, A. Miranda, S. Daffre, L.R. Travassos // *Neoplasia.* — 2008. — V.10. — P.61–68. doi: 10.1593/neo.07885.

168. Haug, B.E. The role of tryptophan in the antibacterial activity of a 15-residue bovine lactoferricin peptide / B.E. Haug, J.S. Svendsen // *J. Pept. Sci.* — 2001. — V.7. — P.190–196. doi: 10.1002/psc.318.
169. Bellamy, W. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin / W. Bellamy, M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase, M. Tomita // *J. Appl. Bacteriol.* — 1992. — V.73. — P.472–479. doi: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb05007.x.
170. Yoo, Y.C. Bovine lactoferrin and Lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice / Y.C. Yoo, S. Watanabe, R. Watanabe, K. Hata, K. Shimazaki, I. Azuma // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 1998. — V.443. — P.285–291. doi: 10.1007/978-1-4757-9068-9_35.
171. Yoo, Y.C. Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species / Y.C. Yoo, R. Watanabe, Y. Koike, M. Mitobe, K. Shimazaki, S. Watanabe, I. Azuma // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1997. — V.237. — P.624–628. doi: 10.1006/bbrc.1997.7199.
172. Eliassen, L.T. Enhanced antitumour activity of 15-residue bovine lactoferricin derivatives containing bulky aromatic amino acids and lipophilic N-terminal modifications / L.T. Eliassen, B.E. Haug, G. Berge, O. Rekdal // *J. Pept. Sci.* — 2003. — V.9. — P.510–517. doi: 10.1002/psc.472.
173. Haug, B.E. Discovery of a 9-mer Cationic Peptide (LTX-315) as a Potential First in Class Oncolytic Peptide / B.E. Haug, K.A. Camilio, L.T. Eliassen, W. Stensen, J.S. Svendsen, K. Berg, B. Mortensen, G. Serin, JF Mirjolet, F Bichat, Ø. Rekdal // *J. Med. Chem.* — 2016. — V.59. — P.2918–2927. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b02025.
174. Zhou, H. The oncolytic peptide LTX-315 triggers immunogenic cell death / H. Zhou, S. Forveille, A. Sauvat, T. Yamazaki, L. Senovilla, Y. Ma, P. Liu, H. Yang, L. Bezu, K. Müller, L. Zitvogel, Ø. Rekdal, O. Kepp, G. Kroemer // *Cell Death Dis.* — 2016. — V.7. — e2134. doi: 10.1080/15384101.2015.1093710.
175. Han, Y. In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Pardaxin against Proliferation and Growth of Oral Squamous Cell Carcinoma / Y. Han, Z. Cui, Y.H. Li, W.H. Hsu, B.H. Lee // *Mar. Drugs.* — 2015. — V.14. — 2. doi: 10.3390/md14010002.
176. Tian, W. Suppression of tumor invasion and migration in breast cancer cells following delivery of siRNA against Stat3 with the antimicrobial peptide PR39 / W. Tian, B. Li, X. Zhang, W. Dang, X. Wang, H. Tang, L. Wang, H. Cao, T. Chen // *Oncol. Rep.* — 2012. — V.28. — P.1362–1368. doi: 10.3892/or.2012.1911.
177. Chertov, O. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils / O. Chertov, D.F. Michiel, L. Xu, J.M. Wang, K. Tani, W.J. Murphy, D.L. Longo, D.D. Taub, J.J. Oppenheim // *J. Biol. Chem.* — 1996. — V.271, №6. — P.2935–2940. doi: 10.1074/jbc.271.6.2935.
178. Choi, K.Y. Multiple immune-modulatory functions of cathelicidin host defense peptides / K.Y. Choi, N. Mookherjee // *Front. Immunol.* — 2012. — V.3. — 149. doi: 10.3389/fimmu.2012.00149.

179. Steinstraesser, L. Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality / L. Steinstraesser, U. Kraneburg, F. Jacobsen, S. Al-Benna // *Immunobiology*. — 2011. — V.216, №3. — P.322–333. doi: 10.1016/j.imbio.2010.07.003.
180. Lazzaro, B.P. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution / B.P. Lazzaro, M. Zasloff, J. Rolff // *Science*. — 2020. — V.368, №6490. — eaau5480. doi: 10.1126/science.aau5480
181. Tjabringa, G.S. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors / G.S. Tjabringa, D.K. Ninaber, J.W. Drijfhout, K.F. Rabe, P.S. Hiemstra // *Int. Arch. Allergy Immunol.* — 2006. — V.140. — P.103–112. doi: 10.1159/000092305.
182. Scott, M.G. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses / M.G. Scott, D.J. Davidson, M.R. Gold, D. Bowdish, R.E. Hancock // *J. Immunol.* — 2002. — V.169. — P.3883–3891. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.3883.
183. Hemshekhar, M. Host defense peptide LL-37-mediated chemoattractant properties, but not anti-inflammatory cytokine IL-1RA production, is selectively controlled by Cdc42 Rho GTPase via G protein-coupled receptors and JNK mitogen-activated protein kinase / M. Hemshekhar, K.G. Choi, N. Mookherjee // *Front. Immunol.* — 2018. — V.9. — 1871. doi: 10.3389/fimmu.2018.01871.
184. Stephan, A. LL37:DNA complexes provide antimicrobial activity against intracellular bacteria in human macrophages / A. Stephan, M. Batinica, J. Steiger, P. Hartmann, F. Zaucke, W. Bloch, M. Fabri // *Immunology*. — 2016. — V.148, №4. — P.420–432. doi: 10.1111/imm.12620.
185. Tewary, P. β -Defensin 2 and 3 promote the uptake of self or CpG DNA, enhance IFN- α production by human plasmacytoid dendritic cells, and promote inflammation / P. Tewary, G. de la Rosa, N. Sharma, L.G. Rodriguez, S.G. Tarasov, O.M. Howard, H. Shirota, F. Steinhagen, D.M. Klinman, D. Yang, J.J. Oppenheim // *J. Immunol.* — 2013. — V.191, №2. — P.865–874. doi: 10.4049/jimmunol.1201648.
186. Funderburg, N. Human α -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2 / N. Funderburg, M.M. Lederman, Z. Feng, M.G. Drage, J. Jadowsky, C.V. Harding, A. Weinberg, S.F. Sieg // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2007. — V.104, №47. — P.18631–18635. doi: 10.1073/pnas.0702130104.
187. Bandholtz, L. Antimicrobial peptide LL-37 internalized by immature human dendritic cells alters their phenotype / L. Bandholtz, G.J. Ekman, M. Vilhelmsson, E. Buentke, B. Agerberth, A. Scheynius, G.H. Gudmundsson // *Scand. J. Immunol.* — 2006. — V.63. — P.410–419. doi: 10.1111/j.1365-3083.2006.001752.x.
188. Findlay, E.G. Exposure to the anti-microbial peptide LL-37 produces dendritic cells optimised for immunotherapy / E.G. Findlay, A.J. Currie, A. Zhang, J. Ovcariakova, L. Young, H. Stevens, B.J. McHugh, M. Canel, M. Gray, S.W.F. Milling, J.D.M. Campbell, J. Savill, A. Serrels, D.J. Davidson // *Oncoimmunology*. — 2019. — V.8. — 1608106. doi: 10.1080/2162402X.2019.1608106.
189. Ganguly, D. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8 / D. Ganguly, G. Chamilos, R. Lande, J. Gregorio, S. Meller, V. Facchinetti, B. Homey, F.J. Barrat, T. Zal, M. Gilliet // *J. Exp. Med.* — 2009. — V.206. — P.1983–1994. doi: 10.1084/jem.20090480.

190. Kim, S.H. Cutting Edge: LL-37-Mediated Formyl Peptide Receptor-2 Signaling in Follicular Dendritic Cells Contributes to B Cell Activation in Peyer's Patch Germinal Centers / S.H. Kim, Y.N. Kim, Y.S. Jang // *J. Immunol.* — 2017. — V.198, №2. — P.629–633. doi: 10.4049/jimmunol.1600886.
191. Deng, Y.Y. Cathelicidin-related antimicrobial peptide modulates the severity of acute pancreatitis in mice / Y.Y. Deng, M. Shamoon, Y. He, M. Bhatia, J. Sun // *Mol. Med. Rep.* — 2016. — V.13, №5. — P.3881–3885. doi: 10.3892/mmr.2016.5008.
192. Yoshimura, T. The Antimicrobial Peptide CRAMP Is Essential for Colon Homeostasis by Maintaining Microbiota Balance / T. Yoshimura, M.H. McLean, A.K. Dzutsev, X. Yao, K. Chen, J. Huang, W. Gong, J. Zhou, Y. Xiang, J. H Badger, C. O'hUigin, V. Thovarai, L. Tessarollo, S.K. Durum, G. Trinchieri, X.W. Bian, J.M. Wang // *J. Immunol.* — 2018. — V.200, №6. — P.2174–2185. doi: 10.4049/jimmunol.1602073.
193. Kumar, P. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo / P. Kumar, J.N. Kizhakkedathu, S.K. Straus // *Biomolecules.* — 2018. — V.8, №1. — 4. doi: 10.3390/biom8010004.
194. Bahar, A.A. Antimicrobial peptides / A.A. Bahar, D. Ren // *Pharmaceuticals (Basel).* — 2013. — V.6, №12. — P.1543–1575. doi: 10.3390/ph6121543.
195. Band, V.I. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Resistance in Gram-Negative Bacteria / V.I. Band, D.S. Weiss // *Antibiotics (Basel).* — 2015. — V.4, №1. — P.18–41. doi: 10.3390/antibiotics4010018.
196. Wimley, W.C. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions / W.C. Wimley, K. Hristova // *J. Membr. Biol.* — 2011. — V.239, №1-2. — P.27–34. doi: 10.1007/s00232-011-9343-0.
197. Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides / Y. Shai // *Biopolymers.* — 2002. — V.66, №4. — P.236–248. doi: 10.1002/bip.10260.
198. Park, S.C. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation / S.C. Park, Y. Park, K.S. Hahm // *Int. J. Mol. Sci.* — 2011. — V.12, №9. — P.5971–5992. doi: 10.3390/ijms12095971.
199. Steenbergen, J.N. Effects of daptomycin in combination with other antimicrobial agents: a review of in vitro and animal model studies / J.N. Steenbergen, J.F. Mohr, G.M. Thorne // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2009. — V.64. — P.1130–1138. doi: 10.1093/jac/dkp346.
200. Wu, C.-L. Antimicrobial peptides display strong synergy with vancomycin against vancomycin-resistant *E. faecium*, *S. aureus*, and wild-type *E. coli* / C.-L. Wu, J.-Y. Hsueh, B.-S. Yip, Y.-H. Chih, K.-L. Peng, J.-W. Cheng // *Int. J. Mol. Sci.* — 2020. — V.21. — 4578. doi: 10.3390/ijms21134578.
201. Zharkova, M.S. Application of Antimicrobial Peptides of the Innate Immune System in Combination With Conventional Antibiotics-A Novel Way to Combat Antibiotic Resistance? / M.S. Zharkova, D.S. Orlov, O.Y. Golubeva, O.B. Chakchir, I.E. Eliseev, T.M. Grinchuk, O.V. Shamova // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* — 2019. — V.9. — E.128. doi: 10.3389/fcimb.2019.00128.

202. Chennupati, S.K. Effects of an LL-37-derived antimicrobial peptide in an animal model of biofilm *Pseudomonas sinusitis* / S.K. Chennupati, A.G. Chiu, E. Tamashiro, C.A. Banks, M.B. Cohen, B.S. Bleier, J.M. Kofonow, E. Tam, N.A. Cohen // *Am J Rhinol Allergy*. — 2009. — V.23, №1. — P.46–51. doi: 10.2500/ajra.2009.23.3261.
203. Segev-Zarko, L. Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides / L. Segev-Zarko, R. Saar-Dover, V. Brumfeld, M.L. Mangoni, Y. Shai // *Biochem. J*. — 2015. — V.468. — P.259–270. doi: 10.1042/BJ20141251.
204. Batoni, G. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria / G. Batoni, G. Maisetta, S. Esin // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr*. — 2016. — V.1858. — P.1044–1060. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.10.013.
205. Yu, K. Anti-adhesive antimicrobial peptide coating prevents catheter associated infection in a mouse urinary infection model / K. Yu, J.C. Lo, M. Yan, X. Yang, D.E. Brooks, R.E. Hancock, D. Lange, J.N. Kizhakkedathu // *Biomaterials*. — 2017. — V.116. — P.69–81. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.11.047.
206. Sierra, J.M. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development / J.M. Sierra, E. Fusté, F. Rabanal, T. Vinuesa, M. Viñas // *Expert Opin. Biol. Ther*. — 2017. — V.17, №6. — P.663–676. doi: 10.1080/14712598.2017.1315402.
207. Terwilligert, T.C. The structure of Melittin / T.C. Terwilligert, D. Eisenberg // *J. Biol. Chem*. — 1982. — V.257. — P.6016–6022.
208. Lee, G. Anti-inflammatory applications of melittin, a major component of bee venom: detailed mechanism of action and adverse effects / G. Lee, H. Bae // *Molecules*. — 2016. — V.21. — 616. doi: 10.3390/molecules21050616.
209. Son, D.J. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds / D.J. Son, J.W. Lee, Y.H. Lee, H.S. Song, C.K. Lee, J.T. Hong // *Pharmacol. Ther*. — 2007. — V.115. — P.246–270. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.04.004.
210. Alves, E.M. Pharmaceutical Composition Containin an Apitoxin Fraction and Use Thereof / E.M. Alves, L.G.D. Heneine, J.L. Pesquero, L.A. de Merlo. — Google Patents No: WO2011041865, published April 14, 2011.
211. Gajski, G. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties / G. Gajski, V. Garaj-Vrhovac // *Environ. Toxicol. Pharmacol*. — 2013. — V.36. — P.697–705. doi: 10.1016/j.etap.2013.06.009.
212. Memariani, H. Melittin: a venom-derived peptide with promising anti-viral properties / H. Memariani, M. Memariani, H. Moravvej, M. Shahidi-Dadras // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. — 2020. — V.39. — P.5–17. doi: 10.1007/s10096-019-03674-0.
213. Choi, J.H. Melittin, a honeybee venom derived antimicrobial peptide, may target methicillin resistant *Staphylococcus aureus* / J.H. Choi, A.Y. Jang, S. Lin, S. Lim, D. Kim, K. Park, S.M. Han, J.H. Yeo, H.S. Seo // *Mol. Med. Rep*. — 2015. — V.12, №5. — P.6483–6490. doi: 10.3892/mmr.2015.4275.

214. Sakamoto, I. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans / I. Sakamoto, M. Igarashi, K. Kimura, A. Takagi, T. Miwa, Y. Koga // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2001. — V.47. — P.709–710. doi: 10.1093/jac/47.5.709.
215. Mitra, D. The antiplaque efficacy of lantibiotic Nisin extract mouthrinse / D. Mitra, A. Yadav, S. Prithyani, L.E. John, S. Rodrigues, R. Shah // *J. Indian Soc. Periodontol.* — 2019. — V.23. — P.31–34. doi: 10.4103/jisp.jisp_326_18.
216. Greber, K.E. Antimicrobial Peptides Under Clinical Trials / K.E. Greber, M. Dawgul // *Curr. Top. Med. Chem.* — 2017. — V.17, №5. — P.620–628. doi: 10.2174/1568026616666160713143331.
217. Ming, L. The Antibacterial Effects of Antimicrobial Peptides OP-145 against Clinically Isolated Multi-Resistant Strains / L. Ming, J.A. Huang // *Jpn. J. Infect. Dis.* — 2017. — V.70, №6. — P.601–603. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.090.
218. Gronberg, A. Treatment with LL-37 is safe and effective in enhancing healing of hard-to-heal venous leg ulcers: a randomized, placebo-controlled clinical trial / A. Gronberg, M. Mahlapuu, M. Stahle, C. Whately-Smith, O. Rollman // *Wound Repair Regen.* — 2014. — V.22. — P.613–621. doi: 10.1111/wrr.12211.
219. Dutta, D. Development of Silicone Hydrogel Antimicrobial Contact Lenses with Mel4 Peptide Coating / D. Dutta, B. Kamphuis, B. Ozcelik, H. Thissen, R. Pinarbasi, N. Kumar, M.D.P. Willcox // *Optom. Vis. Sci.* — 2018. — V.95, №10. — P.937–946. doi: 10.1097/OPX.0000000000001282.
220. Gordon, Y.J. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs / Y.J. Gordon, E.G. Romanowski, A.M. McDermott // *Curr. Eye Res.* — 2005. — V.30. — P.505–515. doi: 10.1080/02713680590968637.
221. Lipsky, B.A. Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream / B.A. Lipsky, K.J. Holroyd, M. Zasloff // *Clin. Infect. Dis.* — 2008. — V.47. — P.1537–1545. doi: 10.1086/593185.
222. Marr, A.K. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook / A.K. Marr, W.J. Gooderham, R.E. Hancock // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2006. — V.6. — P.468–472. doi: 10.1016/j.coph.2006.04.006.
223. Laverty, G. Cationic antimicrobial peptide cytotoxicity / G. Laverty // *SOJ Microbiol. Infect. Dis.* — 2014. — V.2. — 112. doi: 10.15226/sojmid.2013.00112.
224. Bacalum, M. Cationic antimicrobial peptides cytotoxicity on mammalian cells: an analysis using therapeutic index integrative concept / M. Bacalum, M. Radu // *Int. J. Pept. Res. Ther.* — 2015. — V.21. — P.47–55. doi: 10.1007/s10989-014-9430-z.
225. Andersson, D.I. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides / D.I. Andersson, D. Hughes, J.Z. Kubicek-Sutherland // *Drug Resist. Updat.* — 2016. — V.26. — P.43–57. doi: 10.1016/j.drug.2016.04.002.
226. Veldhuizen, E.J. Chicken cathelicidins display antimicrobial activity against multiresistant bacteria without inducing strong resistance / E.J. Veldhuizen, E.C. Brouwer, V.A. Schneider, A.C. Fluit // *PLoS One.* — 2013. — V.8, №4. — e61964. doi: 10.1371/journal.pone.0061964.

227. Falanga, A. Marine Antimicrobial Peptides: Nature Provides Templates for the Design of Novel Compounds against Pathogenic Bacteria / A. Falanga, L. Lombardi, G. Franci, M. Vitiello, M.R. Iovene, G. Morelli, M. Galdiero, S. Galdiero // *Int. J. Mol. Sci.* — 2016. — V.17, №5. — 785. doi: 10.3390/ijms17050785.
228. Mohamed, M.F. Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus* / M.F. Mohamed, A. Abdelkhalek, M.N. Seleem // *Sci. Rep.* — 2016. — V.6. — P.1–14. doi: 10.1038/srep29707.
229. Sivertsen, A. Synthetic cationic antimicrobial peptides bind with their hydrophobic parts to drug site II of human serum albumin / A. Sivertsen, J. Isaksson, H.-K.S. Leiros, J. Svenson, J.-S. Svendsen, B.O. Brandsdal // *BMC Struct. Biol.* — 2014. — V.14. — 4. doi: 10.1186/1472-6807-14-4.
230. Li, J. Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design / J. Li, J.-J. Koh, S. Liu, R. Lakshminarayanan, C.S. Verma, R.W. Beuerman // *Front. Neurosci.* — 2017. — V.11. — 73. doi: 10.3389/fnins.2017.00073.
231. Starr, C.G. Host cell interactions are a significant barrier to the clinical utility of peptide antibiotics / C.G. Starr, J. He, W.C. Wimley // *ACS Chem. Biol.* — 2016. — V.11. — P.3391–3399. doi: 10.1021/acscchembio.6b00843.
232. Thwaite, J.E. Proteolytic degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Bacillus anthracis* may contribute to virulence / J.E. Thwaite, S. Hibbs, R.W. Titball, T.P. Atkins // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2006. — V.50. — P.2316–2322. doi: 10.1128/AAC.01488-05.
233. McCrudden, M.T.C. The host defence peptide LL-37 is susceptible to proteolytic degradation by wound fluid isolated from foot ulcers of diabetic patients / M.T.C. McCrudden, D.T.F. McLean, M. Zhou, J. Shaw, G.J. Linden, C.R. Irwin, F.T. Lundy // *Int. J. Pept. Res. Ther.* — 2014. — V.20. — P.457–464. doi: 10.1007/s10989-014-9410-3.
234. Nell, M.J. Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application / M.J. Nell, G.S. Tjabringa, A.R. Wafelman, R. Verrijck, P.S. Hiemstra, J.W. Drijfhout, J.J. Grote // *Peptides.* — 2006. — V.27, №4. — P.649–660. doi: 10.1016/j.peptides.2005.09.016.
235. Woong, S. The P-113 fragment of histatin 5 requires a specific peptide sequence for intracellular translocation in *Candida albicans*, which is independent of cell wall binding / S.J. Woong, S.L. Xuewei, J.N. Sun, M. Edgerton // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2008. — V.52. — P.497–504. doi: 10.1128/AAC.01199-07.
236. Midura-Nowaczek, K. Antimicrobial peptides and their analogs: searching for new potential therapeutics / K. Midura-Nowaczek, A. Markowska // *Perspect. Med. Chem.* — 2014. — V.6. — PMC.S13215. doi: 10.4137/PMC.S13215.
237. Van Groenendael, R. Immunomodulatory and kidney-protective effects of the human chorionic gonadotropin derivate EA-230 / R. Van Groenendael, M. Kox, L.T. Van Eijk, P. Pickkers // *Nephron.* — 2018. — V.140. — P.148–151. doi: 10.1159/000490772.
238. Mahlapuu, M. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents / M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad, C. Björn // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* — 2016. — V.6. — 194. doi: 10.3389/fcimb.2016.00194.

239. Kim, S.H. Polymeric drug conjugates by controlled radical polymerization / S.H. Kim, T.H. Nguyen, H.D. Maynard // *Comprehens. Biomater. II.* — 2017. — V.4. — P.493–505. doi: 10.1016/B978-0-08-100691-7.00020-3.
240. Nordström, R. Delivery systems for antimicrobial peptides / R. Nordström, M. Malmsten // *Adv. Colloid Interf. Sci.* — 2017. — V.242. — P.17–34. doi: 10.1016/j.cis.2017.01.005.
241. Schmidtchen, A. Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides / A. Schmidtchen, M. Pasupuleti, M. Malmsten // *Adv. Colloid Interf. Sci.* — 2014. — V.205. — P.265–274. doi: 10.1016/j.cis.2013.06.009
242. Jiang, Z. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides / Z. Jiang, A.I. Vasil, J.D. Hale, R.E.W. Hancock, M.L. Vasil, R.S. Hodges // *Biopolym. Pept. Sci. Sect.* — 2008. — V.90. — P.369–383. doi: 10.1002/bip.20911.
243. Yang, C.H. An engineered arginine-rich α -helical antimicrobial peptide exhibits broad-spectrum bactericidal activity against pathogenic bacteria and reduces bacterial infections in mice / C.H. Yang, Y.C. Chen, S.Y. Peng, A.P. Tsai, T.J. Lee, J.H. Yen, J.W. Liou // *Sci. Rep.* — 2018. — V.8, №1. — 14602. doi: 10.1038/s41598-018-32981-3.
244. Strömstedt, A.A. Evaluation of strategies for improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, an internal segment of LL-37 / A.A. Strömstedt, M. Pasupuleti, A. Schmidtchen, M. Malmsten // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2009. — V.53. — P.593–602. doi: 10.1128/AAC.00477-08
245. Gentilucci, L. Chemical modifications designed to improve peptide stability: incorporation of non-natural amino Acids, pseudo-peptide bonds, and cyclization / L. Gentilucci, R. De Marco, L. Cerisoli // *Curr. Pharm. Des.* — 2010. — V.16. — P.3185–3203. doi: 10.2174/138161210793292555.
246. Chu, H.L. Boosting salt resistance of short antimicrobial peptides / H.L. Chu, H.Y. Yu, B.S. Yip, Y.H. Chih, C.W. Liang, H.T. Cheng, J.W. Cheng // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2013. — V.57. — P.4050–4052. doi: 10.1128/AAC.00252-13.
247. Pfalzgraff, A. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds / A. Pfalzgraff, K. Brandenburg, G. Weindl // *Front. Pharmacol.* — 2018. — V.9. — 281. doi: 10.3389/fphar.2018.00281.
248. Morris, C.J. Pegylation of antimicrobial peptides maintains the active peptide conformation, model membrane interactions, and antimicrobial activity while improving lung tissue biocompatibility following airway delivery / C.J. Morris, K. Beck, M.A. Fox, D. Ulaeto, G.C. Clark, M. Gumbleton // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2012. — V.56. — P.3298–3308. doi: 10.1128/AAC.06335-11.
249. André, M. PEGylation enhances the tumor selectivity of melanoma-targeted conjugates / M. André, S. Besse, J.M. Chezal, E. Mounetou // *Org. Biomol. Chem.* — 2015. — V.13. — P.388–397. doi: 10.1039/C4OB01751J.
250. Mattheolabakis, G. Pegylation improves the pharmacokinetics and bioavailability of small-molecule drugs hydrolyzable by esterases: a study of phospho-Ibuprofen / G. Mattheolabakis, C.C. Wong, Y. Sun, C.A. Amella, R. Richards, P.P. Constantinides, B. Rigas // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2014. — V.351. — P.61–66. doi: 10.1124/jpet.114.217208.

251. Yang, Z. PEGylation confers greatly extended half-life and attenuated immunogenicity to recombinant methioninase in primates / Z. Yang, J. Wang, Q. Lu, J. Xu, Y. Kobayashi, T. Takakura, A. Takimoto, T. Yoshioka, C. Lian, C. Chen, D. Zhang, Y. Zhang, S. Li, X. Sun, Y. Tan, S. Yagi, E.P. Frenkel, R.M. Hoffman // *Cancer Res.* — 2004. — V.64. — P.6673–6678. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1822.
252. Eckert, R. Targeted antimicrobial treatment to re-establish a healthy microbial flora for long-term protection / R. Eckert, R. Sullivan, W. Shi // *Adv. Dent. Res.* — 2012. — V.24. — P.94–97. doi: 10.1177/0022034512453725.
253. He, J. Systematic approach to optimizing specifically targeted antimicrobial peptides against *Streptococcus mutans* / J. He, D.K. Yarbrough, J. Kreth, M.H. Anderson, W. Shi, R. Eckert // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2010. — V.54. — P.2143–2151. doi: 10.1128/AAC.01391-09.
254. Sarma, P. Specifically targeted antimicrobial peptides: a new and promising avenue in selective antimicrobial therapy / P. Sarma, S. Mahendiratta, A. Prakash, B. Medhi // *Indian J. Pharmacol.* — 2018. — V.50. — P.1–3. doi: 10.4103/ijp.IJP_218_18.
255. Kaplan, C.W. Selective membrane disruption: mode of action of C16G2, a specifically targeted antimicrobial peptide / C.W. Kaplan, J.H. Sim, K.R. Shah, A. Kolesnikova-Kaplan, W. Shi, R. Eckert // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2011. — V.55. — P.3446–3452. doi: 10.1128/AAC.00342-11.
256. Todd, P. C3 Jian Completes Second Phase 2 Clinical Trial of Anti-Cavity Drug / P. Todd, K. Pierre — *GlobeNewswire*, 2015. — URL: <https://www.globenewswire.com/news-release/2015/07/13/751454/0/en/C3-Jian-Completes-Second-Phase-2-Clinical-Trial-of-Anti-Cavity-Drug.html> (accessed September 18, 2020).
257. Oo, T.Z. Evaluation of synergistic activity of bovine lactoferricin with antibiotics in corneal infection / T.Z. Oo, N. Cole, L. Garthwaite, M.D.P. Willcox, H. Zhu // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2010. — V.65. — P.1243–1251. doi: 10.1093/jac/dkq106.
258. Sanchez-Gomez, S. Structural features governing the activity of lactoferricin-derived peptides that act in synergy with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo / S. Sánchez-Gómez, B. Japelj, R. Jerala, I. Moriyón, M. Fernández Alonso, J. Leiva, S.E. Blondelle, J. Andrä, K. Brandenburg, K. Lohner, G. Martínez de Tejada // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2011. — V.55, №1. — P.218–228. doi: 10.1128/aac.00904-10.
259. Giacometti, A. Combination studies between polycationic peptides and clinically used antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria / A. Giacometti, O. Cirioni, M.S. Del Prete, A.M. Paggi, M.M. D'Errico, G. Scalise // *Peptides.* — 2000. — V.21, №8. — P.1155–1160. doi: 10.1016/s0196-9781(00)00254-0.
260. Feng, Q. Functional synergy of alpha-helical antimicrobial peptides and traditional antibiotics against Gram-negative and Gram-positive bacteria in vitro and in vivo / Q. Feng, Y. Huang, M. Chen, G. Li, Y. Chen // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* — 2015. — V.34. — P.197–204. doi: 10.1007/s10096-014-2219-3.
261. Kampshoff, F. A pilot study of the synergy between two antimicrobial peptides and two common antibiotics / F. Kampshoff, M.D.P. Willcox, D. Dutta // *Antibiotics.* — 2019. — V.8. — 60. doi: 10.3390/antibiotics8020060.

262. Blondelle, S.E. Induced conformational states of amphipathic peptides in aqueous/lipid environments / S.E. Blondelle, J.M. Ostresh, R.A. Houghten, E. Perez-Paya // *Biophys J.* — 1995. — V.68. — P.351–359. doi: 10.1016/S0006-3495(95)80194-3.
263. Gaussier, H. Replacement of trifluoroacetic acid with HCl in the hydrophobic purification steps of pediocin PA-1: a structural effect / H. Gaussier, H. Morency, M.C. Lavoie, M. Subirade // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2002. — V.68. — P.4803–4808. doi: 10.1128/aem.68.10.4803-4808.2002.
264. Cornish, J. Trifluoroacetate, a contaminant in purified proteins, inhibits proliferation of osteoblasts and chondrocytes / J. Cornish, K.E. Callon, C.Q. Lin, C.L. Xiao, T.B. Mulvey, G.J. Cooper, I.R. Reid // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 1999. — V.277. — P.E779–E783. doi: 10.1152/ajpendo.1999.277.5.E779.
265. Sikora, K. Counter-ion effect on antistaphylococcal activity and cytotoxicity of selected antimicrobial peptides / K. Sikora, M. Jaśkiewicz, D. Neubauer, M. Bauer, S. Bartoszewska, W. Barańska-Rybak, W. Kamysz // *Amino Acids.* — 2018. — V.50, №5. — P.609–619. doi: 10.1007/s00726-017-2536-9.
266. Johansson, J. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37 / J. Johansson, G.H. Gudmundsson, M.E. Rottenberg, K.D. Berndt, B. Agerberth // *J. Biol. Chem.* — 1998. — V.273. — P.3718–3724. doi: 10.1074/jbc.273.6.3718.
267. Desai, N. Stable Pexiganan Formulation / N. Desai. — Google Patents No: WO2013188286A1, published December 19, 2013.
268. Lichtenthaler, F.W. Emil Fischer, His Personality, His Achievements, and His Scientific Progeny / F.W. Lichtenthaler // *Eur. J. Org. Chem.* — 2002. — V.24. — P.4095–4122. doi: 10.1002/1099-0690(200212)2002:24%3C4095::AID-EJOC4095%3E3.0.CO;2-2.
269. Fischer, E. Ueber einige derivate des glykocolls / E. Fischer, E. Fourneau // *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* — 1901. — V.34. — P.2868–2877.
270. Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide / R.B. Merrifield // *J. Am. Chem. Soc.* — 1963. — V.85. — P.2149–2154.
271. Anderson, G.W. T-butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis / G.W. Anderson, A.C. McGregor // *J. Am. Chem. Soc.* — 1957. — V.79. — P.6180–6183.
272. Grapsas, I. N-(tert-butoxycarbonyloxy)-5-norbornene-endo-2, 3- dicarboximide, a reagent for the regioselective introduction of the tert-butoxycarbonyl (boc) protective group at unhindered amines: Application to amino glycoside chemistry / I. Grapsas, Y.J. Cho, S. Mobashery // *J. Org. Chem.* — 1994. — V.59. — P.1918–1922.
273. Vigneaud, V. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin / V. Vigneaud, C. Ressler, C.J.M. Swan, C.W. Roberts, P.G. Katsoyannis, S. Gordon // *J. Am. Chem. Soc.* — 1953. — V.75. — P.4879–4880.
274. du Vigneaud, V. The synthesis of oxytocin / V. du Vigneaud, C. Ressler, J.M. Swan, C.W. Roberts, P.G. Katsoyannis // *J. Am. Chem. Soc.* — 1954. — V.76. — P.3115–3121.
275. Chandrudu, S. Chemical methods for peptide and protein production / S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth // *Molecules.* — 2013. — V.18, №4. — P.4373–4388. doi: 10.3390/molecules18044373.

276. Fields, G.B. Introduction to Peptide Synthesis / G.B. Fields // *Current Protocols in Protein Science*. — 2001. — V.26. — P.18.1.1–18.1.9. doi: 10.1002/0471140864.ps1801s26.
277. Sheppard, R. The fluorenylmethoxycarbonyl group in solid phase synthesis / R. Sheppard // *J. Pept. Sci.* — 2003. — V.9, №9. — P.545–552. doi: 10.1002/psc.479.
278. Carpino, L.A. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group / L.A. Carpino, G.Y. Han // *J. Am. Chem. Soc.* — 1970. — V.92. — P.5748–5749.
279. Behrendt, R. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis / R. Behrendt, P. White, J. Offer // *J. Pept. Sci.* — 2016. — V.22. — P.4–27. doi: 10.1002/psc.2836.
280. Dryland, A. Peptide synthesis. Part 8. A system for solidphase synthesis under low pressure flow conditions / A. Dryland, R.C. Sheppard // *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* — 1986. — V.1, Issue 0. — P.125–137. doi: 10.1039/P19860000125.
281. Baeshen, M.N. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives / M.N. Baeshen, A.M. Al-Hejin, R.S. Bora, M.M. Ahmed, H.A. Ramadan, K.S. Saini, N.A. Baeshen, E.M. Redwan // *J. Microbiol. Biotechnol.* — 2015. — V.25, №7. — P.953–962. doi: 10.4014/jmb.1412.12079.
282. Ingham, A.B. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems / A.B. Ingham, R.J. Moore // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2007. — V.47. — 207. doi: 10.1042/ba20060207.
283. Ishida, H. Overexpression of antimicrobial, anticancer, and transmembrane peptides in *Escherichia coli* through a calmodulin-peptide fusion system / H. Ishida, L.T. Nguyen, R. Gopal, T. Aizawa, H.J. Vogel // *J. Am. Chem. Soc.* — 2016. — V.138. — P.11318–11326. doi: 10.1021/jacs.6b06781.
284. Boto, A. The road from host-defense peptides to a new generation of antimicrobial drugs / A. Boto, J.M.P. De La Lastra, C.C. González // *Molecules*. — 2018. — V.23. — 311. doi: 10.3390/molecules23020311.
285. Методы культивирования клеток / под ред.: Г.П. Пинаева, М.С.Богдановой. — СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. — 278 с.
286. Сидоренко, О.Д. Микробиология продуктов животноводства (практическое руководство): Учебное пособие (Высшее образование: Бакалавриат) / О.Д.Сидоренко — Москва : НИЦ ИНФРА-М, 2015. — 172 с.
287. Путинцева, О.В. Иммунология. Практикум. Часть II / О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов, И.А. Колтаков. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2008. — 44 с.
288. Janetzki, S. Sample Preparation / S. Janetzki // *Elispot for Rookies (and Experts Too)* / S. Janetzki. — Switzerland: Springer International Publishing, 2016. — P.25–41. doi: 10.1007/978-3-319-45295-1_4.
289. Peripheral Blood Mononuclear Cells [электронный ресурс] // *fcslaboratory.com*: сайт компании Flow Contract Site Laboratory, LLC. 2009-2019. URL: <https://fcslaboratory.com/peripheral-blood-mononuclear-cells-pbmc/> (дата обращения: 04.03.2021).

290. Стрепихеев, А.А. Основы химии высокомолекулярных соединений. 3-е изд., пер. и доп. / А.А. Стрепихеев, В.А. Деревицкая. — Москва: Химия, 1976. — 440 с.
291. Никулин, С.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография : учебно-методическое пособие / С.В. Никулин, Н.Л. Стародубцева, И.А. Попов. — М. : МФТИ, 2017. — 48 с.
292. Гиндуллина, Т.М. Хроматографические методы анализа: учебно-методическое пособие /Т.М. Гиндуллина, Н.М. Дубова — Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2010. — 80 с.
293. Шаповалова, Е.Н. Хроматографические методы анализа : методическое пособие для специального курса / Е.Н. Шаповалова, А.В. Пирогов; Отв. ред. О.А. Шпигун. — М. : МГУ, 2007. — 109 с.
294. Лебедев, А.Т. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов / А.Т. Лебедев, К.А. Артеменко, Т.Ю. Самгина — М. : Техносфера, 2012. — 176 с.+ 4 с. цв. вкл.
295. Пыцкий, И.С. Масс-спектрометрия как современный метод анализа полимеров / И.С. Пыцкий, Е.С. Кузнецова, А.К. Буряк // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2021. —Т.21, №1. — С.69–76. doi: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3221.
296. Tossi, A. An approach combining cDNA amplification and chemical synthesis for the identification of novel, cathelicidin-derived, antimicrobial peptides / A.Tossi, M. Scocchi, M. Zanetti, R. Genaro, P. Storici, D. Romeo // Antibacterial Peptide Protocols. Methods In Molecular Biology, vol. 78 / W. Shafer (Ed.). — Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1997. — P.133–151. doi: 10.1385/0-89603-408-9:133.
297. Wiegand, I. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances / I. Wiegand, K. Hilpert, R.E.W. Hancock // Nat. Protocols. — 2008. — V.3. — P.163–175. doi: 10.1038/nprot.2007.521.
298. Lehrer, R. I. Concurrent assessment of inner and outer membrane permeabilization and bacteriolysis in E. coli by multiple-wavelength spectrophotometry / Lehrer, R. I., Barton, A., & Ganz, T. // Journal of Immunological Methods. — 1988. — V. 108, №1-2. — P.153–158. doi: 10.1016/0022-1759(88)90414-0.
299. Lehrer, R. I. α -Defensins in human innate immunity / R. I. Lehrer, W. Lu / Immunological Reviews. — 2011. — V. 245, №1. — P.84–112. doi:10.1111/j.1600-065x.2011.01082.x.
300. Артамонов, А.Ю. Фото- и флюориметрические методы оценки проницаемости мембран E. coli ML-35P / А.Ю. Артамонов, О.В. Шамова, В.Н. Кокряков, Д.С. Орлов // Вестник Санкт-Петербургского университета. — 2008. — Сер. 3, №2. — С.139–142.
301. Орлов, Д.С. Молекулярные механизмы действия пептида врожденного иммунитета протегрина 1 на мембраны бактерии E.coli ML35p / Д.С. Орлов, А.Ю. Артамонов, М.С. Жаркова, П.М. Копейкин, С.Б. Орлов // Российский иммунологический журнал. — 2015. — Т. 9 (18), № 2(1). — С.508-510.
302. Шамова, О.В. Молекулярно-клеточные основы реализации биологической активности антимикробных пептидов лейкоцитов : дис. ... д-ра биол. наук : 14.03.03, 03.01.04 / Шамова Ольга Валерьевна. — СПб, 2013. — 343 с.

303. Braut-Boucher, F. Fluorescent Molecular Probes / F. Braut-Boucher, M. Aubery // Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition) / J.C. Lindon, G.E. Tranter, D.W. Koppenaal (Eds.). — Cambridge: Academic Press, 2017. — P.661–669. doi: 10.1016/B978-0-12-803224-4.00072-8.
304. Shahrour, H. AMPs as Anti-biofilm Agents for Human Therapy and Prophylaxis / H. Shahrour, R. Ferrer-Espada, I. Dandache, S. Bárcena-Varela, S. Sánchez-Gómez, A. Chokr, G. Martinez-de-Tejada // Adv. Exp. Med. Biol. — 2019. — V.1117. — P.257–279. doi: 10.1007/978-981-13-3588-4_14.
305. Davey, M.E. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2000. — V. 64, №4. — P. 847–867. doi: 10.1128/membr.64.4.847-867.2000.
306. Welch, K. A method for quantitative determination of biofilm viability / K. Welch, Y. Cai, M. Strømme // J. Funct. Biomater. — 2012. — V. 3, №2. — P.418–431. doi: 10.3390/jfb3020418.
307. Merritt, J.H. Growing and analyzing static biofilms / J.H. Merritt, D.E. Kadouri, G.A. O'Toole // Curr. Protoc. Microbiol. — 2005. — Chapter 1. — Unit 1B.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00.
308. Berenbaum, M.C. What is synergy? / M.C. Berenbaum // Pharmacol. Rev. — 1989. — V. 41, №2. — P.93–141.
309. Breitinger, H.-G. Chapter 7. Drug Synergy – Mechanisms and Methods of Analysis / H.-G. Breitinger // Toxicity and Drug Testing / Prof. Bill Acree (Ed.). — InTech, 2012. — P.143–166.
310. Dressler, V. CombiTool — a new computer program for analyzing combination experiments with biologically active agents / V. Dressler, G. Müller, J. Sühnel // Comput. Biomed. Res. — 1999. — V. 32, №2. — P.145–60.
311. Кацнельсон, Б.А. К методологии оценки типа комбинированной токсичности на основе данных эколого-эпидемиологического исследования / Б.А. Кацнельсон, Ю.И. Казмер, А.Н. Вараксин, Л.И. Привалова, В.Г. Панов, Е.П. Киреева // Токсикологический вестник. — 2011. — №3 (108). — С.2–6.
312. Cokol-Cakmak, M. Diagonal Method to Measure Synergy Among Any Number of Drugs / M. Cokol-Cakmak, F. Bakan, S. Cetiner, M. Cokol // J. Vis. Exp. — 2018. — V. 136. — e57713. doi:10.3791/57713.
313. Orhan, G. Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. / G. Orhan, A. Bayram, Y. Zer, I. Balci. // J. Clin. Microbiol. — 2005. — V. 43, №1. — P.140–143.
314. Fehri, L.F. Activities of Antimicrobial Peptides and Synergy with Enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis* / L.F. Fehri, H. Wróblewski, A. Blanchard // Antimicrob. Agents Chemother. — 2007. — V. 51, №2. — P.468–474.
315. Hsieh, M.H. Synergy assessed by checkerboard. A critical analysis / M.H. Hsieh, C.M. Yu, V.L. Yu, J.W. Chow // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. — 1993. — V. 16, №4. — P.343–349.

316. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Terminology (EUCAST Definitive document) / EUCAST // *Clinical Microbiology and Infection*. — 1998. — V. 4. — P. 291-296. doi: 10.1111/j.1469-0691.1998.tb00061.x.
317. Antibacterial peptide protocols / Ed. by W. Shafer. — Totowa, N.J.: Humana Press Inc., 1998. — 255 p.
318. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays / T. Mosmann // *Journal of Immunological Methods*. — 1983. — V. 65 — P.55–63.
319. Gutiérrez, L. Chapter 1.09 - Nanotechnology in Drug Discovery and Development / L. Gutiérrez, G. Stepien, L. Gutiérrez, M. Pérez-Hernández, J. Pardo, J. Pardo, V. Grazú, J.M. de la Fuente // *Comprehensive Medicinal Chemistry III* / S. Chackalamannil, D. Rotella, S. E. Ward (Eds.). — Elsevier, 2017. — P.264–295. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.12292-9.
320. Iqbal, H.M.N. Chapter 13 - The challenge of biocompatibility evaluation of biocomposites / H.M.N. Iqbal, T.Keshavarz // *Biomedical Composites (Second Edition)* / Luigi Ambrosio (Ed.). — Woodhead Publishing, 2017. — P.303-334. doi: 10.1016/B978-0-08-100752-5.00014-7.
321. Kuete, V. Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables / V. Kuete, O. Karaosmanoğlu, H. Sivas // *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* / V. Kuete (Ed.). — Cambridge: Academic Press, 2017. — P. 271-297. doi: 10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8.
322. Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability / W. Strober // *Curr. Protoc. Immunol.* — 2015. — V. 111. — A3.B.1– A3.B.3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111.
323. Манских, В.Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение / В.Н. Манских // *Цитология*. — 2007. — Т.49, №11. — С. 909-915.
324. Hanshaw, R.G. New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis / R.G. Hanshaw, B.D. Smith // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. — 2005. — V. 13, №17. — P. 5035–5042. doi: 10.1016/j.bmc.2005.04.071.
325. Ващенко, В.И. Эриптоз (квазиапоптоз) эритроцитов человека и его роль в лекарственной терапии / В.И. Ващенко, В.Н. Вильянинов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. — 2019. — Т. 17. — № 3. — С. 5–38. doi: 10.7816/RCF1735-38.
326. Meyer, A.F. Haynes Stereochemistry- and concentration-dependent effects of phosphatidylserine enrichment on platelet function / A.F. Meyer, S.M. Gruba, D. Kim, B.M. Meyer, S. Koseoglu, J.J. Dalluge, C.L. Haynes // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* — 2017. — V. 1859, №8. — P.1381-1387. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.04.027.
327. Сергеева Т.Ф. Современные методы исследования апоптотической гибели клеток (обзор) / Т.Ф. Сергеева, М.В. Ширманова, Е.В. Загайнова, К.А. Лукьянов // *Современные технологии в медицине*. — 2015. — Выпуск 3, том 7. — С.172–182.
328. Annexin V-Cy3 Apoptosis Detection Kit TECHNICAL BULLETIN / Sigma-Aldrich, Inc. — 2010. — 3 p.
329. Shamova, O.V. Minibactenecins ChBac7.N α and ChBac7. N β - Antimicrobial Peptides from Leukocytes of the Goat *Capra hircus* / O.V. Shamova, D.S. Orlov, M.S. Zharkova, S.V. Balandin, E.V.

- Yamschikova, D. Knappe, R. Hoffmann, V.N. Kokryakov, T.V. Ovchinnikova // *Acta Naturae*. — 2016. — V.8, № 3. — P.136–146. doi: 10.32607/20758251-2016-8-3-136-146.
330. Anderson, R.C. Isolation and characterisation of proline/arginine-rich cathelicidin peptides from ovine neutrophils / R.C. Anderson, P.L. Yu // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2003. — V. 312, №4. — P.1139–1146. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.045.
331. Podda, E. Dual mode of action of Bac7, a proline-rich antibacterial peptide / E. Podda, M. Benincasa, S. Pacor, F. Micali, M. Mattiuzzo, R. Gennaro, M. Scocchi // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2006. — V. 1760, №11. — P.1732–1740. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.09.006.
332. Benincasa, M. Antimicrobial activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates / M. Benincasa, M. Scocchi, E. Podda, B. Skerlavaj, L. Dolzani, R. Gennaro // *Peptides*. — 2004. — V.25, №12. — P.2055–2061. doi: 10.1016/j.peptides.2004.08.004.
333. Ямщикова, Е.В. Биологическая активность обогащенных пролином пептидов системы врожденного иммунитета : дис. ... канд. биол. наук : 14.03.03, 03.01.04 / Ямщикова Елена Владимировна. — СПб, 2012. — 160 с.
334. Yu, G. Predicting drug resistance evolution: insights from antimicrobial peptides and antibiotics / G. Yu, D.Y. Baeder, R.R. Regoes, J. Rolff // *Proc Biol Sci.* — 2018. — V.285, №1874. — E.20172687. doi: 10.1098/rspb.2017.2687.
335. El Shazely, B. Resistance Evolution Against Antimicrobial Peptides in *Staphylococcus aureus* Alters Pharmacodynamics Beyond the MIC / B. El Shazely, G. Yu, P.R. Johnston, J. Rolff // *Front Microbiol.* — 2020. — V. 11. — E.103. doi: 10.3389/fmicb.2020.00103.
336. LaRock, C.N. Cationic antimicrobial peptide resistance mechanisms of streptococcal pathogens / C.N. LaRock, V. Nizet // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2015. — V. 1848, №11, Pt B. — P.3047–3054.
337. Tavares, L.S. Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides / L.S. Tavares, C.S.F. Silva, V.C. de Souza, V.L. da Silva, C.G. Diniz, M.O. Santos // *Front. Microbiol.* — 2013. — V.4. — E.412. doi: 10.3389/fmicb.2013.00412.
338. Ramanathan, B. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity / B. Ramanathan, E.G. Davis, C.R. Ross, F. Blecha // *Microbes Infect.* — 2002. — V.4, №3. — P.361–372. doi: 10.1016/s1286-4579(02)01549-6.
339. Hoskin D.W. Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides / D.W. Hoskin, A. Ramamoorthy // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2008. — V.1778, №2. — P.357–375. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.11.008.
340. Shi, J. Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide / J. Shi, C.R. Ross, M.M. Chengappa, M.J. Sylte, D.S. McVey, F. Blecha // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 1996. — V.40, №1. — P.115–121. doi: 10.1128/aac.40.1.115.
341. Skerlavaj, B. Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities / B. Skerlavaj,

- R. Gennaro, L. Bagella, L. Merluzzi, A. Risso, M. Zanetti // *J. Biol. Chem.* — 1996. — V.271, №45. — P.28375–28381. doi: 10.1074/jbc.271.45.28375.
342. Tokunaga, Y. Antibacterial activity of bactenecin 5 fragments and their interaction with phospholipid membranes / Y. Tokunaga, T. Niidome, T. Hatakeyama, H. Aoyagi // *J. Peptide Sci.* — 2001. — V.7. — P.297–304. doi:10.1002/psc.317.
343. Liao, S. The multiple roles of histidine in protein interactions / S. Liao, Q. Du, J. Meng, Z.W. Pang, R.B. Huang // *Chem. Cent. J.* — 2013. — V.7, №1. — E.44. doi: 10.1186/1752-153X-7-44.
344. Manikandan, S. Measures of central tendency: The mean / S. Manikandan // *J. Pharmacol. Pharmacother.* — 2011. — V. 2. — P.140–142. doi:10.4103/0976-500X.81920.
345. Davies, B.I. The importance of the geometric mean MIC / B.I. Davies // *J. Antimicrob. Chemother.* — 1990. — V. 25. — P.471–472. doi:10.1093/jac/25.3.471.
346. Wieprecht, T. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment / T. Wieprecht, M. Dathe, E. Krause, M. Beyermann, W.L. Maloy, D.L. MacDonald, M. Bienert // *FEBS Lett.* — 1997. — V. 417. — P.135–140.
347. Takahashi, D. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity / D. Takahashi, S.K. Shukla, O. Prakash, G. Zhang // *Biochimie.* — 2010. — V.92, №9. — P.1236–1241. doi: 10.1016/j.biochi.2010.02.023.
348. Pillai, S.K. Antimicrobial Combinations / S.K. Pillai, R.C. Moellering, G.M. Eliopoulos // *Antibiotics in Laboratory Medicine, 5th Edition* / V. Lorian (Ed.). — Philadelphia: the Lippincott Williams & Wilkins Co., 2005. — P.365–440.
349. Turnidge, J. Drug–Drug Combinations / J. Turnidge // *Fundamentals of Antimicrobial Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* / A. Vinks, H. Derendorf, J. Mouton (Eds.). — New York: Springer, 2014. — P.153–198. doi: 10.1007/978-0-387-75613-4_8.
350. Zimmerman, G.R. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts / G.R. Zimmerman, J. Lehar, C.T. Keith // *Drug. Discov. Today.* — 2007. — V.12. — P.34–42. doi: 10.1016/j.drudis.2006.11.008.
351. Matsuzaki, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides / K. Matsuzaki // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2009. — V.1788, №8. — P.1687–1692. doi: 10.1016/j.bbame.2008.09.013.
352. Dathe, M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge / M. Dathe, H. Nikolenko, J. Meyer, M. Beyermann, M. Bienert // *FEBS Lett.* — 2001. — V.501. — P.146–150. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02648-5.
353. Kopeikin, P.M. Caprine Bactenecins as Promising Tools for Developing New Antimicrobial and Antitumor Drugs / P.M. Kopeikin, M.S. Zharkova, A.A. Kolobov, M.P. Smirnova, M.S. Sukhareva, E.S. Umnyakova, V.N. Kokryakov, D.S. Orlov, B.L. Milman, S.V. Balandin, P.V. Panteleev, T.V. Ovchinnikova, A.S. Komlev, A. Tossi, O.V. Shamova // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* — 2020. — V.10. — E.552905. doi: 10.3389/fcimb.2020.552905.
354. Freund, C. Proline-Rich Sequence Recognition Domains (PRD): Ligands, Function and Inhibition / C. Freund, H.G. Schmalz, J. Sticht, R. Kühne // In: *Protein-Protein Interactions as New Drug Targets.*

Handbook of Experimental Pharmacology, vol 186. / E. Klusmann, J. Scott (eds). — Berlin, Heidelberg : Springer, 2008. — P.407–429. doi: 10.1007/978-3-540-72843-6_17.

355. Markossian, K.A. Antibacterial proline-rich oligopeptides and their target proteins / K.A. Markossian, A.A. Zamyatnin, B.I. Kurganov // *Biochemistry (Mosc)*. — 2004. — V.69, №10. — P.1082–1091. doi: 10.1023/b:biry.0000046881.29486.51.

356. Roy, K. Interaction of Grb2 SH3 domain with UVRAG in an Alzheimer's disease-like scenario / K. Roy, O. Chakrabarti, D. Mukhopadhyay // *Biochem. Cell. Biol.* — 2014. — V.92, №3. — P.219–225. doi: 10.1139/bcb-2014-0001. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24882360.

357. Knappe, D. Oncocin derivative Onc72 is highly active against *Escherichia coli* in a systemic septicaemia infection mouse model / D. Knappe, S. Fritsche, G. Alber, G. Köhler, R. Hoffmann, U. Müller // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2012. — V.67, №10. — P.2445–2451. doi: 10.1093/jac/dks241.

358. Ostorhazi, E. In vivo activity of optimized apidaecin and oncocin peptides against a multiresistant, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strain / E. Ostorhazi, É. Nemes-Nikodem, D. Knappe, R. Hoffmann // *Protein Pept. Lett.* — 2014. — V.21, №4. — P.368–373. doi: 10.2174/09298665113206660107.

359. Ostorhazi, E. Broad-spectrum antimicrobial efficacy of peptide A3-APO in mouse models of multidrug-resistant wound and lung infections cannot be explained by in vitro activity against the pathogens involved / E. Ostorhazi, M.C. Holub, F. Rozgonyi, F. Harnos, M. Cassone, J.D. Wade, L. Otvos Jr. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* — 2011. — V.37, №5. — P.480–484. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.01.003.

360. Holfeld, L. Proline-rich antimicrobial peptides show a long-lasting post-antibiotic effect on Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* / L. Holfeld, D. Knappe, R. Hoffmann // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2018. — V.73, №4. — P.933–941. doi: 10.1093/jac/dkx482.

361. Schmidt, R. In vivo Efficacy and Pharmacokinetics of Optimized Apidaecin Analogs / R. Schmidt, D. Knappe, E. Wende, E. Ostorházi, R. Hoffmann // *Front. Chem.* — 2017. — V.5 — 15. doi: 10.3389/fchem.2017.00015.

362. Janusz, M. Chemical and physical characterization of a proline-rich polypeptide from sheep colostrum / M. Janusz, K. Starościk, M. Zimecki, Z. Wiczorek, J. Lisowski // *Biochem. J.* — 1981. — V.199, №1. — P.9–15. doi: 10.1042/bj1990009.

363. Leszek, J. Colostrinin: a proline-rich polypeptide (PRP) complex isolated from ovine colostrum for treatment of Alzheimer's disease. A double-blind, placebo-controlled study / J. Leszek, A.D. Inglot, M. Janusz, J. Lisowski, K. Krukowska, J.A. Georgiades // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. — 1999. — V.47, №6. — P.377–385.

364. Durgaryan, A.A. The protective and immunomodulatory effects of hypothalamic proline-rich polypeptide galarmin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice / A.A. Durgaryan, M.B. Matevosyan, T.Y. Seferyan, M.A. Sargsyan, S.L. Grigoryan, K.A. Galoian, A.A. Galoian // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* — 2012. — V.31, №9. — P.2153–2165. doi: 10.1007/s10096-012-1550-9.

365. Mardirossian, M. Proline-Rich Peptides with Improved Antimicrobial Activity against *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *A. baumannii* / M., Mardirossian, R. Sola, B. Beckert, D.W.P. Collis, A. Di Stasi, F. Armas, K. Hilpert, D.N. Wilson, Scocchi M. // *ChemMedChem*. — 2019. — V.14, №24. — P.2025–2033. doi: 10.1002/cmdc.201900465.
366. Price, R.L. In vitro and in vivo properties of the bovine antimicrobial peptide, Bactenecin 5 / R.L. Price, L. Bugeon, S. Mostowy, C. Makendi, B.W. Wren, H.D. Williams, S.J. Willcocks // *PLoS One*. — 2019. — V.14, №1. — e0210508. doi: 10.1371/journal.pone.0210508.
367. Жаркова, М.С. Действие пролин-богатых пептидов врожденного иммунитета на антибиотикоустойчивые штаммы бактерий / М.С. Жаркова, П.М. Копейкин, Г.Е. Афиногенов, Д.С. Орлов, А.Ю. Артамонов, К.Э. Сафиуллина, М.С. Сухарева, Е.В. Цветкова, Б.Л. Мильман, А.Г. Афиногенова, О.В. Шамова // *Медицинская иммунология*. — 2018. — Т.20, №1. — С.107–114. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-107-114.
368. Raj, P.A. Delineation of an active fragment and poly(L-proline) II conformation for candidacidal activity of bactenecin 5 / P.A. Raj, E. Marcus, M. Edgerton // *Biochemistry*. — 1996. — V.35, №14. — P.4314–4325. doi: 10.1021/bi951681r. PMID: 8605180.
369. Mardirossian, M. Search for Shorter Portions of the Proline-Rich Antimicrobial Peptide Fragment Bac5(1-25) That Retain Antimicrobial Activity by Blocking Protein Synthesis / M. Mardirossian, R. Sola, M. Degasperis, M. Scocchi // *ChemMedChem*. — 2019. — V.14, №3. — P.343–348. doi: 10.1002/cmdc.201800734.
370. Eipper, B.A. The Biosynthesis of Neuropeptides: Peptide alpha-Amidation / B.A. Eipper, D.A. Stoffers, R.E. Mains // *Annual Review of Neuroscience*. — 1992. — V.15, №1. — P.57–85. doi: 10.1146/annurev.ne.15.030192.000421.
371. Kumar, D. Amidation☆ / D. Kumar, B.A. Eipper, R.E. Mains // *Reference Module in Biomedical Sciences*. — Elsevier, 2016. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.04040-x.
372. Bousquet-Moore, D. Interactions of peptide amidation and copper: novel biomarkers and mechanisms of neural dysfunction / D. Bousquet-Moore, J.R. Prohaska, E.A. Nillni, T. Czyzyk, W.C. Wetsel, R.E. Mains, B.A. Eipper // *Neurobiol. Dis.* — 2010. — V.37, №1. — P.130–140. doi: 10.1016/j.nbd.2009.09.016.
373. Shimosawa, T. Adrenomedullin amidation enzyme activities in hypertensive patients / T. Shimosawa, K. Kanozawa, R. Nagasawa, T. Mitarai, K. Isoda, K. Takahashi, K. Ando, Y. Tozawa, M. Nagase, N. Sasaki, M. Fujita, K. Takano, T. Iiri, T. Fujita // *Hypertens. Res.* — 2000. — V.23, №2. — P.167–171. doi: 10.1291/hypres.23.167.
374. Mardirossian, M. Fragments of the Nonlytic Proline-Rich Antimicrobial Peptide Bac5 Kill *Escherichia coli* Cells by Inhibiting Protein Synthesis / M. Mardirossian, Q. Barrière, T. Timchenko, C. Müller, S. Pacor, P. Mergaert, M. Scocchi, D.N. Wilson // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2018. — V.62, №8. — e00534-18. doi: 10.1128/AAC.00534-18.
375. Krizsan, A. Influence of the *yjiL-mdtM* Gene Cluster on the Antibacterial Activity of Proline-Rich Antimicrobial Peptides Overcoming *Escherichia coli* Resistance Induced by the Missing *SbmA* Transporter System / A. Krizsan, D. Knappe, R. Hoffmann // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2015. — V.59, №10. — P.5992–5998. doi: 10.1128/AAC.01307-15.

376. Schibli, D.J. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus* / D.J. Schibli, H.N. Hunter, V. Aseyev, T.D. Starner, J.M. Wiencek, P.B. McCray Jr., B.F. Tack, H.J. Vogel // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V.277. — P.8279–8289. doi: 10.1074/jbc.M108830200.
377. Chan, Y.R. Anti-Microbial Activity and Cell Binding are Controlled by Sequence Determinants in the Anti-Microbial Peptide PR-39 / Y.R. Chan, M. Zanetti, R. Gennaro, R.L. Gallo // *J. Invest. Dermat.* — 2001. — V.116, №2. — P.230-235. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01231.x.
378. Guida, F. Effect of size and N-terminal residue characteristics on bacterial cell penetration and antibacterial activity of the proline-rich peptide Bac7 / F. Guida, M. Benincasa, S. Zahariev, M. Scocchi, F. Berti, R. Gennaro, A. Tossi // *J. Med. Chem.* — 2015. — V.58, №3. — P.1195–1204. doi: 10.1021/jm501367p.
379. de la Fuente-Núñez, C. Synthetic antibiofilm peptides / C. de la Fuente-Núñez, M.H. Cardoso, E. de Souza Cândido, O.L. Franco, R.E. Hancock // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2016. — V.1858, №5. — P.1061–1069. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.12.015.
380. Chen, H. Inhibition and Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Host Defence Peptides / H. Chen, R.W. Wubbolts, H.P. Haagsman, E.J.A. Veldhuizen // *Sci. Rep.* — 2018. — V.8, №1. — 10446. doi: 10.1038/s41598-018-28842-8.
381. Costerton, J.W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // *Science.* — 1999. — V.284, №5418. — P.1318–1322. doi: 10.1126/science.284.5418.1318.
382. Jorge, P. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches / P. Jorge, A. Lourenço, M.O. Pereira // *Biofouling.* — 2012. — V.28, №10. — P.1033–1061. doi: 10.1080/08927014.2012.728210.
383. Pletzer, D. Antibiofilm Peptides: Potential as Broad-Spectrum Agents / D. Pletzer, R.E. Hancock // *J. Bacteriol.* — 2016. — V.198, №19. — P.2572–2578. doi: 10.1128/JB.00017-16.
384. Dostert, M. Design and Assessment of Anti-Biofilm Peptides: Steps Toward Clinical Application / M. Dostert, C.R. Belanger, R.E.W. Hancock // *J. Innate Immun.* — 2019. — V.11, №3. — P.193–204. doi: 10.1159/000491497.
385. Chernysh, S. Biofilm infections between *Scylla* and *Charybdis*: interplay of host antimicrobial peptides and antibiotics / S. Chernysh, N. Gordya, D. Tulin, A. Yakovlev // *Infect. Drug. Resist.* — 2018. — V.11. — P.501–514. doi: 10.2147/IDR.S157847.
386. Yasir, M. Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms / M. Yasir, M.D.P. Willcox, D. Dutta // *Materials (Basel).* — 2018. — V.11, №12. — 2468. doi: 10.3390/ma11122468.
387. Casciaro, B. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and expression of virulence genes by selective epimerization in the peptide Esculentin-1a(1-21)NH₂ / B. Casciaro, Q. Lin, S. Afonin, M.R. Loffredo, V. de Turrís, V. Middel, A.S. Ulrich, Y.P. Di, M.L. Mangoni // *FEBS J.* — 2019. — V.286, №19. — P.3874–3891. doi: 10.1111/febs.14940.

388. Overhage, J. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation / J. Overhage, A. Campisano, M. Bains, E.C. Torfs, B.H. Rehm, R.E. Hancock // *Infect. Immun.* — 2008. — V.76, №9. — P.4176–4182. doi: 10.1128/IAI.00318-08.
389. Dolzani, L. Sub-MIC effects of a proline-rich antibacterial peptide on clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* / L. Dolzani, A. Milan, M. Scocchi, C. Lagatolla, R. Bressan, M. Benincasa // *J. Med. Microbiol.* — 2019. — V.68, №8. — P.1253–1265. doi: 10.1099/jmm.0.001028.
390. Runti, G. The Mechanism of Killing by the Proline-Rich Peptide Bac7(1-35) against Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Differs from That against Other Gram-Negative Bacteria / G. Runti, M. Benincasa, G. Giuffrida, G. Devescovi, V. Venturi, R. Gennaro, M. Scocchi // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2017. — V.61, №4. — e01660-16. doi: 10.1128/AAC.01660-16.
391. Schibli, D.J. Structure-function analysis of tritrypticin analogs: potential relationships between antimicrobial activities, model membrane interactions, and their micelle-bound NMR structures / D.J. Schibli, L.T. Nguyen, S.D. Kernaghan, Ø. Rekdal, H.J. Vogel // *Biophys. J.* — 2006. — V.91, №12. — P.4413–4426. doi: 10.1529/biophysj.106.085837.
392. Артамонов, А.Ю. Иммуномодулирующая активность антимикробных пептидов индолицидина и его структурных аналогов / А.Ю. Артамонов, С.Н. Шанин, Д.С. Орлов, О.В. Шамова, Н.И. Колодкин, Е.Г. Рыбакина // *Медицинская иммунология.* — 2009. — Т.11, №1. — С.101–104. doi: 10.15789/1563-0625-2009-1-101-104.
393. Harris, F. On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells / Harris F, Dennison SR, Singh J, Phoenix DA. // *Med. Res. Rev.* — 2013. — V.33, №1. — P.190–234. doi: 10.1002/med.20252.
394. Splith, K. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa / K. Splith, I. Neundorff // *Eur. Biophys. J.* — 2011. — V.40, №4. — P.387–397. doi: 10.1007/s00249-011-0682-7.
395. Gerl, R. Apoptosis in the development and treatment of cancer / R. Gerl, D.L. Vaux // *Carcinogenesis.* — 2005. — V.26, №2. — P.263–270. doi: 10.1093/carcin/bgh283.
396. Amaravadi, R.K. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment / R.K. Amaravadi, C.B. Thompson // *Clin. Cancer Res.* — 2007. — V.13, №24. — P.7271–7279. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1595.
397. Kiaris, H. Apoptosis versus necrosis: which should be the aim of cancer therapy? / H. Kiaris, A.V. Schally // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1999. — V.221, №2. — P.87–88. doi: 10.1046/j.1525-1373.1999.d01-59.x.
398. Ricci, M.S. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways / M.S. Ricci, W.X. Zong // *Oncologist.* — 2006. — V.11, №4. — P.342–357. doi: 10.1634/theoncologist.11-4-342.
399. Su, Z. Cancer therapy in the necroptosis era / Z. Su, Z. Yang, L. Xie, J.P. DeWitt, Y. Chen // *Cell Death Differ.* — 2016. — V.23. — P.748–756. doi: 10.1038/cdd.2016.8.
400. Shoombuatong, W. Unraveling the bioactivity of anticancer peptides as deduced from machine learning / W. Shoombuatong, N. Schaduengrat, C. Nantasenamat // *EXCLI J.* — 2018. — V.17. — P.734–752. doi: 10.17179/excli2018-1447.