

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Полякова Валентина Александровна

Разработка, синтез и анализ антибиотической активности структурных модификаций  
пептидов семейства кателицидинов

Выпускная квалификационная работа  
по направлению подготовки 06.04.01  
основная образовательная программа магистратуры «Биология»

Работа выполнена в лаборатории  
дизайна и синтеза биологически активных пептидов  
отдела Общей патологии и патофизиологии  
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
(зав. отделом и лабораторией - д.б.н. Шамова О.В.)

Научный руководитель:  
профессор каф. биохимии д.б.н. Шамова Ольга Валерьевна

Санкт-Петербург 2018

## Оглавление

Обозначения и сокращения .....	4
1 Введение .....	5
Актуальность .....	5
Цели и задачи .....	7
2.1 Врожденный и приобретенный иммунитет.....	8
2.2 Морфо-биохимические и функциональные особенности нейтрофильных гранулоцитов .....	9
2.2.1 Гранулярный аппарат нейтрофилов .....	10
2.2.2 Нейтрофильные внеклеточные ловушки .....	12
2.2.3. Кислородзависимая и кислороднезависимая антимикробные системы нейтрофилов .....	13
2.3 Антимикробные пептиды. Общая информация .....	14
2.3.1 История открытия .....	14
2.3.2 Механизм действия АМП.....	14
2.3.2.1 Взаимодействие АМП с клеточными мембранами .....	15
2.3.3. Другие биологические эффекты АМП .....	17
2.3.4 Классификация антимикробных пептидов .....	18
2.3.4.1 Дефенсины .....	18
2.3.4.2 Кателицидины .....	19
2.3.4.3 Гистатины .....	21
2.4 Антибиотики, применяемые в медицине .....	22
2.4.1 Класс бета-лактамовых антибиотиков. Оксациллин .....	22
2.4.2 Класс аминогликозиды. Амикацин .....	24
2.4.3 Класс Фторхинолоны. Офлоксацин .....	25
2.5 Протегрин-1.....	27
2.5.1 Протегрин. Активность.....	28
2.5.2 Эффективность.....	28
3 Материалы и методы исследования .....	30
3.1 Материалы .....	30
3.2 Твердофазный синтез по Меррифилду .....	31
3.2 Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография .....	31
3.3 Аналитический электрофорез в кислой буферной системе в присутствии мочевины .....	32
3.3 Определение концентрации белка в пробе спектрофотометрическим методом с использованием коэффициента молярной экстинкции ( $\epsilon$ ) .....	32
3.4 Конъюгация протегина с амикацином .....	33
3.4.1 Конъюгация с использованием кросслинкера DSP .....	33

3.4.2 Конъюгация с использованием сукцинового ангидрида и этилдиметиламинопропилкарбодиимида в качестве кросслинкера .....	33
3.5 Оценка антимикробной активности исследуемых препаратов (антимикробных пептидов, антибиотических соединений).....	34
3.5.1 Метод серийных разведений в жидкой питательной среде, содержащей микроорганизмы .	34
3.5.2. Оценка совместного микробоцидного действия исследуемых антимикробных пептидов и антибиотических соединений методом серийных разведений по принципу "шахматной доски" ..	36
3.6 Анализ гемолитической активности препаратов .....	38
4.1 Твердофазный синтез структурного аналога протегрина 1.....	39
4.2 Очистка и оценка чистоты полученного пептида .....	41
4.3 Оценка антимикробной активности структурных аналогов протегрина 1.....	44
4.4 Исследование активности протегрина 1 и различных антибиотических соединений в отношении бактерий.....	45
4.4.1 Изучение антибактериальной активности индивидуальных фракций различных антибиотиков (амикацина, офлоксацина, оксациллина), а также протегрина 1 в отношении различных бактерий .....	45
4.4.2 Изучение совместного антибактериального действия протегрина 1 и различных антибиотических соединений (амикацина, офлоксацина, оксациллина) .....	47
4.5 Изучение антимикробного действия конъюгатов протегрина с амикацином .....	49
4.5.1 Получение конъюгатов протегрина 1 с амикацином.....	49
4.5.2 Изучение активности полученных конъюгатов против различных бактерий .....	51
4.6 Оценка гемолитической активности структурных аналогов протегрина 1 и его конъюгата с амикацином в отношении эритроцитов человека .....	52
6 Заключение .....	56
7 Выводы .....	57
8 Список литературы .....	58

## Обозначения и сокращения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная ДНК

тРНК – транспортная РНК

мРНК – матричная РНК

АО – аминокислотный остаток

ГКГС- (HLA-) комплекс – главный комплекс гистосовместимости

ИФН – интерферон

АМП – антимикробные пептиды

hBD – human Beta Defensin

hCAP – human cationic antimicrobial protein

IL (ИЛ) – интерлейкин

PG (ПГ) – протегрин

РАМП – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

ЛПС – липополисахариды

NETs (НВЛ) – нейтрофильная внеклеточная ловушка

МПО – миелопероксидаза

БПУ – бактерицидный проницаемость-увеличивающий белок

ФЛ – фосфолипиды

ПСБ – пенициллинсвязывающий белок

PRSA – пенициллинорезистентный *S. aureus*

MRSA – метициллинорезистентный *S. aureus*

АГМФ – аминогликозидмодифицирующий фермент

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

иФИК – индекс фракционных ингибирующих концентраций

## 1 Введение

### Актуальность

В 1928 г. британский бактериолог Александр Флеминг выделил пенициллин из плесневых грибов *Penicillium rubens*. Со времен этого открытия фармацевтами были созданы тысячи различных антибиотиков. Многолетняя ожесточенная борьба с патогенными микроорганизмами привела к появлению множества устойчивых к антибиотикам форм бактерий. Оказалось, что почти все бактерии со временем способны стать резистентными к практически любым антибиотикам [1]. Принципиально новым классом природных антибиотиков являются антимикробные пептиды (АМП) – олигопептиды (20-40 аминокислотных остатков, в среднем), задействованные в системе врожденного иммунитета и способные уничтожить патогенные микроорганизмы.

Известно, что система врожденного иммунитета принимает участие во многих процессах, направленных на адаптацию организма к различным неблагоприятным условиям, что привлекает все больше внимания к ее изучению [2-9]. Антимикробные пептиды, которые содержатся в основном в лизосомоподобных гранулах нейтрофилов, являются одними из ключевых эффекторных молекул системы врожденного иммунитета. Показано, что за исключением антимикробной активности, АМП обладают более широким спектром биологической активности, например:

- стимулируют хемотаксис макрофагов, нейтрофилов, незрелых дендритных клеток [10,11];
- связывают бактериальные липополисахариды [12];
- влияют на процессинг ИЛ-1 [13];
- влияют на функциональную активность и метаболизм тромбоцитов [14];

АМП имеют множественные мишени в бактериальных клетках, большинство пептидов, в первую очередь, нарушает структурную целостность мембран бактерий, поэтому гибель бактерий осуществляется в короткие сроки, и выработка резистентности значительно менее вероятна, чем в случае применяемых в клинике антибиотиков. Для многих АМП доказано эффективное антимикробное действие в отношении мультирезистентных штаммов бактерий. Это все позволяет рассматривать АМП как перспективную основу для создания новых лекарственных препаратов с антибиотической и иммуномодулирующей активностью, которые могут оказаться хорошей альтернативой существующим антибиотикам.

Однако препятствием для немедленного внедрения препаратов на основе АМП в медицину является то обстоятельство, что у наиболее активных пептидов имеется некоторая токсичность для клеток макроорганизма. Поэтому используются разнообразные подходы к изменению свойств пептидов для снижения их токсичности.

Одним из наиболее активных в отношении широкого спектра бактерий пептидом является протегрин 1 – пептид семейства кателицидинов, лейкоцитов свиньи, имеющий конформацию бета-шпильки. Этот пептид был впервые выделен из лейкоцитов в ходе совместной работы сотрудников Института экспериментальной медицины и лаборатории профессора Роберта Лерера Калифорнийского университета Лос-Анджелеса. Наличие высокой антибактериальной активности позволяет рассматривать протегрин 1 в качестве перспективного прототипа антибиотического препарата для борьбы с инфекциями, вызываемыми антибиотико-резистентными бактериями. Как и в случае многих эффективных АМП протегрин 1 имеет нежелательные эффекты – проявляет некоторую гемолитическую активность в отношении клеток человека. Поэтому для создания на основе протегрина 1 медицинского препарата, безопасного для применения в клинике, необходимо найти пути для оптимизации свойств пептида.

## Цели и задачи

Целью ВКР является поиск подходов к созданию прототипов новых антибиотиков на основе протегрина-1.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- Твердофазный химический синтез и очистка пептида - аналога PG-1;
- Сравнительный анализ антимикробной активности структурных аналогов PG-1 и их гемолитического действия на эритроциты человека *in vitro*;
- Анализ совместного действия PG-1 и применяемых в клинике антибиотиков в отношении антибиотико-резистентных бактерий;
- Конъюгация PG-1 с антибиотиком, в комбинации с которым наблюдалось синергическое антимикробное действие;
- Оценка антимикробной активности полученных конъюгатов и их гемолитических свойств.

В результате проведенной работы будут получены новые данные, способствующие разработке эффективного антибиотика на основе АМП семейства кателицидинов – протегрина 1.

## 2. Обзор литературы

### 2.1 Врожденный и приобретенный иммунитет

Ежедневно организм человека подвергается атаке миллионов патогенов через кожные покровы, пищеварительный тракт, дыхательные пути и мочеполовую систему. Защищают эти органы различные механические и физиологические барьеры: кожа, слизистые, кислый рН желудочного сока, пота и т.д.; слюна, мокрота, слезы и другие биологические жидкости способствуют выведению патогенных микроорганизмов. Развитие инфекционного процесса возможно при нарушении защитных покровов и попадании патогенов вследствие этого в организм. Однако иммунная система, включающая в себя механизмы врожденного и приобретенного иммунитета, может обеспечивать необходимую защиту от инфекции.

Под врожденным иммунитетом понимают выработанную в процессе филогенеза генетически закрепленную невосприимчивость индивида к какому-либо чужеродному агенту. Это комплекс механизмов, направленных на распознавание и уничтожение экзогенных патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (РАМР), включающие в себя характерные для микроорганизмов молекулы, например, липополисахариды (ЛПС), пептидогликаны, липотейховые кислоты, бактериальные или вирусные нуклеиновые кислоты и т.д. [15,16]. Также система врожденного иммунитета активируется при контакте с некоторыми эндогенными молекулами, которые могут появиться при повреждениях, инфекции и других условиях стресса. Врожденный иммунитет обеспечивает распознавание и элиминацию патогенных микроорганизмов в первые несколько часов после их попадания в организм, при отсутствии механизмов адаптивного иммунитета.

Функционирование системы врожденного иммунитета осуществляется с помощью разнообразных эффекторных клеточных элементов, таких как, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы, базофилы, NK- и NKT-клетки, и с помощью таких гуморальных факторов, как естественные антитела, цитокины, элементы системы комплемента, белки острой фазы, катионные противомикробные пептиды, лизоцим и другие.

Клетки системы врожденного иммунитета не образуют клонов – это основное отличие данной системы от системы приобретенного иммунитета. Молекулы и рецепторы системы приобретенного иммунитета закладываются на ранних этапах онтогенеза из небольшого набора зародышевых генов. Несмотря на это, система адаптивного иммунитета



имеет большое число антигенраспознающих вариантов, формирующееся в течение жизни индивида под действием различных антигенов. Основной особенностью адаптивного иммунитета является то, что соматически перегруппировавшиеся гены иммуноглобулинов и TCR не наследуются – от родителей потомки получают набор зародышевых генов и формируют затем свой спектр элементов иммунитета. Обязательным условием для инициации адаптивного иммунного ответа является активация врожденного иммунитета.

Ключевыми эффекторными клетками врожденного иммунитета считаются нейтрофильные гранулоциты, которые первыми попадают в очаг воспаления и проявляют свои биологические функции еще до появления других типов клеток. Зрелые нейтрофилы – короткоживущие клетки, использующие в борьбе с патогенами такие методы, как фагоцитоз [17], образование активных форм кислорода [18], секреция разнообразных протеолитических ферментов [19], а также за счет секреции в околоклеточное пространство физиологически активных пептидов, обладающих антибиотическим действием [20].

## **2.2 Морфо-биохимические и функциональные особенности нейтрофильных гранулоцитов**

Нейтрофильные гранулоциты представляют собой сферические клетки с дольчатым сегментированным ядром, неспособные к митотическому делению. Нейтрофилы содержат большой репертуар рецепторов, которые позволяют реагировать на самые небольшие изменения гомеостаза. На мембране нейтрофильных гранулоцитов происходит экспрессия рецепторов к различным лигандам, таким как цитокины, иммуноглобулины, мембранные молекулы других клеток. Также нейтрофилы экспрессируют различные антигенные детерминанты: МНС I, интегрины, селектины и их рецепторы, рецепторы для хемоаттрактантов, хемокинов, компонентов комплемента, также происходит экспрессия рецепторов к бактериальным липополисахаридам и т.д. Сохранение пула рецепторов происходит внутриклеточно в гранулярном аппарате нейтрофильных гранулоцитов, то есть на мембране секреторных везикул, желатиназных и специфических гранул, а под воздействием активаторов рецепторы транслоцируются на поверхностную мембрану [21].

Наличие таких лизосомоподобных гранул в цитоплазме является самой характерной морфологической особенностью нейтрофилов. Гранулы играют важную роль в их функционировании, поскольку являются депо антимикробных соединений, секретирующихся при различного рода стимуляциях.

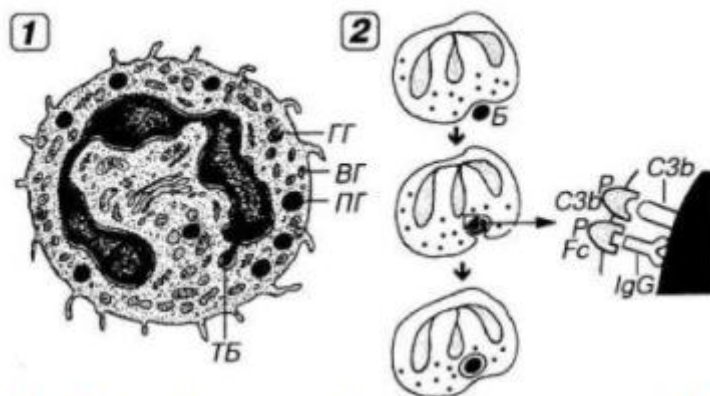


Рисунок 1 – Сегментоядерный нейтрофильный гранулоцит. 1 – Ультраструктурная организация: ПГ – первичные гранулы, ВГ – вторичные гранулы, ГГ - гранулы гликогена, ТБ – тельце Барра. 2 – фагоцитоз бактерии нейтрофилом: последовательные стадии адгезии нейтрофила к микробной клетке до ее захвата с формированием фагосомы [22].

### 2.2.1 Гранулярный аппарат нейтрофилов

В гранулярном аппарате и секреторных везикулах нейтрофильных гранулоцитов сконцентрирован цитолитический и цитотоксический потенциал этих клеток. Существуют три основных типа гранул нейтрофилов:

- Первичные, или азурофильные, содержащие различные гидролазы, миелопероксидазу,  $\beta$ -галактозидазу, лизоцим, нейтральные протеазы, а также дефенсины, кателицидины, лактоферрин, гранулофизин и другие вещества [23];
- Вторичные, или специфические, содержащие основные катионные белки, лизоцим, щелочную фосфатазу, лактоферрин, NADPH-оксидазу
- Третичные, или желатиназные
- Секреторные везикулы, содержащие преимущественно щелочную фосфатазу

Поскольку гранулярные белки имеют различную локализацию, они сохраняют нативную конформацию, что защищает их от воздействия протеаз. Азурофильные гранулы, например, секретируют протеолитические ферменты и другие молекулы в фагосомы, в то время как специфические секретируют антибиотические белки и в фагосомы, и во внеклеточное пространство, а желатиназные гранулы обеспечивают экспрессию металлопротеиназ, участвующих в деградации основных компонентов базальной мембраны.

Секреторные везикулы, которые находятся в цитоплазматическом пространстве нейтрофилов наряду с лизосомальными гранулами, содержат мембранные белки, необходимые для инициации адгезии нейтрофилов к активированным эндотелиальным клеткам и дальнейшей миграции нейтрофилов к ткани в ходе воспалительного процесса (рисунок 2).

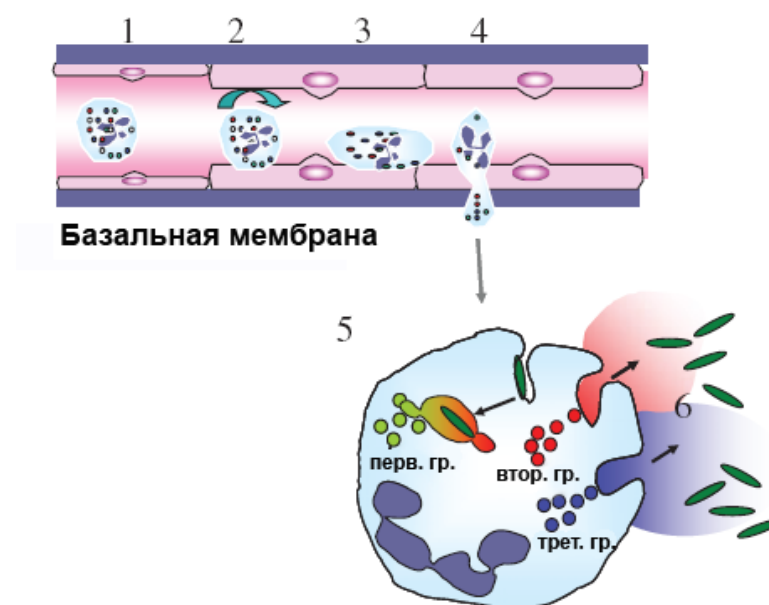


Рисунок 2 - Нейтрофил в процессе диапедеза. 1) Нейтрофил в сосудистом русле; 2) При развитии воспалительного процесса на поверхности эндотелиальных клеток появляются селектины, которые связываются с селектином нейтрофилов и PSGL1 (P-selectinglycoprotein ligand 1), присутствующим на концах микроворсинок неактивированных нейтрофилов [24], притягивая нейтрофилы, которые затем медленно «катятся» вдоль эндотелия; 3) Секреторные везикулы мобилизованы и доставляют  $\beta 2$  интегрины к поверхности.  $\beta 2$  интегрины активируются при inside-out signaling, опосредованном кинделином-3. Активированные эндотелиальные клетки экспрессируют ICAM-1 и ICAM-2 (intercellular adhesion molecule -1 and -2), которые служат лигандами для нейтрофильных  $\beta 2$  интегринов; 4) Инвазия нейтрофилов через сосудистую базальную мембрану, сопровождающаяся высвобождением протеаз и желатиназных гранул и продукцией активных форм кислорода, которые вызывают локальную деструкцию внеклеточного матрикса, что и позволяет нейтрофилам мигрировать в ткани. 5) Захват микроорганизмов в фагоцитарные вакуоли, сопровождающийся высвобождением содержимого азурофильных и специфических гранул в фагосомы, а также секрецией содержимого специфических и желатиназных гранул во внеклеточное пространство (6) [25].

Одним из пусковых факторов в многочисленных заболеваниях, сопряженных с воспалением, является дегрануляция нейтрофилов [26,27], механизм ее контроля до сих пор не ясен. Показано, что рецептор-опосредованный выброс содержимого гранул зависит от

активации различных сигнальных путей, протекающих с участием src семейства тирозинкиназ, бета-арестинов, тирозин-фосфатазы MEG2, киназы MARCK, Rabs и SNARE; Rho, GTP-азы, Rac2. Некоторые из этих путей необходимы для слияния мембраны гранул и плазматической мембраны, происходящего в ходе экзоцитоза [28]. Процесс высвобождения содержимого гранул нейтрофилов вызывается рецептор-опосредованным механизмом, называемым «регулируемый экзоцитоз». Этот механизм осуществляется в 4 этапа:

1. Рекрутирование гранул из цитоплазмы и продвижение их к плазматической мембране, которое зависит от ремоделирования актинового цитоскелета и сборкой микротрубочек [29];
2. Размещение гранул на мембране, которое ведет к контакту внешней поверхности липидного слоя гранулярной мембраны и внутренней поверхности плазматической мембраны;
3. Подготовка к слиянию гранул с мембраной, начинающееся с образования обратимых порообразных структур между гранулярной и плазматической мембраной;
4. Быстрое расширение пор слияния, ведущее к полному слиянию мембраны гранул с ЦПМ и высвобождению содержимого гранул во внеклеточное пространство.

Еще одной формой реализации физиологических функций нейтрофилов, как предполагается, является образование нейтрофильных ловушек.

### **2.2.2 Нейтрофильные внеклеточные ловушки**

На сегодняшний день известно, что нейтрофилы сохраняют свою антимикробную активность даже после того, как клетка заканчивает свой антимикробный цикл.

Neutrophil extracellular traps (NETs), НВЛ или нейтрофильная внеклеточная ловушка – альтернатива клеточной гибели путем некроза или апоптоза. При ее формировании начинается процесс клеточной гибели путем некроза (ядра клеток набухают, тяжи деконденсированной ДНК выходят из клеток, неся связанные с ДНК белки (гистоны), а также белки из цитоплазмы, гранул (которые дезинтегрируют в тот же момент времени, когда распадается клеточное ядро [30,31,32]. Эти тяжи ДНК, несущие связанные с ними белки и образуют НВЛ. В составе таких ловушек было обнаружено 24 белка нейтрофилов [33], это – катионные антимикробные белки и пептиды (гистоны, дефенсины, эластаза, протеиназа 3, гепарин-связывающий белок, катепсин G, лактоферрин, миелопероксидаза

[33], а также паттерн-распознающая молекула – пентраксин 3 [34]. Механизм формирования ловушек до сих пор остается неясным.

В целом, вклад НВЛ в общую антимикробную активность пока неясен, и роль этих ловушек в осуществлении функций нейтрофилов в классическом понимании их микробоцидного действия тоже трудно оценить.

### **2.2.3. Кислородзависимая и кислороднезависимая антимикробные системы нейтрофилов**

Высокая степень надежности защитных реакций организма обеспечивается совокупностью действий различных по природе и механизму действия антимикробных веществ, содержащихся в гранулярном аппарате нейтрофилов. Антимикробные факторы нейтрофилов обычно разделяют на кислородзависимые и кислороднезависимые [7].

К кислородзависимым элементам антимикробной системы можно отнести супероксидный радикал, образующий в результате реакции диспропорционирования пероксид водорода, который в свою очередь может либо вступать в реакцию со свободной молекулой супероксида и образовывать гидроксильный радикал и синглетный кислород (токсичные производные кислорода), либо принимать участие в составе миелопероксидазной системы. МПО-система, также относящаяся к кислородзависимым элементам, включает в себя гемсодержащий фермент миелопероксидазу, пероксид водорода и кофакторы. Она обладает многонаправленным действием на структуры и обменные процессы бактерий, грибов и вирусов [20, 35], что обуславливается разнообразными механизмами ее антимикробного действия.

В инфекционных очагах воспаления часто может возникать гипоксия, поэтому чтобы восполнить низкую эффективность защиты существует кислороднезависимая антимикробная система, компонентами которой являются лизоцим, различные протеиназы и неферментные катионные белки, к которым относятся антимикробные пептиды, лактоферрин, БПУ-белок и другие. К настоящему времени сложилось мнение, что ключевую роль в осуществлении защитной функции кислород-независимой системы играют именно эти соединения [5; 8; 12; 36; 37]

## **2.3 Антимикробные пептиды. Общая информация**

### **2.3.1 История открытия**

Антимикробные пептиды являются неотъемлемой частью врожденного иммунитета человека, но их роль в формировании иммунного ответа стали изучать не так давно.

Одними из первых выделенных пептидов животного происхождения были цекропины – АМП гемолимфы гусениц шелкопряда *Hyalophora cecropia*. Они обладали высокой антимикробной активностью (несколько более выраженной в отношении грамотрицательных бактерий). Вслед за цекропинами был обнаружен ряд других соединений из гемолимфы некоторых насекомых – одни избирательно действуют на грамположительные бактерии, другие – на патогенные грибы [38].

В 1980 г. из альвеолярных макрофагов кролика R. Lehrer с коллегами выделил и охарактеризовал антимикробные пептиды, назвав их дефенсинами, которые затем были найдены у людей, мышей и других млекопитающих.

Первый человеческий  $\beta$ -дефенсин был выделен K. W. Vensch в 1995 г. в процессе изучения диализата гемофильтра искусственной почки человека. Это был пептид, состоящий из 36 АО – hBD-1. На сегодняшний день в человеческом организме найдено и выделено 6  $\beta$ -дефенсинов.

### **2.3.2 Механизм действия АМП**

Антимикробные пептиды способны быстро уничтожать клетки-мишени, некоторые из них обладают широким спектром действия, активностью в отношении штаммов, резистентных к антибиотикам.

Выделяют два основных типа воздействия АМП на клетки:

- Нарушение целостности клеточной мембраны;
- Ингибирование метаболических процессов;

В основном АМП вызывают гибель клетки по первому механизму. По второму механизму действуют всего несколько типов АМП, среди которых – лантибиотики, селективно связывающиеся с предшественником бактериальной стенки [39]. Для достижения плазматической мембраны бактерии пептиды должны преодолеть несколько слоев клеточной стенки. Обычно пептиды без труда достигают плазматической мембраны, разрушение которой приводит к гибели клетки.

### 2.3.2.1 Взаимодействие АМП с клеточными мембранами

Антибиотическая активность антимикробных пептидов в основном связана с их способностью действовать на липидные клеточные мембраны [40], что обеспечивается амфипатической структурой и положительным зарядом АМП, обуславливающих гидрофобные и электростатические взаимодействия [41]. Скорость осуществления процесса киллинга микроорганизмов у пептидов различается, однако независимо от механизма их действия предполагаются следующие этапы дезактивации бактерий [42]:

1. Электростатическое взаимодействие антимикробных пептидов, имеющих положительный заряд, с отрицательно-заряженными компонентами бактериальной клеточной стенки (рисунок 3), и их сорбция на поверхности микроорганизмов [43];
2. Проникновение либо через капсулу (у грамотрицательных бактерий), либо через клеточную стенку (у грамположительных бактерий), состоящие из пептидогликана. Данный этап остается малоизученным, несмотря на большое количество работ [42].

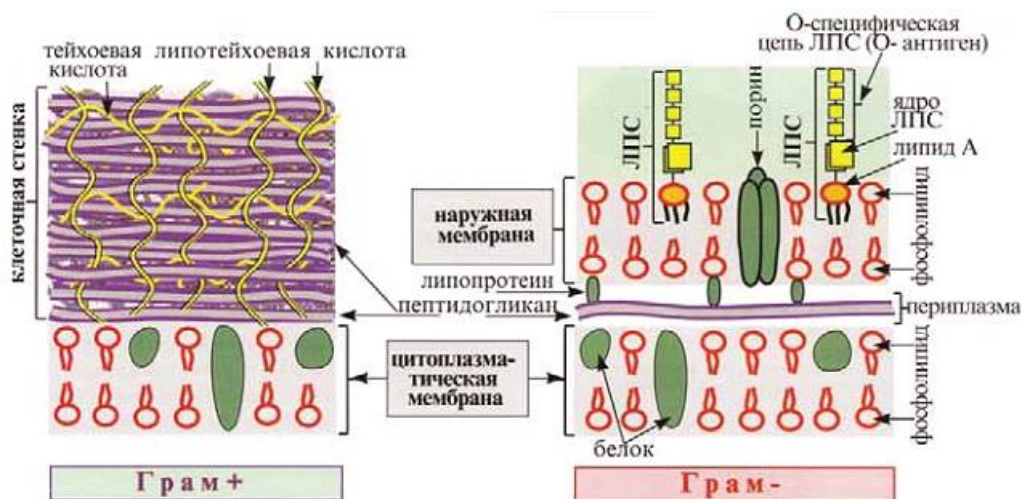


Рисунок 3 - Оболочки грамположительных и грамотрицательных бактерий [44].

3. Разрушение мембраны бактериальной клетки за счёт встраивания антимикробного пептида, в результате чего клетка теряет жизненно важные компоненты через отверстия в мембране, диссипация потенциала мембраны, дезорганизация мультиферментных комплексов. К бактериальной гибели приводят в результате: подавление дыхания,

процессов биосинтеза белка и иных процессов метаболизма клетки, и наконец накопление воды, способное вызвать осмотический лизис [43].

На сегодняшний день выделяют три основных механизма мембранолитического действия антимикробных пептидов:

Модель ковра, ковровый механизм – адсорбируясь на поверхности мембраны, пептиды располагаются параллельно поверхности мембраны, образуя сплошной слой («ковёр»). При достижении определенной концентрации некоторые пептиды проникают в мембрану, формируя поры и образуя мицеллы, в результате чего происходит разрыв мембраны;

- Модель «склепка бочки». Антимикробные пептиды адсорбируются перпендикулярно плоскости мембраны – гидрофобными областями ориентируясь в сторону липидных хвостов мембранных фосфолипидов, а гидрофильными образовывая внутреннюю поверхность поры;
- Модель «тороидальной поры». Пептиды встраиваются в мембрану в перпендикулярной ориентации, образуя канал. Гидрофильные области пептидов остаются электростатически связаны с головками ФЛ, так что в зоне поры мембранные ФЛ оказываются ориентированы не поперёк, а вдоль плоскости мембраны [42].

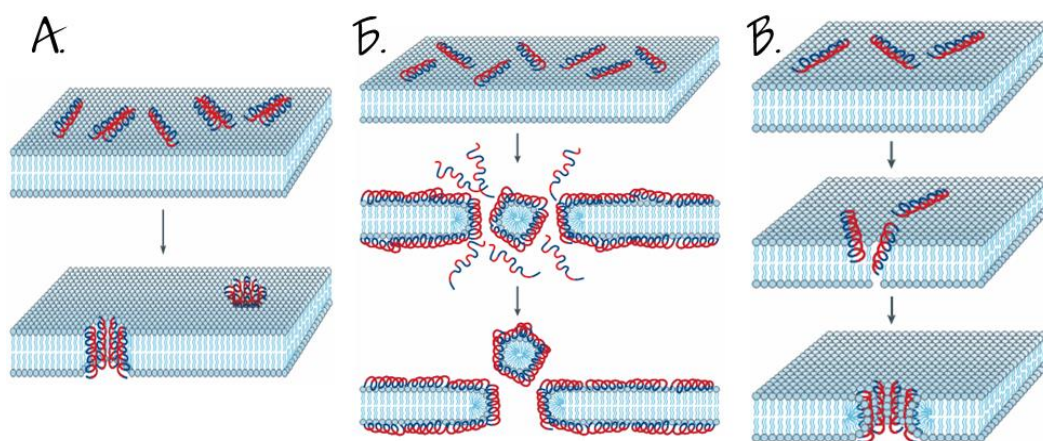


Рисунок 4 - Механизмы мембранолитического действия АМП. А – модель бочарной клепки, Б – ковровый механизм, В – формирование тороидальных пор [42].

На сегодняшний день известно, что в зависимости от условий эксперимента пептиды могут действовать в соответствии с различными моделями [41]. Также для ряда антимикробных пептидов показано, что вышеуказанные механизмы являются не единственным механизмом бактериального киллинга [42].



Избирательность антимикробных пептидов по отношению к бактериальным клеткам, в сравнении с эукариотическими, связывается с различием в липидном составе мембран. Мембраны бактериальных клеток содержат множество кислых фосфолипидов, а в мембранах животных клеток содержатся нейтральные ФЛ, к которым пептиды проявляют меньшее сродство. Также дополнительную устойчивость от проникновения антимикробных пептидов клеткам млекопитающих придает холестерин [41]. Несмотря на это, некоторые пептиды обладают цитотоксическим эффектом (проявляют мембранолитическую активность), в частности в отношении опухолевых клеток [45].

### 2.3.3. Другие биологические эффекты АМП

Первоначально антимикробные пептиды вызвали интерес лишь за счёт своих антимикробных свойств, однако в последние годы внимание начинают уделять их иммуномодулирующим свойствам [45].

В настоящее время показано, что пролин-богатый пептид PR-39 может оказывать влияние на продукцию поверхностных клеточных протеогликанов (синдекан-1 и -4), которые играют важную роль в механизмах заживления ран, к примеру, во взаимодействии гепарин-связывающих факторов роста с мембранами. Так же существуют исследования, показывающие, что PR-39 также является хемоаттрактантом для нейтрофилов, похожие свойства в отношении нейтрофилов, моноцитов и Т-клеток имеет кателицидин LL-37 [46].

Сепсис – системное воспаление, развивающееся из-за попадания в кровоток большого числа компонентов клеточных стенок бактерий, которое сопровождается гиперактивацией иммунной системы. У грамотрицательных бактерий основным эндотоксином является липополисахарид клеточной стенки. Он связывается при помощи ЛПС-связывающего белка (LBP) и в комплексе с ним взаимодействует с поверхностными рецепторами моноцитов, в результате чего происходит выброс провоспалительных медиаторов. Антимикробные пептиды могут напрямую связывать бактериальные ЛПС, блокируя таким образом взаимодействие эндотоксинов с LBP и нейтрализуя эффект стимуляции иммунного ответа.

Антимикробные пептиды, обладающие мембранолитическими свойствами, также в той или иной степени обладают цитотоксичностью в отношении эукариотических клеток. Одними из наиболее чувствительных к ним являются раковые клетки и активно делящиеся. На примере ряда пептидов показано, что кателицидины могут принимать участие в регенерации тканей, являться хемоаттрактантами для иммунных клеток в процессе

воспаления, связывать компоненты разрушенных клеток микроорганизмов (в том числе ЛПС), оказывать цитотоксические эффекты. Однако физиологическую значимость данных процессов оценить сложно, так как продукция кателицидинов, как было упомянуто выше, видоспецифична [46].

### 2.3.4 Классификация антимикробных пептидов

Антимикробные пептиды обладают рядом общих свойств вне зависимости от их структуры и аминокислотной последовательности. Они все синтезируются в виде молекулы-предшественника с сигнальной последовательностью, модифицирующейся в дальнейшем в результате либо отщепления части последовательности, либо гликозилирования или галогенирования. Практически все антимикробные пептиды – амфипатические молекулы, содержащие взаимодействующий с липидами гидрофобный участок и гидрофильный, реагирующий с водой и различными анионами. Как правило, молекулы антимикробных пептидов обладают положительным зарядом, что позволяет им взаимодействовать с отрицательно заряженными бактериальными мембранами. На основе их структуры выделяют четыре класса АМП:

- молекулы, обладающие бета-складчатой структурой, стабилизирующейся за счет 2-3 дисульфидных связей;
- молекулы, обладающие альфа-спиральной структурой
- линейные пептиды
- петлевидные пептиды (петля образуется за счет образования единственной дисульфидной связи)

На сегодняшний день в человеческом организме обнаружено 3 семейства эндогенных антимикробных пептидов – дефенсины, кателицидины, гистатины.

#### 2.3.4.1 Дефенсины

Дефенсины – это катионные амфипатические пептиды длиной 30–42 аминокислот и трехнитевой  $\beta$ -пластинчатой структурой, содержащей три дисульфидные связи. По характеру расположения дисульфидных связей дефенсины разделяют на три семейства –  $\alpha$ -,  $\beta$ - и реже встречающиеся (только у некоторых приматов)  $\theta$ -дефенсины. В организме человека присутствуют два вида —  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефенсины. В здоровом организме в плазме можно обнаружить очень низкий уровень дефенсинов, но, к примеру, в условиях сепсиса, их содержание многократно возрастает.

$\alpha$ -Дефенсины в организме в основном содержатся в нейтрофилах, поэтому  $\alpha$ -дефенсином человека присвоена аббревиатура HNP (human neutrophils peptides). Они принимают участие в кислород-независимом механизме уничтожения фагоцитированных микробов. Другие представители  $\alpha$ -дефенсинов – HD – экспрессируют клетки Панета и некоторые клетки эпителия двенадцатиперстной кишки.

В эпителии слизистых всех отделов ЖКТ, коже, поджелудочной и слюнных железах и в некоторых лейкоцитах обнаруживается наличие  $\beta$ -дефенсинов. Некоторые грибы продуцируют  $\beta$ -дефенсиноподобные молекулы. Человеческий  $\beta$ -дефенсин 1 экспрессируется в организме постоянно, в отличие от hBD-2 и hBD-3, экспрессия которых происходит в ответ на действие провоспалительных цитокинов или микроорганизмов. Взаимодействуя с дендритными клетками кишечника,  $\beta$ -дефенсины могут регулировать хемотаксис ДК к микроорганизмам вместе с Т-клетками. Кроме того, они стимулируют продукцию интерлейкина-8 и хемотаксис нейтрофилов, вызывают дегрануляцию тучных клеток, ингибируют процесс фибринолиза.  $\beta$ -дефенсин hBD-1 играет важную роль в защите кишечного эпителия, предупреждая адгезию микроорганизмов в отсутствие воспаления.

Кроме того, в организме обезьян были найдены циклические АМП с высокой анти-ВИЧ активностью -  $\theta$ -дефенсины. В клетках красного костного мозга человека были выявлены транскрипты генов гомологов  $\theta$ -дефенсинов, но в их сигнальной последовательности присутствует стоп-кодон, который препятствует их трансляции [47; 48].

#### **2.3.4.2 Кателицидины**

Кателицидины – это катионные амфипатические пептиды разнообразной линейной,  $\alpha$ -спиральной или  $\beta$ -шпилькообразной структуры, содержащиеся в специфических гранулах нейтрофилов, различных эпителиальных клетках, присутствующие во многих биологических жидкостях организма. Продуцируются кателицидины как результат протеолиза С-концевого участка белка-предшественника, содержащего кателиновый домен (рисунок 5).

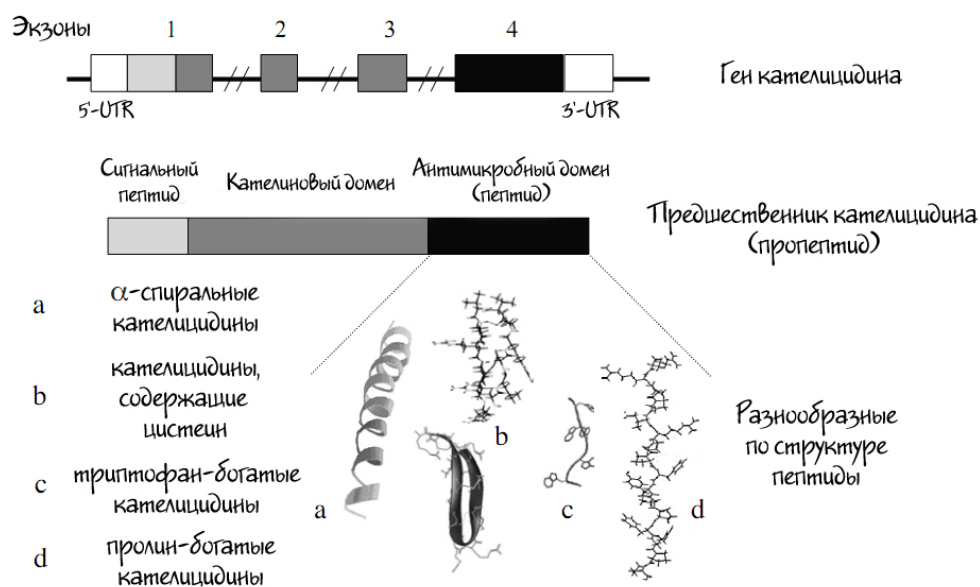


Рисунок 5 - Схема строения кателицидина, его гена и предшественника [49].

В лейкоцитах и эпителиальных клетках человека экспрессируется только один предшественник кателицидинов - hCAP18, расщепляющийся с образованием пептида LL-37 (37 аминокислот) и далее – целого набора более коротких пептидов с измененными свойствами. Также hCAP18 выявляется при воспалительных процессах в лимфоцитах и моноцитах, в эпителии легочной ткани и кератиноцитах. Его антимикробный С-концевой фрагмент – LL-37 – проявляет активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов, некоторых вирусов и простейших. LL-37 проявляет синергический антибактериальный эффект с дефенсинами, может нейтрализовать способность бактериальных ЛПС индуцировать эндотоксический шок. Кроме того, он проявляет свойства хемотаксического агента для нейтрофилов, моноцитов и Т-клеток. Усиление его экспрессии наблюдается при кишечных инфекциях.

Зрелые кателицидины разнообразны по длине, аминокислотной последовательности и пространственной структуре. Среди них различают – аргинин и лизин богатые пептиды (например, LL-37), триптофан-богатые (индолицидин), пролин-богатые (бактенецины) и цистеин-содержащие (например, протегрины).

Протегрины – группа пептидов, выделенных из лейкоцитов свиньи [50], содержащие от 16 до 18 аминокислотных остатков и характеризующиеся наличием двух внутримолекулярных дисульфидных связей, а также амидированием по С-концевому аргинину.

В условиях *in vitro* протегрины, даже в небольших концентрациях проявляют активность в отношении широкого спектра микроорганизмов: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* [51], *Nesseria gonorrhoeae* [52], *Chlamydia trachomatis* [53], *Mycobacterium tuberculosis* [54], вирусов иммунодефицита человека [55]. Более подробно о биологической активности протегрина 1 будет изложено ниже (раздел 2.5).

К кателицидинам, помимо протегринов, относятся пептиды, выделенные из нейтрофилов крупного рогатого скота: козы и овцы – бактенецины, в частности Вас-5 и Вас-7. Бактенецины – катионные обогащенные пролином пептиды: проявляющие высокую антимикробную активность, не обладающие токсическим эффектом против эукариотических клеток даже при больших концентрациях (превышающих антимикробные) [56].

**Механизм действия** ряда кателицидинов, в том числе протегринов, связан с нарушением целостности структуры мембраны, в результате чего происходит утечка ионов из клетки и нарушение процессов жизнедеятельности микроорганизмов, приводящее к гибели.

**Совместные действия.** Махмуд Абу Алаива и его коллеги обнаружили синергический эффект, применяя кателицидин LL-37 с дефенсином hBD-3 и LL-37 с лизоцимом против *Streptococcus aureus*. Также авторы отметили, что при снижении pH среды не наблюдаются синергические эффекты действия этих комбинаций АМП.

#### 2.3.4.3 Гистатины

Гистатины – богатые гистидином пептиды, входящие в состав катионных низкомолекулярных белков, содержащиеся в секретах подчелюстной и подъязычной желез. Различаются они первичными последовательностями, длиной цепи и фосфорилированием. Гистатины выполняют различные функции, в числе которых:

1. Антибактериальные свойства;
2. Выделение гистамина из тучных клеток;
3. Подавление роста кристаллов гидроксиапатита;
4. Связывание танина.

Первоначально у гистатинов была выявлена фунгицидная активность, затем слабо выраженная бактерицидная (было показано, что они предупреждают агрегацию бактерий [57]).

Таким образом, АМП человека и животных – молекулы, имеющие разнообразные структуры и проявляющие много эффектов, которые могут иметь практическое значение. Интересное свойство некоторых АМП – наличие синергического антимикробного действия при использовании с рядом применяемых в клинике антибиотиков, например, антибиотиками класса аминогликозидов, фторхинолонов, бета-лактамов и др. Так как в данной дипломной работе тоже будет рассматриваться совместное действие пептида-объекта исследования с избранными антибиотиками, в обзоре литературы мы приводим характеристики этих антибиотиков.

## **2.4 Антибиотики, применяемые в медицине**

### **2.4.1 Класс бета-лактамовых антибиотиков. Оксациллин**

Бета-лактамовые антибиотики ( $\beta$ -лактамовые антибиотики,  $\beta$ -лактамы) – группа антибиотиков в структуре которых содержится  $\beta$ -лактамовое кольцо. Среди них различают пенициллины, цефалоспорины, карбопенемы и монобактамы. Действуя на бактериальные клетки, они нарушают синтез их клеточной стенки, таким образом действуют все  $\beta$ -лактамы, и это обусловлено сходством их химической структуры. Мишенью их действия являются пенициллин-связывающие белки бактерий, играющих важную роль в синтезе пептидогликана, блокирование синтеза пептидогликана соответственно приводит к гибели бактерий.

Оксациллин – антимикробный полусинтетический препарат группы пенициллинов, он является одним из основных антистафилококковых препаратов, используемых в России. Данный препарат уступает по уровню антимикробной активности природным пенициллинам, но он в отличие от них является устойчивым к гидролизу многими  $\beta$ -лактамазами. Оксациллин не активен в отношении большинства грамотрицательных бактерий, вирусов, грибов и простейших, но проявляет активность в отношении многих грамположительных бактерий: *Staphylococcus* spp. (в т.ч. продуцирующих пенициллиназу), *Streptococcus* spp., *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*; анаэробных спорообразующих палочек; грамотрицательных кокков (*Neisseria gonorrhoeae*, *N.meningitidis*); некоторых актиномицетов.

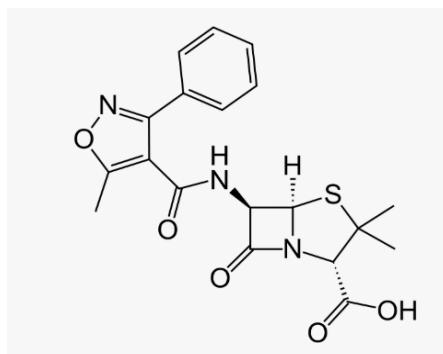


Рисунок 6 – Химическое строение молекулы оксациллина.

Как было сказано выше, оксациллин проявляет устойчивость к стафилококковым  $\beta$ -лактамазам, что позволяет ему быть высокоактивным в отношении большинства штаммов стафилококков, включая пенициллин-резистентные штаммы *S. aureus*. Появляются штаммы стафилококков, устойчивые к действию оксациллина, что может быть обусловлено тремя основными механизмами:

- Классическая резистентность к оксациллину (метициллину) – продукция ПСБ-2а (пенициллинсвязывающего белка), участвующего в синтезе клеточной стенки;
- Гиперпродукция  $\beta$ -лактамаз;
- Различные модификации нормальных пенициллинсвязывающих белков.

Важно различать штаммы с разными механизмами устойчивости, поскольку при инфицировании штаммами с классической резистентностью терапия любыми  $\beta$ -лактамными антибиотиками будет неэффективной.

Таблица 2. Антимикробная активность оксациллина [58]. \*

Микроорганизмы	МИК мкг/мл
<i>Staphylococcus aureus</i> (чувствительный к бензилпенициллину)	0,1-3,1
<i>Staphylococcus aureus</i> (устойчивый к бензилпенициллину — пенициллиназообразующий)	0,3-6,2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,01-0,4
<i>Streptococcus faecalis</i>	12,5-50 и более
<i>Streptococcus viridans</i>	0,1-3,1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,04-0,8

<i>Neisseria meningitidis</i>	0,12-6,2
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,4-12,5
<i>Proteus species</i>	устойчивы
<i>Escherichia coli</i>	устойчивы
<i>Salmonella spp.</i>	устойчивы

\* - Данные представлены, как минимальные ингибирующие концентрации (МИК) оксациллина

#### 2.4.2 Класс аминогликозиды. Амикацин

Аминогликозиды являются одним из давно открытых и хорошо изученных классов антибиотиков. По химическому строению аминогликозиды представляют собой гликозиды, состоящими из агликона (циклогексан с основными группами при C1 и C3 и гидроксильными группами при C4) и сахаров, большинство которых является аминсахарами. Аминогликозиды делят на 2 группы: стрептидинсодержащие (стрептомицин) и дезоксистрептаминсодержащие (канамицины, гентамицины, амикацин и другие).

Амикацин был получен из канамицина выделенного из *Streptomyces kanamyceticus* Умэдзавой и его сотрудниками в Японии в 1957.

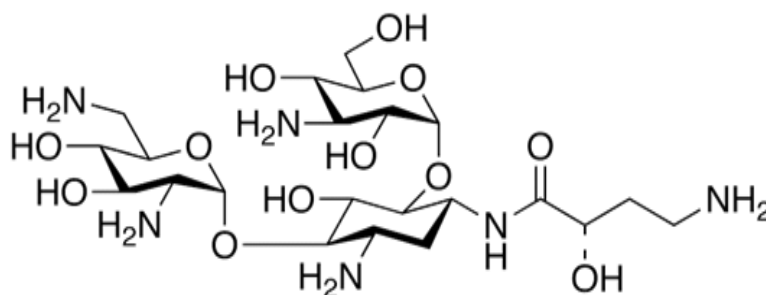


Рисунок 7 - Химическое строение молекулы амикацина.

Амикацин связывает 30S субъединицу рибосом, что препятствует образованию комплекса тРНК и мРНК и блокирует трансляцию, в более высоких концентрациях амикацин способен повреждать бактериальные цитоплазматические мембраны.

Антимикробная активность аминогликозидов значительно ниже в кислой и нейтральной среде, чем в слабощелочной. Амикацин и другие аминогликозиды II и III поколения обладают дозозависимой антимикробной активностью в отношении некоторых грамположительных микроорганизмов (*Staphylococcus spp.*, в том числе PRSA) и



следующих аэробных грамотрицательных: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. Некоторые показатели антибактериальной активности амикацина представлены в таблице 2. Кроме того, эти антибиотики неактивны против *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus maltophilia*.

Таблица 2. Антимикробная активность амикацина [59]. \*

<b>Грамотрицательные бактерии</b>	<b>МИК мкг/мл</b>
<i>Pseudomonas species</i>	1,6-12,5
<i>Proteus species</i>	1,6-3,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,6-3,1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,6-3,1
<i>Serratia species</i>	0,8-3,1
<i>Citrobacter freundii</i>	1-8
<i>Escherichia coli</i>	1,6-3,1
<b>Грамположительные бактерии</b>	
<i>Staphylococcus species</i> (кроме MRSA)	0,4-5

\* - Данные представлены, как минимальные ингибирующие концентрации (МИК) амикацина

В последнее время применение антибиотиков в медицине распространяется очень широко и не всегда оправданно. Это способствует развитию резистентности микроорганизмов к антибиотическим препаратам, в том числе аминогликозидам. Амикацин в настоящее время применяется очень осторожно при инфекционных заболеваниях, в тех случаях, когда аминогликозиды II поколения не справляются. Это делается для того, чтобы предотвратить появления устойчивых штаммов к амикацину.

#### 2.4.3 Класс Фторхинолоны. Офлоксацин

Офлоксацин – антибактериальное средство широкого спектра действия группы фторхинолонов II поколения [60], действующее на ДНК-гиразу, которая обеспечивает сверхспирализацию и, соответственно, стабильность бактериальной ДНК. Механизм взаимодействия офлоксацина с ДНК представлен на рисунке 9.

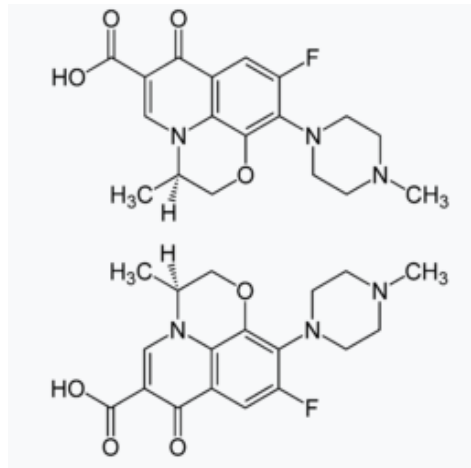


Рисунок 8 - Химическое строение молекулы офлоксацина.

Офлоксацин представляет собой рацемическую смесь L- и D- энантиомеров, в которой антибактериальная активность обусловлена L-изомером – левофлоксацином, а антимикробная активность непосредственно офлоксацина в два раза меньше [61]. Данная смесь проявляет антимикробную активность в отношении быстрорастущих атипичных микобактерий и микроорганизмов, продуцирующих  $\beta$ -лактамазы.

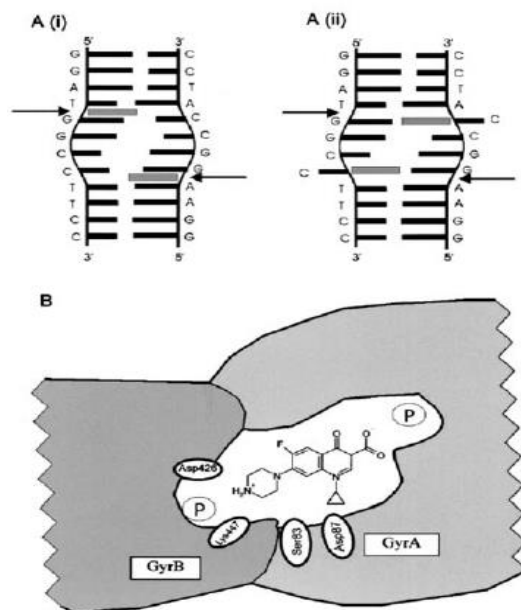


Рисунок 9 - Модель хинолонового кармана [62]

А) Взаимодействие хинолонов с молекулой ДНК, находящейся в активном центре фермента. Участки разрыва двойной спирали отмечены стрелками. Препарат представлен в виде серых прямоугольников. Предполагаемые варианты: А(і) - встраивание молекулы хинолона между нуклеотидами; А(іі) - вытеснение цитозина.

В) Хинолоновый карман в молекуле ДНК-гиразы. Нити ДНК отмечены **Р**. Ось ДНК перпендикулярна к плану рисунка. Выделены аминокислотные остатки в субъединицах А и В, критичные для взаимодействия с молекулой хинолона

Модификации ДНК-гиразы или топоизомеразы IV являются ведущими механизмами устойчивости ко фторхинолонам. Для подавления жизнедеятельности клетки необходимо ингибировать активность только одного фермента, соответственно, для хинолонов выделяют первичную и вторичную мишени. Первичная мишень – фермент, к которому используемый антибиотик проявляет наибольшее сродство. В России резистентность к фторхинолонам представляет проблему при лечении внутрибольничных инфекций.

Офлоксацин проявляет антимикробную активность в отношении грамположительных (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Listeria monocytogenes*) и грамотрицательных микроорганизмов, среди которых *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas* spp., различных анаэробных (*Enterococcus faecalis*) и внутриклеточных микроорганизмов (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma* spp.)

## 2.5 Протегрин-1

Последний раздел обзора литературы посвящен описанию структуры и функциональных свойств пептида, являющегося основным объектом исследования в данной дипломной работе, - протегрину 1. Протегрин 1 – антимикробный пептид, представляющий собой молекулу из 18 аминокислотных остатков, шесть из которых представлены аргинином, что и определяет высокий положительный заряд, а еще четыре – цистеины, составляющие два дисульфидных мостика. Третичная структура протегринина представляет собой  $\beta$ -шпильку, что обусловлено наличием дисульфидных связей. Подобная структура необходима для взаимодействия протегринина с клеточными мембранами и, соответственно, для проявления его антимикробных свойств. Установлено, что помимо антибактериальных свойств, протегрин 1 обладает цитотоксическим действием на клетки эритромиелоидной лейкемии человека K562, гистиоцитарной лимфомы человека U-937 и клетки промиелоцитарной лейкемии человека HL-60, клетки эпителиоидной карциномы легкого человека A-549, клетки эпидермоидной карциномы человека A-431, остеосаркомы человека MG-63 [63].

Многие нейтрофильные катионные пептиды, не считая антимикробной активности, проявляют и гемолитическую активность, что представляет проблему для использования их в качестве лекарственных препаратов, в связи с этим представляется интересным

выяснить, как изменение расположения и количества дисульфидных связей может влиять на биологическую активность пептида.

### 2.5.1 Протегрин. Активность

Протегрины проявляют антимикробную активность против грамотрицательных бактерий [64] (включая *Neisseria gonorrhoeae* [52] и *Chlamydia trachomatis* [53], грамположительных бактерий, включая штаммы, резистентные к используемым в клинике антибиотикам: MRSA и VREF [64], *Mycobacterium tuberculosis* [54], грибов [65], а также некоторых вирусов [55]). Протегрины также продемонстрировали высокую активность в отношении нескольких грамотрицательных перидонтальных патогенов, причем они оказались намного более эффективными, чем большинство других антимикробных пептидов [66]. В отличие от дефенсинов, они проявляют активность в растворах с физиологической концентрацией солей [67]. С использованием электрофизиологических методов показано, что PG-1 способен формировать ионные каналы в искусственных фосфолипидных бислоях и в овоцитах *Xenopus laevis* [52].

Активность PG-1 была исследована и на моделях *in vivo*: при перитонитах и бактериемиях у животных. Внутривенное введение PG-1 снижало количество летальных исходов у мышей при смертельных симптомах заражения MRSA или VREF. Кроме того, пептид повышал выживаемость мышей при тяжелых перитонеальных инфекциях, вызванных инъекцией *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Подобные эффекты позволяют рассматривать PG-1 в качестве кандидата для разработки на основе его структуры противоинфекционных агентов нового поколения, которые могут использоваться для лечения инфекций, вызванных микроорганизмами, устойчивыми к обычным антибиотикам. Однако до настоящего времени попытки создать препарат на основе структуры протегринов не увенчались успехом.

### 2.5.2 Эффективность

Большинство АМП проявляет антимикробную активность в диапазоне концентраций  $\sim 10^{-7} \div 10^{-6}$  моль/л, однако у них есть определенные преимущества: по сравнению с антибиотиками бактериального происхождения - широкий спектр действия, активность в отношении антибиотико-резистентных штаммов, способность быстро действовать на клетки-мишени и трудность при развитии к ним резистентности. Проявление цитотоксических свойств антимикробными пептидами обуславливает

применение их в качестве препаратов, использующихся без введения в кровь пациента, - для лечения заболеваний наружных покровов и слизистых. Например, сегодняшний день существует циклический антимикробный пептид рамопланин, находящийся на стадии клинических испытаний и предполагающийся для лечения инфекционных заболеваний дыхательных путей [68].

### 3 Материалы и методы исследования

#### 3.1 Материалы

В работе были использованы следующие реактивы и растворители: ацетонитрил (ос.ч.) (Sigma-Aldrich, США), акриламид (Sigma-Aldrich, США), N,N'-метиленбисакриламид (Acros Organics, Бельгия), N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин (Sigma-Aldrich, США), персульфат аммония, уксусная кислота, трифторуксусная кислота (Sigma-Aldrich, США), мочевины, метиленовый зеленый, краситель Кумасси G-250, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид EDC (Thermo Fisher, США), диметилсульфоксид ДМСО, гидрофосфат натрия (Sigma-Aldrich, США), дигидрофосфат натрия (Sigma-Aldrich, США), бульон Мюллера-Хинтон М391 (HiMedia, Индия), Fmoc-Rink amide AM resin, 100-200 mesh, емкость смолы 0,41ммоль/г (Iris Biotech, Германия), ОхумаPure (Iris Biotech, Германия), DIC (Iris Biotech, Германия), Fmoc-L-Cys(Acm)-ОН (Iris Biotech, Германия), Fmoc-L-Phe-ОН (Iris Biotech, Германия), Fmoc-L-Leu-ОН (Iris Biotech, Германия), Fmoc-L-Arg(Pbf)-ОН (Iris Biotech, Германия), Fmoc-Gly-ОН (Iris Biotech, Германия), Fmoc-L-Tyr(tBu)-ОН (Iris Biotech, Германия), N,N-Диметилформамид (DMF) (Вектон, Россия), метилен хлористый (Вектон, Россия), метанол (Sigma-Aldrich, США), диэтиламин (Sigma-Aldrich, США), триизопропилсилан (Sigma-Aldrich, США), эфир диэтиловый (Вектон, Россия), нингидрин (Sigma-Aldrich, США), фенол (Sigma-Aldrich, США), этанол (Sigma-Aldrich, США), цианид калия (Sigma-Aldrich, США), пиридин (Sigma-Aldrich, США).

Часть химически синтезированных пептидов была любезно предоставлена сотрудником отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ» П.М. Копейкиным.

Для проведения обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии использовали хроматографическую колонку Vydac C-18 (Fisher Scientific, США).

В работе использовали приборы: систему очистки воды Simplicity System (Millipore, Ирландия), камеру для вертикального электрофореза (Hoeffer, США), систему высокоэффективной жидкостной хроматографии System Gold (Beckman Coulter, США), Speed-Vac Concentrator SVC-100H (Savant, США), спектрофотометр DU 700 (Beckman Coulter, США), планшетный спектрофотометр SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, США).

### 3.2 Твердофазный синтез по Меррифилду

В 1984 году американский биохимик Р.Б. Меррифилд получил Нобелевскую премию в области химии за изобретение твердой фазы для синтеза пептидов. Он показал, что возможно прикрепить мономер с защищенными химическими активными группами к неподвижному полимерному твердому носителю и затем, удаляя защитные группировки, последовательно прикреплять следующие мономеры, таким образом наращивая полимерную цепь. При получении полимера необходимой длины при правильно подобранных условиях его легко отделить от твердой фазы и очистить синтезированную полимерную цепь. Данный способ является более удобным для синтеза пептидов в отличие от синтеза в жидкой фазе, поскольку в данных условиях легче проводить промежуточные очистки.

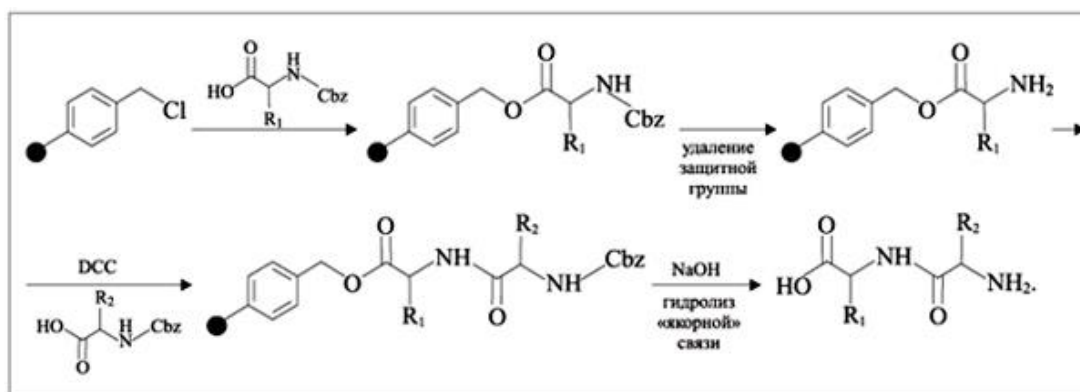


Рисунок 10 – Принципиальная схема твердофазного синтеза пептидов.

### 3.2 Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

Полученный после проведения твердофазного синтеза пептидный препарат очищали с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) на установке Gold Systems фирмы Beckman (США) Разделение проводили на колонке Vydac C-18 (25 x 1 см; диаметр частиц сорбента 5мкм) с использованием линейного градиента ацетонитрила 0-60%, со скоростью элюции 1,5 мл/мин. В качестве противоиона использовали 0,1% трифторуксусную кислоту. Полученные фракции высушивали под вакуумом на установке Speed Vac фирмы Savant (США) затем растворяли в 0,01% уксусной кислоте.

### 3.3 Аналитический электрофорез в кислой буферной системе в присутствии мочевины

Электрофоретическую подвижность синтезированного пептида в кислой среде изучали методом электрофореза в кислой буферной системе в присутствии мочевины [69].

Для электрофореза использовали 15,5%-ный полиакриламидный гель (ПААГ), содержащий 15,5% акриламида, 0,3%-N,N'-метиленбисакриламида, 6,25 М мочевины, 5% ледяной уксусной кислоты, 0,3% персульфата аммония, 0,5%-N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина. Полимеризацию проводили в течение 1-1,5 часов при комнатной температуре.

Электрофорез проводили в пластинах размерами 80x100x0,75 мм в приборе «Hoeffer» (США). В качестве электродного буфера использовали 5% раствор уксусной кислоты, pH 2,2. Преэлектрофорез и электрофорез проводили при напряжении 150 В в течение 1 часа, напряжённость, электрического поля составляла 20 В/см.

Трёхкратный раствор для приготовления проб содержал: 9 М мочевины и 15%-ную уксусную кислоту. Пробы разводили раствором для проб в соотношении 2:1. О скорости движения фронта в геле судили по скорости движения положительно заряженного красителя метиленового зелёного.

Белки и пептиды в ПААГ окрашивали раствором, содержащим 0,1% Кумасси бриллиантового синего G-250, 27% метанола и 5,7% формалина, в течение 15-30 минут. Не связавшийся краситель отмывали раствором 5%-ной уксусной кислоты.

### 3.3 Определение концентрации белка в пробе спектрофотометрическим методом с использованием коэффициента молярной экстинкции ( $\epsilon$ )

Концентрацию пептидов в пробах рассчитывали, определяя оптическую плотность раствора при 280 нм и используя для расчетов коэффициент их молярной экстинкции. Коэффициент молярной экстинкции ( $\epsilon$ ) получали с помощью программы Protein Calculator, исходя из особенностей структуры протегрина 1.

Концентрация белка рассчитывалась по формуле:  $C=A/(\epsilon*d)$ , где  $C$  – концентрация белка (М),  $A$  – поглощение пробы при длине волны 280 нм,  $d$  – длина оптического пути (1см),  $\epsilon$  - коэффициент молярной экстинкции ( $M^{-1} cm^{-1}$ ).



### 3.4 Конъюгация протегрина с амикацином

#### 3.4.1 Конъюгация с использованием кросслинкера DSP

Lomant's reagent, DSP или дитиобис(сукцинимидил пропионат) – гомобифункциональный кросслинкер, содержащий активированный N-гидроксисукцинимидный эфир. DSP реагирует с  $\epsilon$ -аминогруппами боковых цепей остатков лизина или с  $\alpha$ -аминогруппами на N-конце белков.

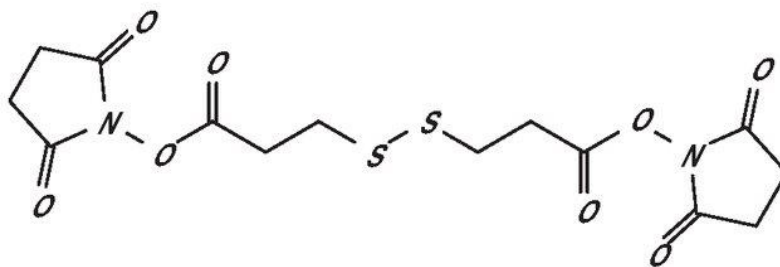


Рисунок 11 – Химическое строение дитиобис(сукцинимидил пропионата)

Конъюгацию протегрина с амикацином проводили в 25 мМ натрий-фосфатном буфере pH 6,5 в присутствии DSP в течение 45 минут при покачивании на шейкере. В данных условиях присоединение антибиотика может вестись по N-концевой аминокислоте. Мольное соотношение амикацина, DSP и пептида в реакционной смеси равно 0,5:20:1 соответственно. Далее проводили очистку пептида с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Vydac C-18 (США). Состав полученных образцов и содержание в них целевых пептидов исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

#### 3.4.2 Конъюгация с использованием сукцинового ангидрида и этилдиметиламинопропилкарбодиимида в качестве кросслинкера

Сукциновый ангидрид – четырехуглеродная зациклизованная молекула, содержащая карбоксильные группы на обоих концах. Нуклеофильная атака на одну из карбонильных групп открывает ангидридное кольцо, формируя ковалентную связь с одной карбонильной группой и высвобождение другой для формирования свободной карбоксильной группы [70]. Присоединение сукцинового ангидрида к положительно заряженным аминогруппам белковых или иных молекул происходит за счет образования амидной связи и перехода катионного сайта в отрицательно заряженный карбоксильный ион.

EDC (1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимид) – карбоксил- и аминокреактивный кросс-линкер с нулевым спейсером, который может реагировать с

карбоксии-кислотами с формированием высокореактивного интермедиата, O-ацилизоомочевины, реагирующего с первичными аминами, формируя амидные связи [71]. На рисунке 12 представлена схема образования конъюгата протегрин 1- амикацин.

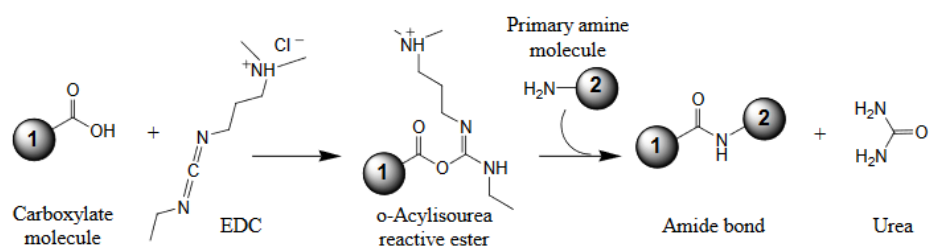


Рисунок 12 – Схема конъюгации протегрин 1 и амикацина с участием сукцинового ангидрида и EDC, где 1 – амикацин, 2 – протегрин 1

Конъюгацию амикацина с сукциновым ангидридом проводили в 0,05 М натрий-фосфатном буфере pH 6,5 в течение 3 часов в защищенном от света месте при покачивании на шейкере. Полученный конъюгат отмывали при помощи диэтилового эфира три раза. Полученный осадок высушивали под вакуумом на установке Speed Vac фирмы Savant (США), затем растворяли в небольшом количестве диметилформамида (ДМФ). В полученный раствор добавляли равное количество EDC и инкубировали на шейкере в течение 8 часов, затем отмывали диэтиловым эфиром. Дальнейшую конъюгацию проводили с равным количеством протегрин 1 в течение ночи. Реакционную смесь очищали от побочных продуктов с помощью диализа против деионизированной воды.

Мольное соотношение амикацина, пептида и кросслинкера в реакционной смеси равно 1:1:1 соответственно. Далее проводили очистку продукта от непрореагировавшего пептида с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Vydac C-18 (США). Гомогенность полученных образцов и содержание в них целевых пептидов подтверждали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

### 3.5 Оценка антимикробной активности исследуемых препаратов (антимикробных пептидов, антибиотических соединений)

#### 3.5.1 Метод серийных разведений в жидкой питательной среде, содержащей микроорганизмы

Метод серийных разведений основан на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего антимикробную активность препарата – величины его минимальной ингибирующей концентрации. МИК – минимальная

концентрация, подавляющая рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре. Для определения МИК препарат в двукратных серийных разведениях вносили в питательную среду, в которую затем добавляли культуру исследуемого микроорганизма, и после инкубации оценивали наличие или отсутствие видимого роста. Использовали модификацию данного метода, предложенную Тосси и соавторами [72]. Оценка микробицидного действия исследуемых соединений проводилась против следующих культур микроорганизмов: клинические изоляты грамотрицательных микроорганизмов: *Escherichia coli* 521/17 (устойчивость к ампициллину, амоксициллину/клавулоновой кислоте, цефотаксиму, цефтазидиму, цефелиму, азтреонаму, нетилмицину, ципрофлоксацину, триметоприму/сульфаметоксазолу), *Pseudomonas aeruginosa* 522/17 (устойчивость к меропенему, цефтазидиму, цефелиму, амикацину, гентамицину, нетилмицину, ципрофлоксацину, колистину), *Klebsiella pneumoniae* 344/17 (устойчивость к ампициллину), *Acinetobacter baumannii* 7226/16 (устойчивость к имипенему, гентамицину, тобрамицину, ципрофлоксацину, триметоприму/сульфаметоксазолу). Клинический изолят *E. coli* был получен из мочи пациента, остальные – из инфицированных ран. Использованные в работе штаммы бактерий были любезно предоставлены д.б.н. А.Г. Афиногеновой, ФГБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Также использовали мультирезистентный *Staphylococcus aureus*.

Для проведения антимикробного теста необходимо использовать культуру микроорганизмов в логарифмической фазе роста. Для этого бактериальные клетки культивировали в течение ночи (16-18 часов) в 2,1% бульоне Мюллера-Хинтона М391 при 37°C на шейкере, затем отбирали 500 мкл суспензии, переносили их в 15 мл свежего стерильного 2,1% бульона Мюллера-Хинтона и инкубировали при тех же условиях в течение 2,5-3 часов. Затем с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность (OD) полученной суспензии при длине волны 620 нм, в качестве контроля используя стерильный 2,1% бульон Мюллера-Хилтона, и подсчитывали количество колониобразующих единиц (КОЕ):

$$1 \times OD_{620} = 2.5 \times 10^8 \text{ КОЕ/мл.}$$

Исходя из полученных данных, разводили суспензию бактерий стерильным 2,1% бульоном Мюллера-Хинтона до необходимой концентрации  $1 \cdot 10^5$  КОЕ/мл.

Затем готовили двукратные серийные разведения исследуемых препаратов в 0,01 М натрий-фосфатном буфере pH 7,4 и полученные разведения антибиотиков вносили по 5 мкл в лунки микрокамеры Теракаки. К ним добавляли равный объем бактериальной суспензии,

соответственно, конечная концентрация бактерий в лунке должна составлять  $0,5 \cdot 10^5$  КОЕ/мл.

Для контроля стерильности среды в 3 лунки микрокамеры вносили равные объемы буфера, используемого для разведения препаратов, и стерильной питательной среды, использованной для разведения бактериальной суспензии.

Для контроля жизнеспособности бактерий в 3 лунки микрокамеры Тerasаки вносили равные объемы бактериальной суспензии и буфера, не содержащего антимикробных веществ.

Заполненные пробами микрокамеры Тerasаки инкубировали в термостате при  $37^\circ\text{C}$  в течение ночи. Полученные результаты оценивали на следующий день - определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) по наименьшей концентрации, при которой визуально не наблюдался рост микроорганизмов в соответствующих лунках микрокамеры. Окончательно МИК рассчитывали, как медианы на основании данных, полученных в результате трех независимых экспериментов, в каждом из которых имелось по три параллели опытных и контрольных проб.

### **3.5.2. Оценка совместного микробоцидного действия исследуемых антимикробных пептидов и антибиотических соединений методом серийных разведений по принципу "шахматной доски"**

Для определения вероятного усиления антибактериальных свойств антимикробных пептидов при их сочетанном действии с антибиотическими препаратами использовали методику серийных разведений препаратов в среде, содержащей микроорганизмы, по методу «Шахматной доски» («Checkerboard titrations») [73].

Оценка совместного микробоцидного действия проводилась против перечисленных в предыдущем разделе антибиотико-устойчивых бактерий.

Получение культуры микроорганизмов в логарифмической фазе роста и подготовка планшетов проводились по методике, описанной в пункте выше. В соответствии с методом «шахматной доски» одно из антибиотических соединений (А) двукратно разводится по горизонтали, а другое (В) – по вертикали, в результате чего в каждой лунке получают известную определенную комбинацию исследуемых препаратов. Крайние лунки по вертикали и горизонтали должны содержать по одному из исследуемых веществ, что позволит определить МИКи непосредственно в данном эксперименте.

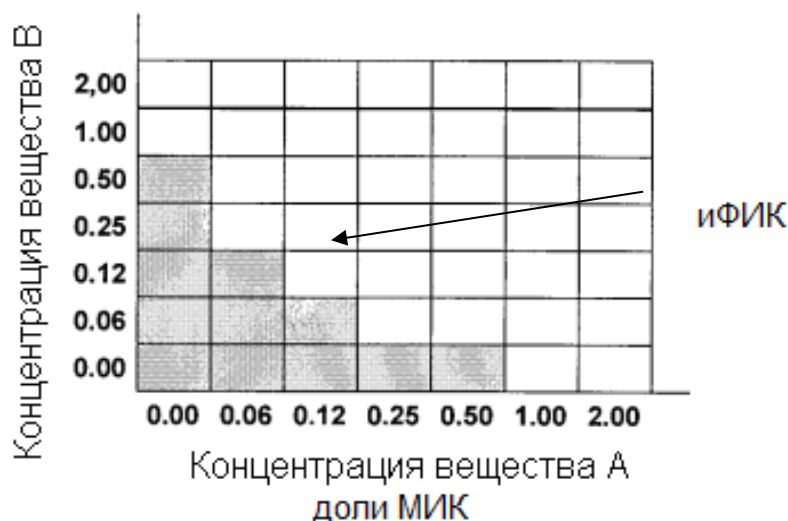


Рисунок 13 - Схема внесения проб в лунки планшета с помощью серийных разведений по методу "шахматной доски" [74]. Стрелками отмечены лунки, где вещества находятся в наименьших ингибирующих концентрациях, и по которым рассчитывается иФИК.

В лунки микрокамеры Тerasаки вносили равные объемы соответствующих разведений исследуемых веществ в 0,01М натрий-фосфатном буфере pH 7,4, аналогично описанной схеме, в крайние лунки вместо второго вещества вносили такой же объем буфера. Затем в лунки вносили такой же объем суспензии бактерий. Желательно, чтобы начальная концентрация каждого из исследуемых препаратов была равна МИК\*2. В эксперименте использовали два вида контролей, аналогичные описанным в предыдущей главе.

Заполненные пробами микрокамеры Тerasаки инкубировали в термостате при 37°C в течение ночи. Результаты оценивали визуально – по наличию либо отсутствию роста микроорганизмов в лунках. Характер совместного действия определяют в результате расчета индексов фракционных ингибирующих концентраций (иФИК) [74]:

$$\text{ФИК индекс} = \text{ФИК А} + \text{ФИК В} = [A] / [\text{МИК А}] + [B] / [\text{МИК В}],$$

где [A] и [B] – концентрации веществ А и В соответственно в их смеси (комбинации), ингибирующей рост бактерии, такой, что при понижении концентрации хотя бы одного из компонентов бактериостатический эффект не наблюдается.

При  $\text{иФИК} \leq 0,5$ , совместное действие препаратов рассматривали, как синергическое,  $\text{иФИК}=1$ , как аддитивное;  $\text{иФИК} > 2$  – антагонистическое.

### 3.6 Анализ гемолитической активности препаратов

Как было сказано выше, антимикробные пептиды имеют способность повреждать как бактериальные мембраны, так и эукариотические. Для исследования этих эффектов проводили анализ гемолитической активности исследуемых АМП [72]. Данный метод основан на фотометрической детекции свободного гемоглобина, выходящего в раствор из лизированных эритроцитов.

Первоначально подготавливали суспензию эритроцитов из капиллярной крови здоровых доноров: к собранной в пробирку крови добавляли гепарин из расчета 10 мкл гепарина на 1 мл крови, полученный раствор центрифугировали 10 минут при 1000 об/мин при 4°C. К полученному осадку добавляли 10 мл ЗФР (забуференный физиологический раствор) pH 7,4, содержащий 4 мМ ЭДТА, полученную суспензию снова центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок растворяли в 10 мл охлажденного ЗФР и снова центрифугировали, данную процедуру повторяли три раза. Приготавливали 2,8% раствор эритроцитов в охлажденном ЗФР, принимая содержание эритроцитов в полученном осадке за 100%.

Готовили пробы к анализу: смешивали 27 мкл полученной суспензии эритроцитов и 3 мкл анализируемого вещества, для которого были приготовлены серийные двукратные разведения. Пробы были сделаны в трех параллелях. Также приготавливали контрольные пробы: отрицательный контроль вместо АМП содержал 3 мкл ЗФР, а положительный – 3 мкл детергента Triton X-100.

Полученные пробы инкубировали в термостате при 37°C в течение 30 минут, останавливали реакцию добавлением 75 мкл охлажденного ЗФР. Затем осаждали поврежденные эритроциты и оставшиеся целыми клетки при 10000 об/мин в течение 4 минут при 4°C. Надосадочную жидкость вносили в лунки 96-луночного плоскодонного планшета и определяли оптическую плотность, используя планшетный спектрофотометр SpectraMax 250, при длине волны 540 нм.

Процент гемолиза эритроцитов определяли по формуле:

$$\text{Гемолиз (\%)} = \frac{OD_{540}(\text{образца}) - OD_{540}(0\% \text{ лизис})}{OD_{540}(100\% \text{ лизис}) - OD_{540}(0\% \text{ лизис})} \times 100\%$$

## 4. Результаты

### 4.1 Твердофазный синтез структурного аналога протегрина 1

C-терминальная карбоксильная группа протегрина 1 и его структурного аналога находится в виде амида. Амидирование на стадии защищенного пептида нежелательно, поскольку есть высокий риск рацемизации, поэтому для синтеза была выбрана Rink-амидная смола (рисунок 15), при снятии пептида с которой C-концевая карбоксильная группа находится в виде амида.

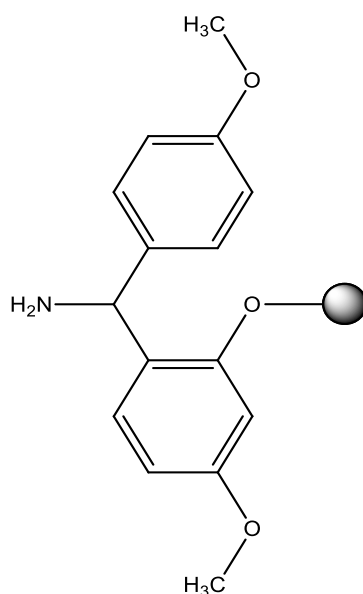


Рисунок 15 - Фрагмент Rink-амидной смолы.

Перед иммобилизацией первой аминокислоты необходимо снять защитную группу с полимерного носителя. Снятие Fmoc-группы осуществляли с помощью 20% диэтиламина в диметилформамиде (рисунок 16)

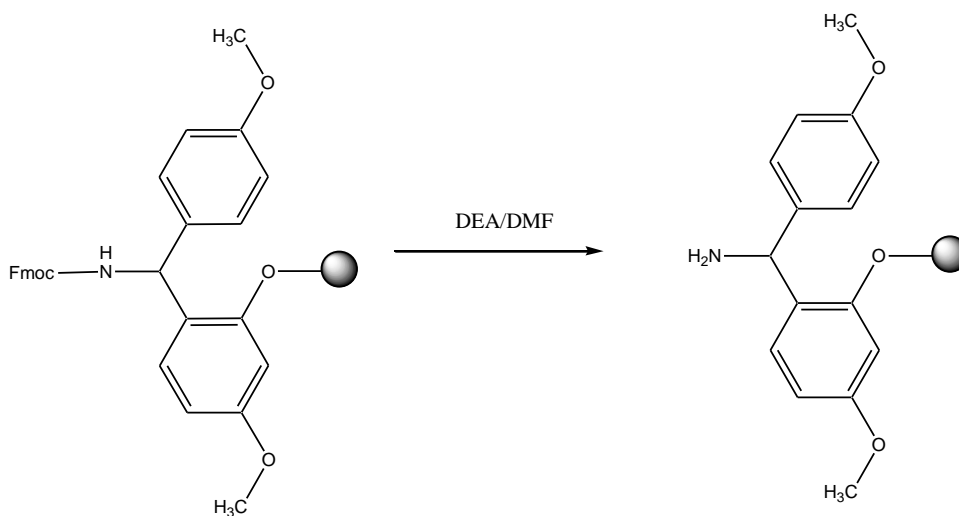


Рисунок 16. Деблокирование Rink-амидной смолы.

Иммобилизацию Fmoc-аминокислот на полимерном носителе Ринка с образованием амидного линкера бензгидрильного типа осуществляли карбодиимидным методом в присутствии диизопропилкарбодиимида (DIC) и этил циано(гидроксиимино)ацетата (Oxima). Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 2 часов.

Для контроля полного присоединения аминокислоты выполняли нингидриновый тест Кайзера [75]. Небольшое количество смолы помещали в пенициллиновый флакон и промывали этанолом, затем добавляли по две капли 5% нингидрина в этаноле, 80% фенола в этаноле и KCN в пиридине (2 мл 0,001M KCN в 98мл пиридина). Полученную смесь нагревали до 120°C и оценивали проявившуюся окраску: отсутствие окраски свидетельствовало об отсутствии свободных аминогрупп на смоле, а темно-синяя окраска – о присутствии свободных аминогрупп.

Затем с иммобилизованной аминокислоты снимали Fmoc-защиту с  $\alpha$ -аминогруппы для конденсации следующей аминокислоты и наращивания аминокислотной цепи. Последующие защищенные аминокислоты конденсировались аналогично.

В результате был получен защищенный пептид, состоящий из 18 аминокислот, прикрепленный к полимерному носителю (рисунок 17):

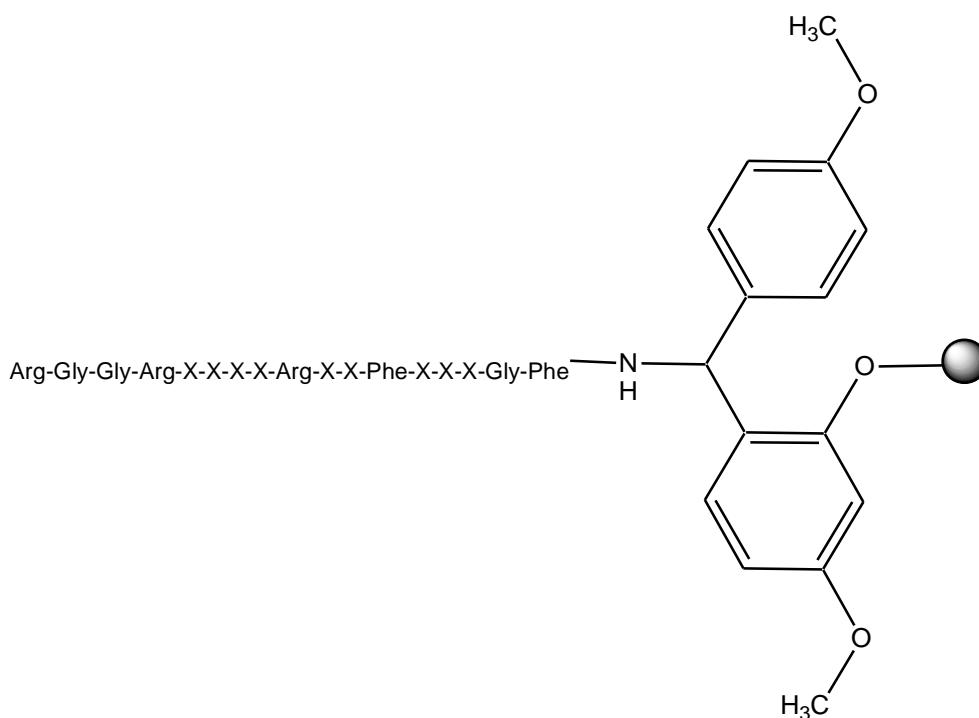


Рисунок 17 - Защищенный пептид на полимерном носителе.



Снятие пептида и полное деблокирование постоянных защитных групп с Rink-амидной смолы производили в 95% TFA с добавлением 2,5% триизопропилсилана в качестве скавенджера.

#### 4.2 Очистка и оценка чистоты полученного пептида

Полученный после проведения твердофазного синтеза пептидный препарат очищали с помощью ОФ ВЭЖХ. На хроматографическую колонку наносили навеску пептида, растворенного в 0,1% ТФУ с 5% ацетонитрилом. После проведения хроматографического разделения пептидов были получены очищенный препарат пептида-аналога протегрина 1 AP1. На рисунках 18 и 19 представлены примеры хроматографической очистки синтезированного структурного аналога AP1 (рисунок 18) и доказательство чистоты выделенной фракции (рисунок 19).

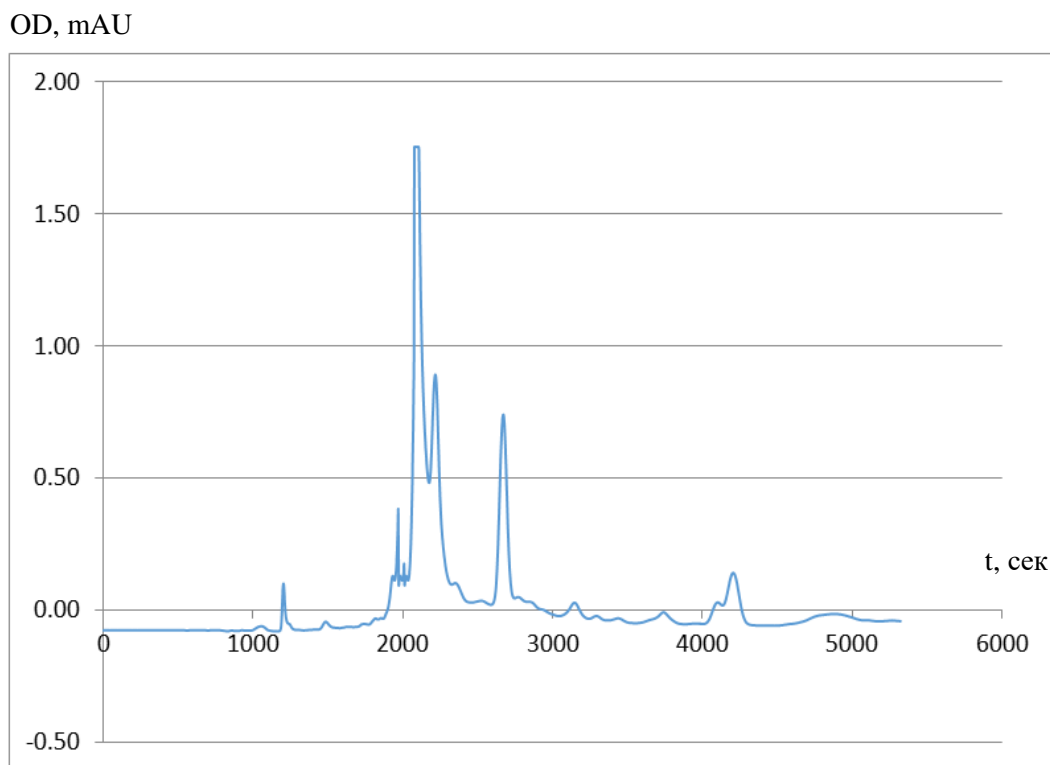


Рисунок 18 – Профиль элюции белков с колонки при проведении ОФ ВЭЖХ синтезированного аналога протегрина 1 (колонка Vydac C-18, 25 x 1 см; линейный градиент концентраций ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислотой 5-70%, 1,5 мл/мин). Детекцию проводили при 235 нм.

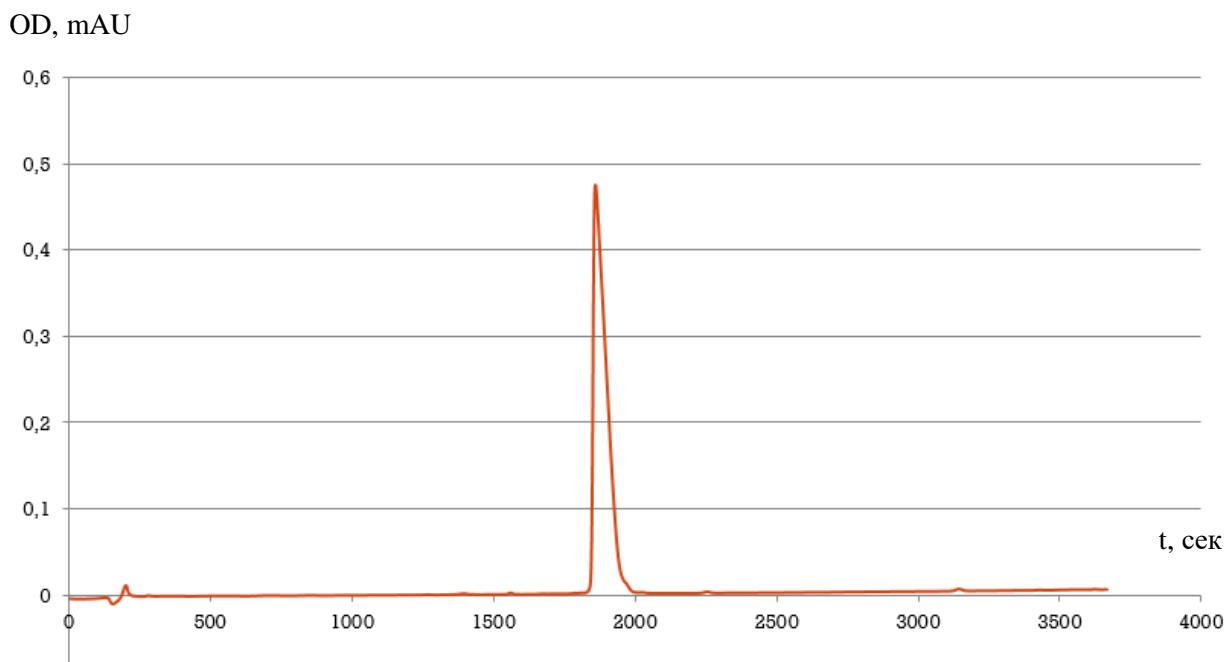


Рисунок 19 – Профиль элюции белков с колонки при проведении ОФ ВЭЖХ очищенного пептида-аналога AP1 (колонка Vydac C-18, 25 x 0,5 см; линейный градиент концентраций ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислотой 5-70%, 1 мл/мин).

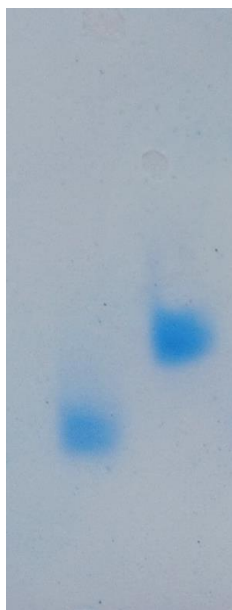
Детекцию проводили при 235 нм.

Помимо аналитической ВЭЖХ для доказательства правильности структуры синтезированного пептида проводили масс-спектрометрический анализ отобранной фракции, который выполнялся сотрудником ФГБНУ «ИЭМ» д.х.н. Б.Л. Мильманом (MALDI TOF масс-спектрометрия) (рисунок 21), также его сравнивали со стандартом протегрина 1 по их электрофоретической подвижности к катоду в кислой среде (рисунок 20).

Структура синтезированного пептида-аналога протегрина 1 представляет предмет патентования, поэтому она не приводится, но его свойства, необходимые для анализа синтезированной последовательности представлены в таблице 3.

Таблица 3. Структурный аналог протегрина 1 и его свойства.

Пептид	$[M+H]^+$ вычислено	Особенности
AP1	2523,506	Заряд +3, дисульфидные мостики отсутствуют



1 2

Рисунок 20 – Электрофореграмма синтезированного пептида-аналога AP1. Электрофорез проводили в кислых условиях в присутствии мочевины, окраски геля с помощью Кумасси G250.

1 – стандарт PG-1,

2 – синтезированный и очищенный структурный аналог PG-1.

Исходя из анализа электрофоретической подвижности пептидов по направлению к катоду в кислой среде, можно сделать вывод, что синтезированный пептид обладает зарядом меньшим, чем протегрин 1, суммарный заряд которого равен +7.

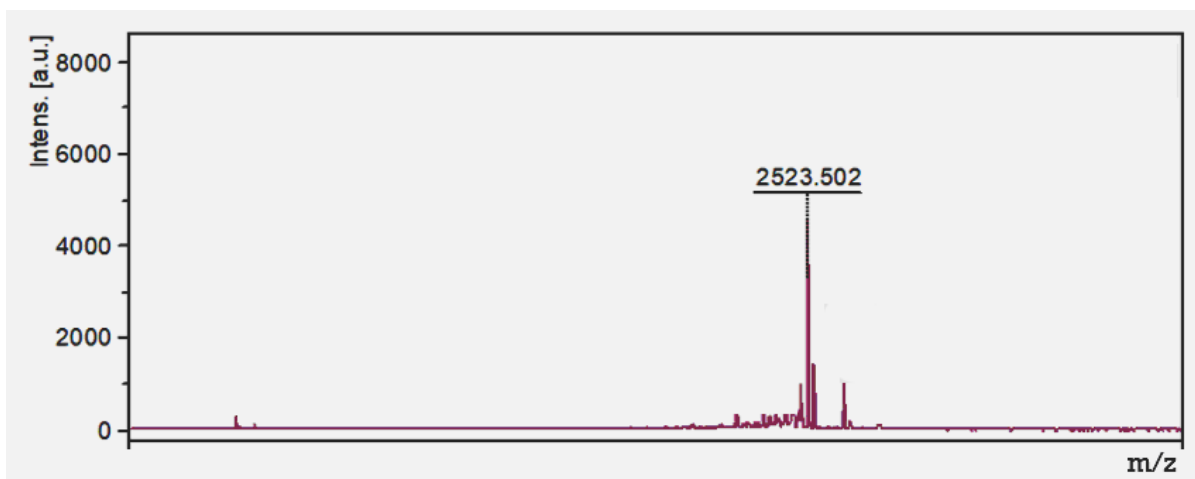


Рисунок 21. Масс-спектр, полученный для синтезированного AP1.

По оси абсцисс – масса/заряд, по оси ординат – интенсивность полученного сигнала.

MALDI TOF (выполнялась в ФГБНУ «ИЭМ»)

Полученная с помощью масс-спектрометрического анализа молекулярная масса для синтезированного структурного аналога протегрина 1 совпадает с рассчитанной.

### 4.3 Оценка антимикробной активности структурных аналогов протегрина 1

Протегрин обладает антимикробной активностью в отношении многих бактерий, но его высокая токсичность не позволяет использовать его в качестве антимикробного препарата. В связи с этим была поставлена задача выбрать лучшую модификацию протегрина 1, обладающую как высокой антимикробной активностью, так и низкой токсичностью. Одним из возможных методов достижения поставленной цели является использование структурных аналогов протегрина 1, которые были синтезированы и любезно предоставлены сотрудниками лаборатории, в частности П.М. Копейкиным.

Исследовали антимикробную активность следующих структурных аналогов протегрина:

1. AP1 – укороченный аналог ПГ1, заряд +6, без дисульфидных мостиков;
2. AP2 – укороченный аналог ПГ1, заряд +6, один дисульфидный мостик;
3. AP3 – аналог ПГ1 с более высоким суммарным положительным зарядом молекулы (+8), один дисульфидный мостик;
4. AP4 – аналог ПГ1 с более высоким суммарным положительным зарядом молекулы (+9), один дисульфидный мостик;
5. AP4 - аналог ПГ1 с более высоким суммарным положительным зарядом молекулы (+8), без дисульфидных мостиков.

Аминокислотные последовательности не приводятся, так как они составят предмет для патентования.

Антимикробную активность сравнивали для всех структурных аналогов и нативного протегрина 1 в отношении антибиотико-резистентных бактерий *E. coli ESBL 521/17*, *A. baumannii 7226/16*, *S. aureus 1399/1*. Результаты определения минимальных ингибирующих рост бактерий концентраций (МИК) представлены в таблице 4.

Таблица 4. Антимикробная активность синтезированного протегрина 1 и его структурных аналогов.

Вещество	МИК, $\mu\text{M}$		
	<i>E. coli</i> ESBL 521/17	<i>A. baumannii</i> 7226/16	<i>S.aureus</i> 1399/17
PG-1	0,195	6,25	0,78
AP1	16	16	>16
AP2	4	4	>16
AP3	8	8	>16
AP4	2	2	4
AP5	>16	8	4

\* - Представлены значения медиан, полученных после проведения 3 независимых экспериментов (метод серийных разведений антибиотических препаратов в питательной среде, содержащей микроорганизмы).

На основании полученных данных можно сделать заключение, что структурные аналоги протегрина 1 являются менее эффективными в отношении исследуемых штаммов *E. coli* и *S. aureus*, чем протегрин 1. Однако аналоги протегрина с зарядом +6 и одним дисульфидным мостиком и с более высоким суммарным положительным зарядом молекулы (+9) и одним дисульфидным мостиком более эффективны в отношении *A. baumannii* в сравнении с нативным протегрином 1. Эти два структурных аналога будут взяты за основу при продолжении работ по созданию новых модификаций протегрина 1. Спектр исследуемых микроорганизмов тоже будет расширен.

#### **4.4 Исследование активности протегрина 1 и различных антибиотических соединений в отношении бактерий**

##### **4.4.1 Изучение антибактериальной активности индивидуальных фракций различных антибиотиков (амикацина, офлоксацина, оксациллина), а также протегрина 1 в отношении различных бактерий**

Одним из возможных путей практического применения АМП может стать их использование в комбинированной терапии – в сочетании с конвенциональными антибиотиками. Нами было проведено исследование сочетанного действия протегрина 1 с

тремя антибиотиками - амикацином, офлоксацином, оксациллином. Выбор антибиотиков определялся тем, что для этих соединений в литературе были описаны случаи проявления синергического антибактериального действия в комбинации с пептидами врожденного иммунитета. Исследование сочетанного действия ПГ1 с перечисленными антибиотиками в отношении исследуемых антибиотико-резистентных бактерий проводилось впервые.

На первом этапе исследования сочетанного действия антимикробных соединений необходимо было оценить активность их индивидуальных фракций. Антибиотики, являющиеся объектами исследования, а также синтезированный протегрин 1, имеют различные мишени антибактериального действия, а также синтезированный протегрин 1. Для оценки антибактериальных свойств исследуемых соединений использовали метод серийных разведений в жидкой питательной среде. В таблице 5 показан план нанесения протегрина 1 при его двукратном разведении. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали наименьшую концентрацию антибиотика, при которой не выявлялся рост микроорганизма в лунке планшета (микрокамеры Тerasаки).

Таблица 5. Результаты оценки антимикробной активности протегрина 1 в отношении *Escherichia coli ESBL 521/17*\*

PG-1		
12,5 µM	12,5 µM	12,5 µM
6,25 µM	6,25 µM	6,25 µM
3,125 µM	3,125 µM	3,125 µM
1,56 µM	1,56 µM	1,56 µM
0,78 µM	0,78 µM	0,78 µM
0,39 µM	0,39 µM	0,39 µM
0,195 µM	0,195 µM	0,195 µM
0,098 µM	0,098 µM	0,098 µM

\* - Серым цветом выделены лунки микрокамеры Тerasаки, в которых наблюдался рост бактерий, желтым цветом – лунки, где рост бактерий не наблюдался – в этих лунках антибиотик содержался в минимальной ингибирующей концентрации.

Эксперимент повторяли минимум три раза (в каждом эксперименте использовали три параллельных пробы для каждого разведения вещества), в результате определили МИК протегрина 1 для *E. coli ESBL 521/17* – как значение медианы, полученной по данным проведенных экспериментов, которая составила 0,195 мкМ. Аналогичным образом определили МИК для остальных исследуемых антибиотиков. Результаты суммированы в таблице 6.

Таблица 6. Антибактериальная активность антибиотиков, принадлежащих к различным классам, и протегрина 1 антибиотико-резистентных бактерий *E. coli ESBL 521/17*, *A. baumannii 7226/16*, *S. aureus 1399/1*.

Вещество	МИК, $\mu\text{M}$		
	<i>E. coli ESBL 521/17</i>	<i>A. baumannii 7226/16</i>	<i>S. aureus 1399/17</i>
Протегрин 1	0,195	6,25	0,78
Амикацин	0,78	6,25	>50
Офлоксацин	50	25	>50
Оксациллин	>50	>50	>50

\* Данные представлены, как медианы, определенные по данным трех-пяти независимых экспериментов, в которых для каждого разведения препарата использовались по три параллели.

Исходя из полученных результатов видно, что протегрин 1 обладает более сильными антибактериальными свойствами, чем исследуемые антибиотики, так как бактерии к ним устойчивы. Далее было исследовано совместное действие протегрина 1 и этих антибиотических препаратов.

#### 4.4.2 Изучение совместного антибактериального действия протегрина 1 и различных антибиотических соединений (амикацина, офлоксацина, оксациллина)

Проведено исследование сочетанного антибиотического действия протегрина 1 и антибиотиков для установления характера их совместного действия: независимого, аддитивного, антагонистического или синергического. Для проведения данного эксперимента использовали метод серийных разведений по принципу «шахматной доски» и расчета иФИК по формуле:

$$\text{ФИК индекс} = \text{ФИК A} + \text{ФИК B} = [A]/[\text{МИК A}] + [B]/[\text{МИК B}]$$

где [МИК A] и [МИК B] – минимальные ингибирующие концентрации индивидуальных фракций веществ A и B, соответственно, а [A] и [B] – минимальные концентрации веществ A и B, соответственно, в их смеси (комбинации).

При иФИК  $\leq 0.5$  – совместное действие соединений рассматривается как синергическое (препараты усиливают антимикробный эффект друг друга);  $0.5 < \text{иФИК} \leq 1$  – как аддитивное (антимикробный эффект препаратов аддитивно складывается);

1 <иФИК ≤ 2 – как индифферентное или независимое (эффект одного вещества не зависит от присутствия другого); иФИК > 2 – как антагонистическое (эффект веществ в комбинации снижается).

В таблице 7 представлена схема эксперимента по оценке характера совместного действия протегрина и амикацина в отношении чувствительной к амикацину бактерии *E. coli ESBL 521/17*.

Таблица 7. Пример постановки эксперимента по оценке совместного антимикробного действия амикацина и протегрина-1 в отношении штамма *E. coli ESBL 521/1\**

Протегрин 1

2 μМ	2 μМ ПГ1 + 0,5 μМ АМС	2 μМ ПГ1 + 1 μМ АМС	2 μМ ПГ1 + 2 μМ АМС	2 μМ ПГ1 + 4 μМ АМС	2 μМ ПГ1 + 8 μМ АМС
1 μМ	1 μМ ПГ1 + 0,5 μМ АМС	1 μМ ПГ1 + 1 μМ АМС	1 μМ ПГ1 + 2 μМ АМС	1 μМ ПГ1 + 4 μМ АМС	1 μМ ПГ1 + 8 μМ АМС
0,5 μМ	0,5 μМ ПГ1 + 0,5 μМ АМС	0,5 μМ ПГ1 + 1 μМ АМС	0,5 μМ ПГ1 + 2 μМ АМС	0,5 μМ ПГ1 + 4 μМ АМС	0,5 μМ ПГ1 + 8 μМ АМС
0,25 μМ	0,25 μМ ПГ1 + 0,5 μМ АМС	0,25 μМ ПГ1 + 1 μМ АМС	0,25 μМ ПГ1 +2 μМ АМС	0,25 μМ ПГ1 + 4 μМ АМС	0,25 μМ ПГ1 + 8 μМ АМС
0,125 μМ	0,125 μМ ПГ1 + 0,5 μМ АМС	0,125 μМ ПГ1 + 1 μМ АМС	0,125 μМ ПГ1 + 2 μМ АМС	0,125 μМ ПГ1 + 4 μМ АМС	0,125 μМ ПГ1 + 8 μМ АМС
	0,5 μМ	1 μМ	2 μМ	4 μМ	8 μМ

Амикацин

\* - Серым цветом показаны те лунки, где выросла бактерия, зеленым цветом выделены МИК индивидуальных фракций протегрина 1 или амикацина, желтым цветом минимальные концентрации веществ в их смеси (комбинации), при которых наблюдается ингибирование роста бактерии.

Таким образом, значение иФИК = [МИК ПГ1 в комбинации с АМС]/ [МИК ПГ1] + [МИК АМС в комбинации с ПГ1]/ [МИК АМС] = [0,5 мкМ]/ [2 мкМ] + [0,5 мкМ]/ [4 мкМ] = 0,375. Полученное значение указывает на синергический характер сочетанного действия протегрина 1 и амикацина в отношении данного микроорганизма.

В Таблице 8 представлена схема эксперимента по оценке характера совместного действия PG-1 и амикацина, офлоксацина и оксациллина в отношении антибиотико-резистентных бактерий.



Таблица 8. Индексы фракционных ингибирующих концентраций для сочетанного действия PG-1 и различных антибиотических соединений. \*

Комбинации	иФИК		
	<i>E. coli ESBL 521/17</i>	<i>A. baumannii 7226/16</i>	<i>S.aureus 1399/17</i>
PG-1 + Амикацин	0,375	0,25	0,5
PG-1 + Офлоксацин	0,75	1,5	1,5
PG-1 + Оксациллин	1,5	1,5	0,75

\* Данные представлены, как медианы, определенные по данным трех независимых экспериментов, в которых были рассчитаны иФИК.

Таким образом, установлено синергическое антибактериальное действие при использовании амикацина в комбинации с протегрином 1 в отношении исследуемых резистентных штаммов и независимое действие протегрина 1 с офлоксацином и оксациллином.

В связи с установленным синергическим действием протегрина 1 и амикацина, предположили, что конъюгат этих двух соединений может иметь более сильное антимикробное действие, чем индивидуальные компоненты или их комбинации.

#### 4.5 Изучение антимикробного действия конъюгатов протегрина с амикацином

##### 4.5.1 Получение конъюгатов протегрина 1 с амикацином

Конъюгацию протегрина с амикацином проводили двумя методами в присутствии различных кросс-линкеров. Поскольку амикацин имеет аминогруппы и протегрин 1 тоже несет первичный амин на N-конце, были выбраны методики конъюгирования по аминогруппам.

В случае с DSP, реакцию проводили в натрий-фосфатном буфере pH 7,4, в течение 45 минут. Реакция протекает с образованием двух N-гидроксисукцимидных эфиров, как побочных продуктов. В качестве финальной очистки использовали метод ОФ ВЭЖХ. На рисунке 22 представлены результаты хроматографической очистки полученного конъюгата.

В другом случае химическая реакция соединения амикацина с сукциновым ангидридом, а затем с кросслинкером EDC протекает с образованием активного интермедиата O-ацилизомочевины с последующим присоединением протегрина с образованием амидной связи и выделением мочевины. Реакцию проводили в три этапа в

течение 20 часов при постоянном покачивании. Полученный продукт очищали при помощи диализа против деионизованной воды.

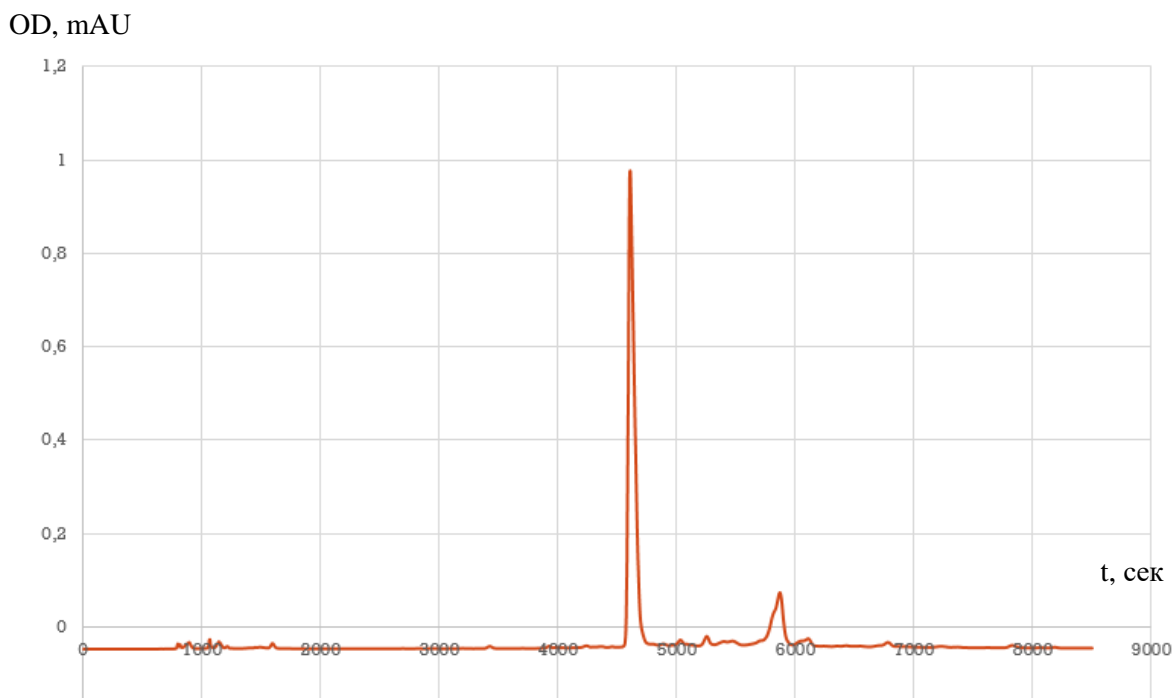
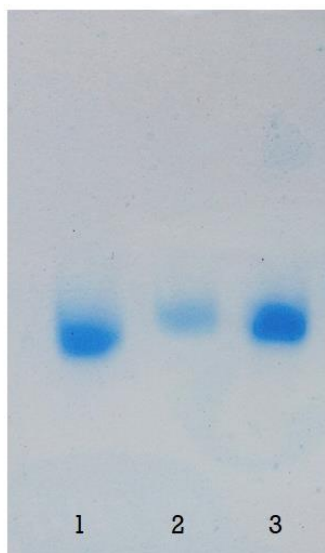


Рисунок 22 – Профиль элюции пептидов с колонки Vydac C18 при проведении ОФ ВЭЖХ протеина 1 после его конъюгации с амикацином. Элюция пептида осуществлялась с помощью линейного градиента ацетонитрила (с 0,1% трифторуксусной кислотой) от 5 до 70% за 65 мин, 1,5 мл/мин. Детекцию проводили при 235 нм.



Электрофореграмма полученных конъюгатов  
1 – препарат PG-1; 2 - результат конъюгации PG-1 с амикацином с использованием DSP; 3 – результат конъюгации PG-1 с амикацином с использованием двух кросслинкеров.

Полученные фракции конъюгатов анализировали на наличие антимикробной активности.

#### 4.5.2 Изучение активности полученных конъюгатов против различных бактерий

Для оценки антибактериальных свойств исследуемых соединений использовали метод серийных разведений в жидкой питательной среде. В таблице 9 показан план нанесения конъюгата протегрина 1 с амикацином при участии сукцинового ангидрида и EDC при его двукратном разведении. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали наименьшую концентрацию соединения, при которой не выявлялся рост микроорганизма в лунке планшета (микрокамеры Терасаки).

Эксперимент повторяли минимум три раза (в каждом эксперименте использовали три параллельных пробы для каждого разведения вещества), в результате определили МИК конъюгата для *E. coli ESBL 521/17* – как значение медианы, полученной по данным проведенных экспериментов, которая составила 1,23 мкМ. Аналогичным образом определили МИК для остальных исследуемых фракций конъюгатов. Результаты суммированы в таблице 6.

Таблица 6. Антибактериальная активность конъюгатов в отношении антибиотико-резистентных бактерий *E. coli ESBL 521/17*, *A. baumannii 7226/16*, *S. aureus 1399/1*.

Вещество	МИК, мкМ		
	<i>E. coli ESBL 521/17</i>	<i>A. baumannii 7226/16</i>	<i>S. aureus 1399/17</i>
PG1-SUC-AMC	1,23	4,91	4,91
PG1-DSP-AMC 7	>25	>25	>25

\* Данные представлены, как медианы, определенные по данным трех-пяти независимых экспериментов, в которых для каждого разведения препарата использовались по три параллели.

Исходя из полученных результатов видно, что конъюгат, полученный в присутствии сукцинового ангидрида и EDC, обладает более выраженными антибактериальными свойствами, чем исследуемые конъюгаты, полученные в реакции с DSP. В отношении *Acinetobacter baumannii* активность конъюгата выше, чем активность нативного протегрина 1. Однако, в целом, при исследовании сочетанного действия свободных (не конъюгированных) пептида и антибиотика показатели активности были выше.

#### 4.6 Оценка гемолитической активности структурных аналогов протегрина 1 и его конъюгата с амикацином в отношении эритроцитов человека

Токсичность выбранного конъюгата и структурных аналогов протегрина 1 в отношении эукариотических клеток определяли при помощи гемолитического теста. Эксперимент повторяли три раза и использовали три параллели исследуемых проб, первоначальная концентрация которых для двукратных разведений составляла 50  $\mu\text{M}$ . Оптическая плотность контролей и полученных проб была определена как значение медиан, полученных по данным проведенных экспериментов. На рисунке 23 представлены результаты оценки гемолитической активности исследуемых антимикробных пептидов в отношении эритроцитов человека.

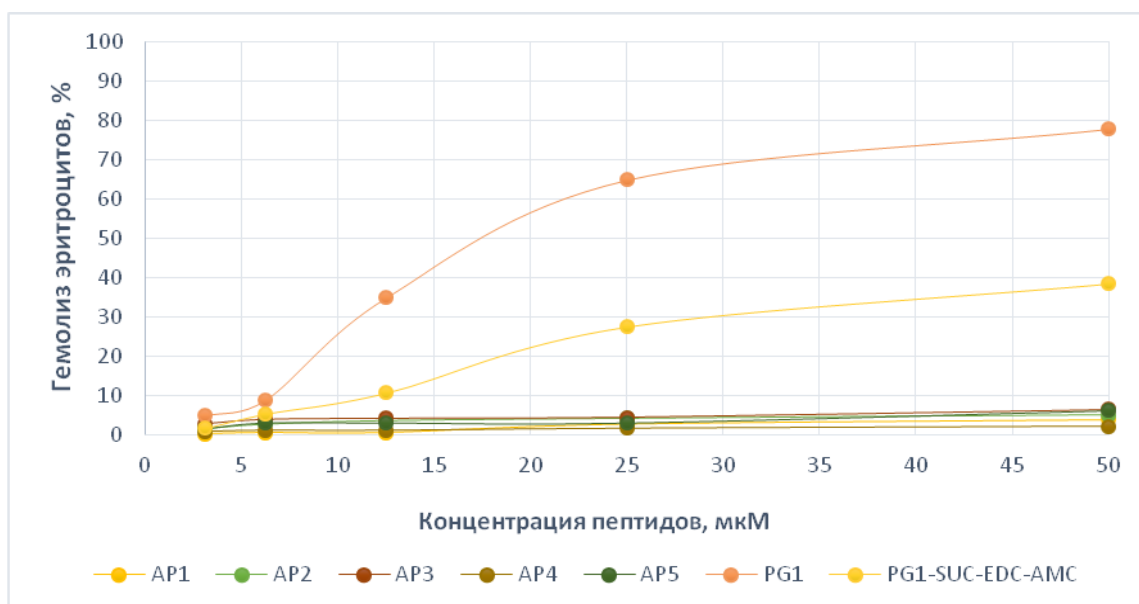


Рисунок 23 – Гемолитическая активность АМП.

По оси абсцисс – концентрация исследуемых АМП в мкМ, по оси ординат – величина гемолиза эритроцитов в процентах, где 100% - величина, полученная при действии на эритроциты 1% Triton X-100.

Из рисунка видно, что все структурные аналоги протегрина 1 даже в максимальной исследуемой концентрации не оказывают выраженного действия на эритроциты, в случае же исследуемого конъюгата протегрина с амикацином гемолитическая активность начинает проявляться уже при концентрации 25  $\mu\text{M}$ .

## 5 Обсуждение результатов

Антимикробные пептиды, обладающие широким спектром биологической активности, на сегодняшний день считаются перспективными кандидатами на роль новых антимикробных препаратов. Одним из самых эффективных в отношении широкого круга бактерий является пептид семейства кателицидинов - протегрин 1, в связи с чем его рассматривают в качестве возможного прототипа антибиотического препарата для борьбы с инфекциями, вызываемыми антибиотико-резистентными бактериями.

Протегрин 1 (PG1) проявляет активность, как в отношении грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, том числе антибиотикоустойчивых штаммов. В отличие от многих АМП, активность которых проявляется в узком диапазоне рН и снижается при повышении ионной силы раствора, антимикробные свойства PG1 сохраняется в средах с различными значениями рН, а также в присутствии 150 мМ хлорида натрия. Такие характеристики обуславливают перспективность создания на основе PG1 новых антибиотиков. Но, к сожалению, протегрин может повреждать и некоторые клетки макроорганизма, в частности, в высоких концентрациях вызывает лизис эритроцитов.

*Целью* данной работы явился поиск подходов к созданию прототипов новых антибиотиков на основе протегрина-1.

В литературе описаны некоторые подходы для разработки структурных аналогов АМП с заданными свойствами, проанализировано значение замен различных аминокислотных остатков для проявления биологической активности АМП. Известно, что свойства пептидов зависят от таких физико-химических параметров, как величина суммарного заряда молекулы, гидрофобных свойств, амфипатичности. Пептиды, имеющие конформацию бета-шпильки, как протегрин, обычно обладают цитотоксической активностью для клеток высших эукариот, так как в большинстве случаев способны формировать поры в липидных мембранах. На основе обобщения имеющихся в литературе данных о структурно-функциональном анализе АМП, а также о биологической активности протегрина 1, были созданы различные структурные аналоги PG1, в молекулах некоторых из которых отсутствовали дисульфидные мостики. Создание этих аналогов базировалось на многолетнем опыте работы со структурными модификациями протегринов, имеющемся в ФГБНУ «ИЭМ». В структуру PG1 были внесены и другие существенные изменения. Аминокислотные последовательности этих аналогов будут запатентованы, поэтому они не приводятся в работе.

Нами был произведен твердофазный синтез одного из аналогов PG1, остальные исследуемые пептиды были предоставлены сотрудниками лаборатории дизайна и синтеза

биологически активных пептидов ФГБНУ «ИЭМ». Твердофазный синтез предполагает последовательное присоединение аминокислот и наращивание полипептидной цепи на неподвижном полимерном носителе. Для синтеза необходимого нам пептида была выбрана Rink-амидная смола, поскольку терминальная карбоксильная группа пептида представлена в виде амида, а амидирование уже синтезированного пептида может привести к образованию рацематов. Синтезированный пептид был очищен при помощи ОФ ВЭЖХ, его чистота подтверждалась данными аналитического электрофореза, аналитической ОФ ВЭЖХ и масс-спектрометрии MALDI TOF.

Как показал анализ антимикробной активности, некоторые из исследуемых пептидов имели значительно более низкую по сравнению с PG1 активность, более узкий спектр действия, в то время как один из пептидов – АП4 демонстрировал относительно высокие показатели антимикробного действия. Обычно, в литературе, посвященной исследованию АМП, пептиды, имеющие минимальные ингибирующее концентрации (МИК) менее 5 мкМ (при использовании данной методики), рассматриваются как пептиды с высокой активностью; пептиды, имеющие МИК 5-10 мкМ – как соединения с умеренной активностью; а АМП с МИК более 10-16 мкМ – как вещества со слабовыраженным антимикробным действием. Исходя из этих представлений, пептид АП4 можно отнести к АМП с выраженной антимикробной активностью. При анализе гемолитических свойств, исследуемых АМП показано, что все аналоги практически не лизируют эритроциты человека в выбранном диапазоне концентраций. Отсутствие гемолитической активности при выраженном антимикробном действии пептида АП4 говорит о перспективности дальнейшего исследования новых аналогов, разработанных на основе АП4.

Если создание новых молекул позволяет изменить некоторые нежелательные эффекты природных соединений, то другой подход – совместное применение различных биологически активных молекул может позволить существенно снизить их эффективные концентрации. Известно, что некоторые АМП при использовании в комбинации с другими пептидами или с применяемыми для терапии инфекций антибиотиками могут проявлять синергическое антимикробное действие. Относительно часто встречаются случаи синергизма АМП с антибиотиками класса аминогликозидов. Нами исследовано совместное действие протегрина 1 с тремя антибиотиками, имеющими разные механизмы действия на бактерии – амикацином, офлоксацином и оксациллином - в отношении антибиотико-резистентных клинических изолятов бактерий. Важно отметить, что данные бактерии проявляли относительно высокую устойчивость к исследуемым антибиотикам. Показано, что при применении PG1 в комбинации с амикацином наблюдается синергический эффект,

в том числе в отношении резистентных к амикацину *Acinetobacter baumannii* и *Staphylococcus aureus*. На основании полученных данных нами было высказано предположение, что не только сочетанное применение индивидуальных препаратов пептида и амикацина многократно усиливает их антимикробное действие, но, возможно, и конъюгат этих веществ тоже позволит получить эффективное соединение.

С помощью различных кросс-линкеров получен конъюгат протегрина 1 с амикацином. Конъюгация биологически активных соединений используется в биохимических исследованиях, поскольку может усилить действие этих препаратов. При присоединении активного вещества необходимо, чтобы в результате конъюгирования не изменялись их биохимические свойства и для присоединения не использовались сайты, отвечающие за проявления биологической активности объединяемых молекул. Конъюгация по N- или C-концу чаще всего позволяет не использовать функционально значимые участки пептидов. Была проведена конъюгация с использованием кросс-линкеров DSP и сукцинового ангидрида в сочетании с EDC, в результате чего были получены искомые конъюгаты пептида с амикацином и проведено исследование их свойств. Показано, что наилучший результат позволяет получить методика с применением сукцинового ангидрида и EDC. Однако, хотя антимикробная активность конъюгата, полученного при помощи сукцинового ангидрида, и превышала в некоторых случаях активность протегрина 1 (в отношении *A. baumannii*), но, как оказалось, конъюгат проявляет гемолитическую активность в отношении эритроцитов человека – показатели этой активности ниже, чем в случае свободного протегрина, но желаемая оптимизация свойств не была достигнута с применением данного подхода.

## **6 Заключение**

В результате проведенной работы получены новые данные о структурно-функциональных свойствах синтетических аналогов природного антимикробного пептида семейства кателицидинов – протегрина 1, отобран наиболее перспективный с точки зрения практического применения аналог. Последующий детальный анализ спектра и механизма антимикробной активности этого пептида позволит разработать на его основе антибиотические препараты. Получена новая информация, подтверждающая целесообразность использования антимикробных пептидов животного происхождения в комбинации с применяемыми в медицине антибиотиками, а именно – использования комбинации протегрино-подобных пептидов и аминогликозидов. Полученные данные будут способствовать дальнейшим шагам в создании новых средств для терапии инфекционных заболеваний, которые вызываются бактериями, резистентными к конвенциональным антибиотикам, в частности средств для местного применения, используемых при обработке инфицированных ран, покрытии катетеров, стентов и других медицинских материалов.



## 7 Выводы

- С помощью твердофазного синтеза получен пептид - аналог протегрина 1 – пептида семейства кателицидинов, подтверждена чистота препарата (ОФ-ВЭЖХ, аналитический ЭФ), и соответствие его молекулярной массы расчетной (масс-спектрометрия MALDI TOF), что позволяет заключить об успешности синтеза.
- В результате проведения сравнительного анализа антимикробной активности пяти аналогов протегрина 1 (PG1) и нативного PG1, а также их гемолитической активности в отношении эритроцитов человека, установлено, что аналог АП4 (линейный пептид с повышенным суммарным положительным зарядом молекулы) обладает выраженной антимикробной активностью в отношении антибиотикоустойчивых бактерий (хотя и более низкой, чем у PG1), но практически лишен гемолитической активности, характерной для протегрина.
- При исследовании совместного действия PG1 и антибиотиков (амикацина, офлоксацина, оксациллина) выявлены синергические антибактериальные эффекты при использовании комбинаций амикацина и протегрина-1 в отношении антибиотико-устойчивых клинических изолятов *E. coli ESBL 521/17*, *Acinetobacter baumannii 7226/16*, *Staphylococcus aureus 1399/17*
- С применением различных методик получены конъюгаты PG1 с амикацином. Показано, что по показателям антимикробной активности они уступают нативному PG1, причем их гемолитическая активность сохраняется.
- По результатам проведенных исследований можно заключить, что наиболее перспективным с точки зрения практического применения является, как создание аналогов с оптимизированными свойствами, так и сочетанное применение препаратов на основе PG1 или его структурных аналогов в комбинации с другим антибиотическим соединением, в частности амикацином.

## 8 Список литературы

1. биомолекула.ру: «Соппротивление бесполезно» — новые пути преодоления развития резистентности у бактерий;
2. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. – М.,1978. - 128 с.;
3. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск. - 1989. - 344 с.;
4. Корнева Е.А., Шхинек Е.К. Гормоны и иммунная система. – Л. Наука. - 1988. – 251 с.;
5. Кокряков В.Н., Очерки о врождённом иммунитете. - СПб: «Наука». -2006. - 261с.;
6. Черешнева М.В., Черешнев В.А. Иммунологические механизмы локального воспаления // Медицинская иммунология. - 2011. - Т. 13, № 6. с. 557-568.;
7. Klebanoff S., Clark R. The neutrophil: function and clinical disorder. Amsterdam. – 1978. - 810 p.;
8. Lehrer R., Lu W.  $\alpha$ -Defensins in human innate immunity // Immunol. Rev. – 2012. – V. 245. – P. 84-112.;
9. Hancock R.E., Nijnik A., Philpott D.J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections // Nat Rev Microbiol. – 2012. – V. 10, N. 4. – P. 243-254
10. Huang HJ, Ross CR, Blecha F. Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. J Leukoc Biol. 1997 May; 61(5):624–629.;
11. Biragyn A, Surenhu M, Yang D, Ruffini PA, Haines BA, Klyushnenkova E, Oppenheim JJ, Kwak LW. Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. J Immunol. 2001 Dec 1; 167(11):6644–6653.
12. Hancock R., Chapple D. Peptide antibiotics // Antimicrobials Agents and Chemotherapy. – 1999. - V. 43. - P. 1317–1323.
13. Perregaux D. , Bhavsar K., Contillo L., Shi J., Gabel C. Antimicrobial peptides initiate IL-1 beta posttranslational processing: a novel role beyond innate immunity // J. Immunol. – 2002. - V. 168. - P. 3024-32.
14. Tkachenko S., Kokryakov V, Ashmarin I., Kubatiev A. Antimicrobial proteins of neutrophils as regulates of platelet activity // Int. J. Immunotherapy. - 1994. - V. 10 - P. 159—162.
15. Janeway C. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. – 1989. - V. 54. - P. 11-16.

16. Medzhitov R., Janeway Ch. Innate Immunity // *The New England Journal of Medicine*. - 2000. - V. 343. - P. 338-344.
17. Kwiatkowska, K., and Sobota, A. (1999) *Bioessays*, 21, 422-431
18. Segal, A.W., and Shatwell, K.P. (1997) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 832, 215-222
19. Gullberg, U., Andersson, E, Garwicz, D., Lindmark, A., and Olsson, I. (1997) *Eur. J. Haematol.*, 58, 137-153
20. Кокряков В.Н., Биология антибиотиков животного происхождения СПб. «Наука». – 1999. - 162 с.
21. Elghetany M. T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: A critical review. *Blood Cells, Mol. Dis.* 2002; 28 (2): 260–74.
22. Быков В.Л — Цитология и общая гистология. (2002) p91
23. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // *Инфекция и иммунитет*. 2017. Т.7, №3. С.219-230
24. Borregaard N., Kjeldsen L., Sengeløv H. Changes in the subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators // *J LeukBiol.* – 1994. – V. 56. – P. 80–87.
25. Hager M., Cowland J.B., Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease // *J Intern Med.* – 2010. – V. 268. – P. 25–34.
26. Адо А.Д. Патофизиология фагоцитов. М.: Медгиз. - 1961. – 295 с.
27. Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes // *Immunity*. - 2010. - V. 33. – P. 657-670.
28. Toonen R., Verhage M. Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes // *Trends Cell Biol.* – 2003. – V. 13, N. 4. – P. 177-186.
29. Burgoyne R., Morgan A. Secretory granule exocytosis // *Physiol Rev.* – 2003. – V. 83, N. 2. – P. 581-632.
30. Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2007. – V. 5. P. 577–582.
31. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science*. – 2004. – V. 303. – P. 1532–1535.

32. Fuchs, T.A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D.D., Jr., Wroblewski, S.K., Wakefield, T.W., Hartwig, J.H., and Wagner, D.D. Extracellular DNA traps promote thrombosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* -2010. – 107. –V. 14390–14395.
33. Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacker, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., and Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans* // *PLoS Pathog.* – 2009. – V. 5. – P. 1000639.
34. Jaillon, S., Peri, G., Delneste, Y., Fre' maux, I., Doni, A., Moalli, F., Garlanda, C., Romani, L., Gascan, H., Bellocchio, S. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps // *J. Exp. Med.* – 2007. – V. 204. – V. 793–804
35. Янковский О.Ю. Токсичность кислорода и биологические системы // СПб. – 2000. – 294 с.
36. Auvynet C., Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity // *FEBS Journal.* – 2009. -. V. 276, N. 22. - P. 6497–6508.
37. Cederlund A., Gudmundsson G., Agerberth B. Antimicrobial peptides important in innate immunity // *FEBS Journal.* – 2011. –V. 278. – P. 3942–3951.
38. Bulet P., Stocklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation // *Protein Pept. Lett.* - 2005. - V.12. - №1. - P.3-11].
39. Breukink E., de Kruijff B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 321-332
40. Hofmann A.F. How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria / A.F. Hofmann, L. Eckmann // *PNAS.* – 2006. – V. 103, №12. – P.4333–4334.
41. Gaspar D. From antimicrobial to anticancer peptides. A review / D. Gaspar, A.S. Veiga, M.A.R.B. Castanho // *Front. Microbiol.* – 2013. – V. 4. – E.294. – URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00294>
42. Покровский В.И. Энциклопедический словарь медицинских терминов / В.И. Покровский. – М.: Медицина, 2001. – 960 с.
43. Lai Y. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense / Y. Lai, R.L. Gallo // *Trends Immunol.* – 2009. – V. 30, №3. – P.131–141.
44. Bevins C.L. Antimicrobial peptides as effector molecules of mammalian host defense /

- C.L. Bevins // *Contrib. Microbiol.* – 2003. – V. 10. – P.106–148.
45. Designed antimicrobial and antitumor peptides with high selectivity / J. Hu, C. Chen, S. Zhang, X. Zhao, H. Xu, J.R. Lu // *Biomacromolecule.* – 2011. – V. 12. – P.3839–3843.
46. Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging / M.C. Stensberg, Q. Wei, E.S. McLamore, D.M. Porterfield, A. Wei, M.S. Sepúlveda // *Nanomedicine (Lond).* – 2011. – V. 6, №5. – P.879–98.
47. Guaní-Guerra E., Santos-Mendoza T., Lugo-Reyes S. O., Terán L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease // *Clin. Immunol.* 2010. Vol. 135, iss. 1. P. 1–11
48. Nijnik A., Hancock R. E. W. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections // *Emerging Health Threats J.* 2009. Vol. 2. e1. URL: <https://www.semanticscholar.org/paper/Host-defence-peptides%3A-antimicrobial-and-activity-Nijnik-Hancock/8b0bea29da6d4e3a41d9e0cc2cff1b1085cfb913> (дата обращения: 20.05.18)
49. Phoenix D.A. *Antimicrobial Peptides* / D.A. Phoenix, S.R. Dennison, F. Harris. – Singapore: Wiley-VCH, 2013. – 231 p.
50. Мазинг Ю.А. Нейтрофильные гранулоциты и система защиты организма // *Арх. Патологии.* – 1991. - № 9. – с. 70-73.
51. Kokryakov V., Harwig K., Panyutich E., Shevchenko A., Aleshina M., Shamova O., Korneva H., Lehrer R. Protegrins: leucocyte antimicrobial peptides combine features of corticostatic defensins and tachyplesins // *FEBS Lett.* – 1993. - V. 327. - P. 231-236
52. Harwig S., Qu X., Oren A., Shafer W., Lehrer R. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to Protegrins // *Infect. Immun.* - 1996. - V.64. - P. 1240–1245.
53. Yasin B., Harwig S., Lehrer R. Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to protegrins and defensins // *Infect. Immun.* - 1996. - V. 64. - P. 709–713.
54. Miyakawa Y., Ratnakar P., Rao A., Costello M., Mathieu-Costello O., Lehrer R., Catanzaro A. In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Immun.* - 1996. - V. 64. - P. 926–932.
55. Tamamura H., Murakami T., Horiuchi S., Sugihara K., Otaka A., Takada W., Ibuka T., Waki M., Yamamoto N., Fujii. Synthesis of Protegrin-Related Peptides and Their Antibacterial and Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity // *Chem. Pharm. Bull.* - 1995. - V.43. - P. 853-858.

56. Scocchi M., Tossi A., Gennaro R. Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2011. - V. 68. - P. 2317–2330.
57. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта: учебник. Под ред. В.Н. Царева. ГЭОТАР-Медиа - Всего страниц: 576. 84
58. «Рациональная антибиотикотерапия», С.М.Навашин, И.П.Фомина
59. Значение ферментативной модификации аминогликозидов в развитии резистентности у бактерий Г.К. Решедько *Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия* Т.1 №1 1999 С.40-50
60. Офлоксацин. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. РЛС Патент. — Инструкция, применение и формула.
61. Morrissey I., Hoshino K., Sato K., Yoshida A., Hayakawa I., Bures M. G., Shen L. L. Mechanism of differential activities of ofloxacin enantiomers. (англ.) // *Antimicrobial agents and chemotherapy.* — 1996. — Vol. 40, no. 8. — P. 1775—1784. — PMID 8843280
62. Quinolone–Binding Pocket of DNA Gyrase: Role of GyrB. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46, 1805–1815
63. Шамова О.В., Сакута Г.А, Орлов Д.С., Зенин В.В., Штейн Г.И., Колодкин Н.И., Афолина И.Н., Кокряков В.Н. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре // *Цитология.* – 2007. – Т. 49, № 12. - С. 1000-1010.
64. Turner RB1, Smith DL, Zawrotny ME, Summers MF, Posewitz MC, Winge DR Solution structure of a zinc domain conserved in yeast copper-regulated transcription factors. *Nat Struct Biol.* 1998 Jul;5(7):551-5.
65. Cho, J.H., Park, C.B., Yoon, Y.G., Kim, C.S. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – N. 1408. – P. 67.
66. Miyasaki K.T., Iofe R., Huynh T., Oren A., R.I. Lehrer. Killing of *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* by protegrins // *J. Periodont. Res.* - 1998. - V.33. - P.91-98.
67. Lehrer R., Lichtenstein A., Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells // *Annu. Rev. Immunol.* – 1993. – V. 11. - P. 105-28.
68. <https://biomolecula.ru/articles/antimikrobnnye-peptidy-vozmozhnaia-alternativa-traditsionnym-antibiotikam>

69. Panyim S., Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones // Arch. Biochem. Biophys. – 1969. - V. 130. - P. 337-346.
70. Klotz. I.M., Succinylation. in “Methods in Enzymology” (C.H.W. Hirs, ed), Vol. 11, p.576. Academic Press, New York
71. Williams, A., and Ibrahim, I.A. (1981) A mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). J. Am. Chem. Soc. 103, 7090-7095
72. Tossi A., Scocchi M., Zanetti M., Genaro R., Storici P., Romeo D. An approach combining cDNA amplification and chemical synthesis for the identification of novel, cathelicidin-derived, antimicrobial peptides // Antibacterial peptide protocols (Ed. by W.Shafer). – Totowa, N.J.: Humana Press Inc., 1998. – P.133–151.
73. Gani Orhan, Aysen Bayram, Yasemin Zer and Iclal Balci / Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*// J. Clin. Microbiol. January 2005 vol. 43 no. 1 140-143
74. Jacobs D. Laboratory test habdbook // Lexicimp. – 1999. - 825 p.
75. Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I. Anal. Biochem., 1970, v. 34, P. 595-611