

УДК: 616-092.7

doi:

## Механизмы действия антимикробных пептидов бактенецинов *ChBac3.4*, *ChBac5* и *mini-ChBac7.5Nβ* на бактериальные клетки

Шамова О.В.<sup>1,2</sup>, Жаркова М.С.<sup>1</sup>, Копейкин П.М.<sup>1</sup>, Орлов Д.С.<sup>1,2</sup>, Корнева Е.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский Государственный Университет, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д.7-9

Антимикробные пептиды (АМП) системы врожденного иммунитета — соединения, играющие важную роль в патогенезе инфекционных заболеваний, так как обладают свойством инактивировать широкий спектр патогенных бактерий, обеспечивая противомикробную защиту живых организмов. В настоящее время АМП рассматриваются как потенциальные соединения-корректоры инфекционной патологии, вызываемой антибиотикорезистентными бактериями (АБР). Цель данной работы состояла в изучении механизмов антибактериального действия трех пептидов, принадлежащих к семейству бактенецинов — *ChBac3.4*, *ChBac5* и *mini-ChBac7.5Nβ*. Эти химически синтезированные пептиды являются аналогами природных пролин-богатых АМП, обнаруженных в лейкоцитах домашней козы *Capra hircus* и проявляющих высокую антимикробную активность, в том числе и в отношении грамотрицательных АБР. Методы. Минимальные ингибирующие и минимальные бактерицидные концентрации пептидов (МИК и МБК) определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде с последующим высевом на плотную питательную среду. Эффекты пептидов на проницаемость цитоплазматической мембраны бактерий для хромогенного маркера исследовали с использованием генетически модифицированного штамма *Escherichia coli* ML35p. Действие бактенецинов на метаболическую активность бактерий изучали с применением маркера резазурина. Результаты. Показано, что все исследованные пептиды проявляют высокую антимикробную активность в отношении *Escherichia coli* ML35p и антибиотикоустойчивых штаммов *Escherichia coli* ESBL и *Acinetobacter baumannii* *in vitro*, но их действие на бактериальные клетки разное. Использован комплекс методик, позволяющих наблюдать в режиме реального времени динамику действия бактенецинов в различных концентрациях (включая их МИК и МБК) на барьерную функцию цитоплазматической мембраны и на интенсивность метаболизма бактериальных клеток, что дало возможность выявить различия в характере воздействия бактенецинов, отличающихся по структуре молекулы, на исследуемые микроорганизмы. Установлено, что действие каждого из трех исследованных бактенецинов в бактерицидных концентрациях отличается по эффективности нарушения целостности бактериальных мембран и в скорости подавления метаболизма клеток. Заключение. Полученная информация дополнит существующие фундаментальные представления о механизмах действия пролин-богатых пептидов врожденного иммунитета, а также послужит основой для биотехнологических исследований, направленных на разработку на базе этих соединений новых антибиотических препаратов для коррекции инфекционных заболеваний, вызываемых АБР и являющимися причинами тяжелых внутрибольничных инфекций.

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды, пролин-богатые пептиды, бактенецины.

**Для цитирования:** Шамова О.В., Жаркова М.С., Копейкин П.М., Орлов Д.С., Корнева Е.А. Механизмы действия антимикробных пептидов бактенецинов *ChBac3.4*, *ChBac5*, *mini-ChBac7.5Nβ* на бактериальные клетки. Патогенез. 2017; 15(3): 43–50.

**Для корреспонденции:** Шамова Ольга Валерьевна, доктор биол. наук, доцент, зав. отделом общей патологии и патофизиологии. E-mail: oshamova@yandex.ru

**Финансирование.** Поддержано грантом РФФИ № 17-04-02177.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарности:** Сотруднице ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера доктору биол. наук А.Г. Афиногеновой за любезно предоставленные штаммы бактерий.

Поступила 19.05.2017

## Mechanisms involved in effects of antimicrobial peptides, bactenectins *ChBac3.4*, *ChBac5*, and *mini-ChBac7.5Nβ*, on bacterial cells

Shamova O.V.<sup>1,2</sup>, Zharkova M.S.<sup>1</sup>, Kopeykin P.M.<sup>1</sup>, Orlov D.S.<sup>1,2</sup>, Korneva E.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Medicine», Akademika Pavlova Str. 12, St. Petersburg 197376, Russia

<sup>2</sup> St. Petersburg State University, Universitetskaya Naberezhnaya 7-9, St. Petersburg 199034, Russia

Antimicrobial peptides (AMPs) of the innate immunity are compounds that play an important role in pathogenesis of infectious diseases due to their ability to inactivate a broad array of pathogenic bacteria, thereby providing anti-microbial host defense. AMPs are currently considered promising compounds for treatment of in-

fectious diseases caused by antibiotic-resistant bacteria. The aim of this study was to investigate molecular mechanisms of the antibacterial action of three peptides from the bactenecin family, ChBac3.4, ChBac5, and mini-ChBac7.5N $\beta$ . These chemically synthesized peptides are analogues of natural proline-rich AMPs previously discovered by the authors of the present study in leukocytes of the domestic goat, *Capra hircus*. These peptides exhibit a high antimicrobial activity, in particular, against antibiotic-resistant gram-negative bacteria. **Methods.** Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of the peptides (MIC and MBC) were determined using the broth microdilution assay followed by subculturing on agar plates. Effects of the AMPs on bacterial cytoplasmic membrane permeability for a chromogenic marker were explored using a genetically modified strain, *Escherichia coli* ML35p. The effect of bactenecins on bacterial metabolic activity was studied using a resazurin marker. **Results.** All the studied peptides showed a high *in vitro* antimicrobial activity against *Escherichia coli* ML35p and antibiotic-resistant strains, *Escherichia coli* ESBL and *Acinetobacter baumannii*, but differed in features of their action on bacterial cells. The used combination of techniques allowed the real-time monitoring of effects of bactenecin at different concentrations (including their MIC and MBC) on the cell membrane barrier function and metabolic activity of bacteria. The differences in effects of these three structurally different bactenecins on the studied microorganisms implied that these peptides at bactericidal concentrations differed in their capability for disintegrating bacterial cell membranes and rate of inhibiting bacterial metabolism. **Conclusion.** The obtained information will supplement the existing basic concepts on mechanisms involved in effects of proline-rich peptides of the innate immunity. This information will also stimulate biotechnological research aimed at development of new antibiotics for treatment of infectious diseases, such as severe in-hospital infections, caused by antibiotic-resistant strains.

**Key words:** antimicrobial peptides; proline-rich peptides; bactenecins.

**For citation:** Shamova O.V., Zharkova M.S., Kopeykin P.M., Orlov D.S., Korneva E.A. Mechanisms involved in effects of antimicrobial peptides, bactenecins ChBac3.4, ChBac5, and mini-ChBac7.5N $\beta$ , on bacterial cells. *Pathogenesis*. 2017; 15(3): 43–50 (In Russian).

**For correspondence:** Shamova Olga Valerievna, doctor of biology. sci., associate professor, head. department of general pathology and pathophysiology. E-mail: oshamova@yandex.ru; Tel. 8-911-253-09-29.

**Funding.** Supported by RFBR grant No. 17-04-02177.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments:** The employee of the FBBUN of the Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Doctor of Biology. Sciences A.G. Afinogenova for kindly provided strains of bacteria.

**Received** 19.05.2017

## Введение

Среди наиболее интенсивно развивающихся направлений современных исследований в области как фундаментальной медицины, так и биотехнологии важное место занимает поиск новых антимикробных препаратов для борьбы с инфекционными заболеваниями, вызываемыми бактериями, резистентными к терапии существующими антибиотиками. Одним из возможных путей преодоления проблемы антибиотикорезистентности является разработка препаратов на основе природных соединений, осуществляющих противoinфекционную защиту человека и животных — антимикробных пептидов системы врожденного иммунитета. Эти пептиды содержатся в клетках, обеспечивающих немедленный ответ на вторжение патогенных микроорганизмов, в частности, в нейтрофильных гранулоцитах, а также в клетках барьерных эпителиев и других типах клеток, участвующих в реализации защитных функций. Антимикробные пептиды (АМП) играют важную роль в патогенезе инфекционных заболеваний, от эффективности их действия на возбудителя заболевания во многом зависит характер течения инфекционного процесса — его подавление или развитие. АМП обнаружены у различных живых организмов, они отличаются по структуре молекул и имеют разные механизмы антибактериального действия. Многие АМП сочетают антимикробные свойства с иммуномодулирующим действием, что обуславливает повышенный интерес к этим веществам [1, 2, 3]. Ряд пептидов проявляет и токсичность для клеток макроорганизма, что представляет серьезную проблему для их использования в медицине [4]. Среди различных структурных групп АМП одними из наиболее перспек-

тивных соединений для практического применения являются обогащенные пролином пептиды, имеющие высокую антимикробную активность в отношении грамотрицательных бактерий и низкую токсичность для клеток млекопитающих [5]. Такие АМП содержат 20–50% остатков пролина в аминокислотной последовательности и в большинстве случаев отличаются высоким суммарным положительным зарядом молекулы [6]. На основе обогащенных пролином АМП из гемоцитов насекомых уже создаются антибиотические препараты [7, 8].

Цель данной работы состояла в изучение механизмов антибактериального действия трех пептидов, принадлежащих к семейству бктенецинов — ChBac3.4, ChBac5, mini-ChBac7.5N $\beta$ . Эти пептиды были ранее выделены нами из лейкоцитов домашней козы [9, 10, 11]. Установлена их высокая антимикробная активность в отношении ряда штаммов антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий [12]. Приведенные названия пептидов включают аббревиатуру видового названия источника получения — *Capra hircus* (домашняя коза) и величину молекулярной массы в кДа — 3,4 кДа, 5 кДа и 7,5 кДа (приставка mini указывает на то, что пептид является N-концевым фрагментом — 22 аминокислотных остатка — бктенецина ChBac7.5). Для описанных в литературе обогащенных пролином пептидов беспозвоночных и некоторых представителей этой группы соединений из лейкоцитов млекопитающих установлено несколько мишеней антимикробного действия. Показано, что в низких концентрациях они нарушают внутриклеточные процессы: блокируют синтез белка, связываясь с 70S рибосомой бактерии [13,

14], нарушают процесс фолдинга белков [15], — а в более высоких концентрациях оказывают повреждающее действие на бактериальные мембраны [16]. Механизм антибактериального действия рассматриваемых в данной работе бактенецинов остается малоизученным.

В задачи работы входило изучение эффектов бактенецинов козы, применяемых в разных концентрациях, на проницаемость наружной и цитоплазматической мембран *Escherichia coli* ML35p для хромогенных маркеров, а также на метаболическую активность нескольких штаммов бактерий: *Escherichia coli* ML35p и антибиотикоустойчивых клинических изолятов *Acinetobacter baumannii* и *Escherichia coli* ESBL, — оцениваемую с помощью маркера резазурина, *in vitro*. Актуальность данного исследования обусловлена важностью выяснения молекулярно-клеточных основ биологической активности пептидов, которые могут рассматриваться в качестве прототипов новых соединений-корректоров патологии, связанной с развитием инфекционного процесса, вызываемого грамотрицательными антибиотикоустойчивыми бактериями. Необходимость проведения таких работ подчеркивается Всемирной организацией здравоохранения, опубликовавшей список видов бактерий, представляющих в настоящее время наиболее серьезную опасность для жизни и здоровья человека. Для борьбы с этими микроорганизмами требуется внедрение в клиническую практику принципиально новых лечебных и профилактических технологий. К числу перечисленных наименований бактерий относятся и исследуемые в данной работе виды — антибиотикорезистентные штаммы *Escherichia coli* и *Acinetobacter baumannii*.

### Материалы и методы

**Антимикробные пептиды** бактенецины произведены методом химического твердофазного синтеза с применением Fmoc/tBu-стратегии. Нарращивание пептидной последовательности на 2-хлортритилхлоридной смоле проводили в автоматическом синтезаторе Symphony X (Protein Technologies, Inc., США). Использовали Fmoc-защиту  $\alpha$ -аминогрупп аминокислот. Активацию проводили *in situ* под действием раствора смеси HSTU/N-этилморфолин в среде диметилформамида. Отщепление аминокислотной последовательности с полимера с одновременным удалением всех защитных групп осуществляли под действием трифторуксусной кислоты с добавками смеси H<sub>2</sub>O/триизопропилсилан. Очистку пептидов выполняли с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Чистота полученных пептидов была не менее 95%, что подтверждалось с помощью аналитического электрофореза, ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF MS).

**Бактерии.** Использовали три штамма грамотрицательных бактерий: штамм *Escherichia coli* ML35p был любезно предоставлен профессором Робертом Лерером (Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США); антибиотикоустойчивые клинические изоляты микроорганизмов: *Escherichia coli* ESBL (штамм, продуцирующий бета-лактамазы расширенного спектра), выделенный из мочи пациента и обладающий устойчивостью к ампициллину, амоксициллину/клавулоновой кислоте, цефтазидиму, цефотаксиму, цефелому, нетилимицину, азтреонаму, ципрофлоксацину, триметоприму/сульфаметоксазолу, и *Acinetobacter*

*baumannii*, полученный из инфицированной раны и устойчивый к имипенему, тобрамицину, гентамицину, ципрофлоксацину, триметоприму/сульфаметоксазолу.

**Определение минимальных ингибирующих и минимальных бактерицидных концентраций пептидов** проводили стандартным методом серийных разведений в жидкой питательной среде, с незначительными модификациями [17]. Двукратные серийные разведения исследуемых препаратов проводили в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 с 100 мМ хлорида натрия и вносили по 50 мкл в лунки стерильных 96-луночных планшетов, куда затем добавляли по 50 мкл суспензии микроорганизмов ( $1-2 \cdot 10^4$  колониеобразующих единиц (КОЕ) на лунку) в 2,1% бульоне Мюллера—Хинтона. Пробы инкубировали при 37°C в течение 24 часов и определяли минимальные ингибирующие концентрации (МИК) — наименьшие концентрации препарата, при использовании которых не наблюдался видимый рост микроорганизма в лунках планшета. Последующим посевом из этих лунок на плотную питательную среду (триптон-соевый агар) определяли минимальные бактерицидные концентрации пептидов (МБК). Для каждого разведения образца или контрольных проб имелось по три повторности; результаты исследований представлены как медианы, полученные по данным трех независимых экспериментов.

**Влияние препаратов на проницаемость мембран *E.coli* ML-35p для хромогенного маркера** оценивали спектрофотометрически. Принцип метода и особенности штамма бактерии, генетически модифицированного для использования в данном тесте, описаны ранее [18, 19]. Детектировали изменение проницаемости цитоплазматической мембраны *E.coli* ML35p, обработанной пептидами, для хромогенного маркера о-нитрофенил- $\beta$ -галактопиранозиды (ONPG, фирмы Sigma, США), являющегося субстратом для фермента  $\beta$ -галактозидазы, находящегося в цитоплазме клетки, по накоплению продукта этой ферментативной реакции. Состав проб: исследуемые препараты в различных концентрациях (в контрольные лунки вместо пептидов добавляли буфер), суспензия бактерий ( $2,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл), 2,5 мМ ONPG, 10 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7,4, 100 мМ хлорида натрия. В качестве стандарта использовали мембранолитический пептид протегрин 1 [20]. Эксперимент проводили при температуре 37°C и периодическом встряхивании планшетов. О способности пептидов вызывать увеличение проницаемости цитоплазматической мембраны *E.coli* ML35p судили по увеличению оптической плотности раствора при длине волны 420 нм. Измерения проводили на планшетном спектрофотометре SpectraMax 250 (Molecular Devices, США). Эксперименты повторяли 3—5 раз; на графиках, построенных с помощью программы SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США), представлены результаты одного из типичных экспериментов.

**Влияние препаратов на уровень метаболизма бактериальных клеток** оценивали флуориметрически с использованием маркера дыхательной активности резазурина, который в присутствии продуктов дыхательной цепи бактерий восстанавливается до резорурфина, обладающего интенсивной флуоресценцией на 590 нм, как описано [21]. Экспериментальные пробы в лунках планшета включали исследуемые пептиды в различных концентрациях, суспензию бактерий ( $2,5 \cdot 10^4$  или  $2,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл), резазу-

рин (120 мкМ), питательную среду (бульон Мюллера—Хинтона, 0,1%), 10 мМ натрий-фосфатный буфер рН 7,4, 100 мМ хлорида натрия. Контрольные пробы содержали суспензию бактерий без добавления пептидов или инкубационную среду, не содержащую ни бактерий, ни пептидов. Интенсивность флуоресценции измеряли на планшетном спектрофлуориметре Gemini EM (Molecular Devices, США) в течение 4–10 ч 1 раз/мин на 590 нм с возбуждением на 560 нм с периодическим встряхиванием. Эксперименты повторяли 3–5 раз; на графиках, построенных с помощью программы SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США), представлены результаты одного из типичных экспериментов.

### Результаты и обсуждение

Бактенецины — семейство антимикробных пептидов, характеризующихся высоким содержанием аминокислотного остатка пролина в составе молекулы и выраженной активностью в отношении грамотрицательных бактерий, в том числе мультирезистентных штаммов. Эти соединения обнаружены в основном у парнокопытных и составляют доминирующий структурный класс АМП, содержащихся в гранулах нейтрофилов этих животных. Высокая антимикробная активность и низкая токсичность по отношению к клеткам макроорганизма привлекают внимание к бактенецинам, как к прототипам новых антибиотиков, и обуславливают необходимость детального изучения механизмов их действия на бактерии [22]. Наиболее исследованными пептидами этой группы являются бактенецины лейкоцитов быка, в частности, бактенецин 7: описаны особенности его действия на бактериальные клетки, выявлены молекулярные мишени, причем преимущественное действие на мембраны клеток или внутриклеточные мишени определяется концентрацией пептида в инкубационной среде [16]. Бактенецины лейкоцитов козы остаются значительно менее изученными. Из исследуемых в данной работе бактенецинов пептид mini-ChVac7.5β имеет значительное структурное свойство с N-концевым фрагментом бактенецина 7 быка и, как было показано ранее, демонстрирует свойства, типичные для пролин-богатого АМП — избирательное действие на грамотрицательные бактерии и слабо выраженное повреждающее действие на бактериальные мембраны [11]. ChVac3.4 и ChVac5 несколько отличаются более широким спектром антимикробной активности и более выражен-

ным свойством нарушать барьерную функцию бактериальных мембран [10]. Ранее нами было показано, что исследуемые бактенецины проявляют высокую антимикробную активность в отношении антибиотикорезистентных бактерий (минимальные ингибирующие рост бактерий концентрации пептидов составляли в большинстве случаев 1–8 мкМ) [12]. В задачи настоящего исследования входил детальный анализ действия пептидов в различных концентрациях на проницаемость цитоплазматической мембраны модельного штамма *E.coli* ML35p для хромогенного маркера, а также эффектов пептидов на метаболическую активность трех исследуемых штаммов бактерий (*E.coli* ML35p и двух штаммов антибиотикорезистентных клинических изолятов грамотрицательных бактерий — *E.coli* ESBL и *A.baumannii*) с применением маркера резазурина в режиме реального времени, для получения информации об эффектах пептидов на бактериальные клетки в концентрациях, при которых они ингибируют рост бактерии или оказывают бактерицидное действие.

С помощью метода серийных разведений в жидкой питательной среде с последующим высевом на плотную питательную среду определены величины минимальных ингибирующих и минимальных бактерицидных концентраций (МИК и МБК, соответственно) пептидов в отношении трех исследуемых штаммов бактерий (таблица). Для сравнения был использован мембраноактивный пептид протегрин 1 (PG1), механизм действия которого определяется его быстрым и необратимым повреждающим действием на мембраны бактерий.

Установлено, что исследуемые бактенецины проявляют бактерицидный эффект в концентрациях, в большинстве случаев в 2–4 раза превышающих их минимальные ингибирующие концентрации, как в отношении лабораторного штамма кишечной палочки, так и для антибиотикоустойчивых изолятов бактерий. Мембраноактивный протегрин 1 демонстрировал бактерицидное действие при его применении в концентрациях, равных МИК.

Изучено влияние пептидов на интенсивность метаболических процессов у исследуемых бактерий, обработанных пептидами в концентрациях, равных их МИК, с применением маркера дыхательной активности — резазурина, позволяющего детектировать появление продуктов функционирования дыхательной цепи бактерий (рис. 1). В присутствии живых, активно метаболизирующих клеток резазурин восстанавливается, взаимодействуя с образующимися в процессе клеточного дыхания соединения-

Таблица

Минимальные ингибирующие и минимальные бактерицидные концентрации (МИК и МБК) пептидов, мкМ\*

Вещество	МИК и МБК (мкМ) в отношении бактерий					
	<i>E.coli</i> ML35p		<i>E.coli</i> ESBL кл.изол.		<i>A.baumannii</i> клин. изол.	
	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК
ChVac3.4	2	2	2	4	1	4
ChVac5	2	4	1	4	2	2
miniChVac7.5Nβ	1	4	1	4	2	8
PG1	1	1	1	1	1	1

Примечание. \* Данные представлены как медианы, полученные в результате проведения 3 серий экспериментов (в каждом опыте все пробы имели по три повторности).

ми (в частности, НАДФН, НАДН); ход реакции может детектироваться в динамике флуориметрически. Увеличение числа клеток в суспензии сопровождается ростом флуоресценции в максимуме поглощения продукта реакции (резорурфина). В случае, если рост культуры подавляется или ингибируется процесс дыхания клеток, подобное увеличение не наблюдается.

В присутствии анализируемых соединений не выявлялось продуктов дыхательной цепи бактерий на протяжении более десяти часов наблюдения, что свидетельствует о полном подавлении процессов их жизнедеятельности в течение этого периода времени.

Чтобы выяснить, сопровождается ли данный эффект повреждением мембран бактерий, исследовали действие пептидов на проницаемость цитоплазматической мембраны *E. coli* ML35p для хромогенного маркера (о-нитрофенил-β-галактопиранозида — ONPG). Данный штамм бактерии служит в качестве модельной системы для оценки влияния различных соединений на барьерную функцию бактериальных мембран, так как характеризуется отсутствием пермеазы лактозы и конститутивным синтезом фермента β-галактозидазы в цитоплазме клеток, что обуславливает возможность применять хромогенные субстраты этого фермента, в частности ONPG, и детектировать окрашенные продукты ферментативной реакции, которые появляются лишь при условии нарушения целостности цитоплазматической мембраны бактерии.

На рис. 2 приведены графики, отражающие кинетику действия исследуемых бактенецинов в разных концентрациях на цитоплазматическую мембрану *E. coli* ML35p (для сравнения использован мембраноактивный пептид протегрин 1). Увеличение ее проницаемости для маркерной молекулы в присутствии ChVac3.4 и ChVac5 наблюдается при инкубировании бактерии с пептидом в концентрации, равной его МИК (таблица), через 10–15 мин и продолжает возрастать в течение времени измерения показателя более часа, о чем свидетельствует возрастание оптической плотности раствора, определяемое появлением в нем цветного продукта расщепления ONPG.

Наблюдаемое повышение проницаемости мембраны не столь выражено, как в случае действия на нее пептида PG1, эффект которого детектируется при концентрации, равной МИК, уже через 5–10 мин после добавления пептида в суспензию бактерии. Бактенецин mini-ChVac7.5Nβ

оказывает значительно менее существенное влияние на исследуемый показатель — его эффект проявляется лишь в концентрации, в 4 раза превышающей МИК, и остается слабовыраженным и при использовании его в более высоких концентрациях. Таким образом, действие исследуемых пептидов на мембрану грамотрицательной бактерии *E. coli* ML35p различно, хотя показатели их МИК сходны.

Необходимо отметить, что данная методика предполагает анализ действия препаратов в суспензии бактерии с относительно высоким содержанием колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий на мл —  $2,5 \cdot 10^7$ , что отличается от условий инкубации пептидов с микроорганизмами, использующихся при определении их МИК методом серийных разведений в жидкой питательной среде, где этот показатель составляет  $1-2 \cdot 10^4$  КОЕ/мл. Чтобы более точно сопоставить результаты оценки влияния пептидов на барьерную функцию бактериальных мембран с данными, полученными при изучении эффектов пептидов на метаболическую активность микроорганизмов, проведена серия экспериментов с применением маркера интенсивности дыхательных процессов резазурина в тех же условиях, которые были при выполнении исследования действия пептидов на мембраны, то есть при более высоком содержании колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий в инкубационной среде —  $2,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл. Полученные результаты представлены на рис. 3. Показатели антимикробной активности бактенецинов при их использовании в концентрации, равной МИК (рис. 3 *з, д, е*), в данных условиях отличаются от показателей, определенных при постановке экспериментов в среде с более низким содержанием бактериальных клеток (рис. 1), то есть имеет место некоторый эффект инокулюма (снижение антимикробной активности препаратов при повышении плотности бактериальной популяции). Данный эффект наиболее выражен в случае применения минибактенецина mini-ChVac7.5Nβ — даже в концентрации, в четыре раза превышающей МИК (4 МИК), что соответствовало его минимальной бактерицидной концентрации (МБК), добавление пептида не вызывает полного угнетения процессов жизнедеятельности бактерий обоих штаммов кишечной палочки за наблюдаемый промежуток времени (рис. 3 *а, б*).

Однако в отношении *A. baumannii* этот же пептид проявляет значительно более выраженное действие — при

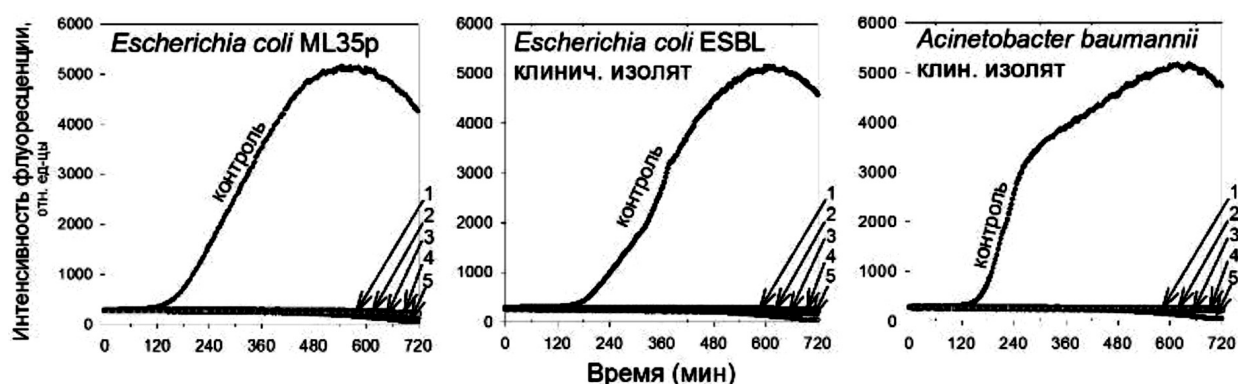


Рис. 1. Кинетика накопления флуоресцентного продукта восстановления резазурина, отражающая интенсивность метаболических процессов в клетках *Escherichia coli* ML35p и антибиотикоустойчивых клинических изолятов *Acinetobacter baumannii* и *Escherichia coli* ESBL (содержание бактерий в пробе —  $1-2 \cdot 10^4$  КОЕ/мл) при обработке микроорганизмов пептидами в концентрации, равной минимальной ингибирующей концентрации, определенной методом серийных разведений в жидкой питательной среде. По оси ординат — интенсивность флуоресценции в относительных единицах; по оси абсцисс — время от начала инкубации в минутах.

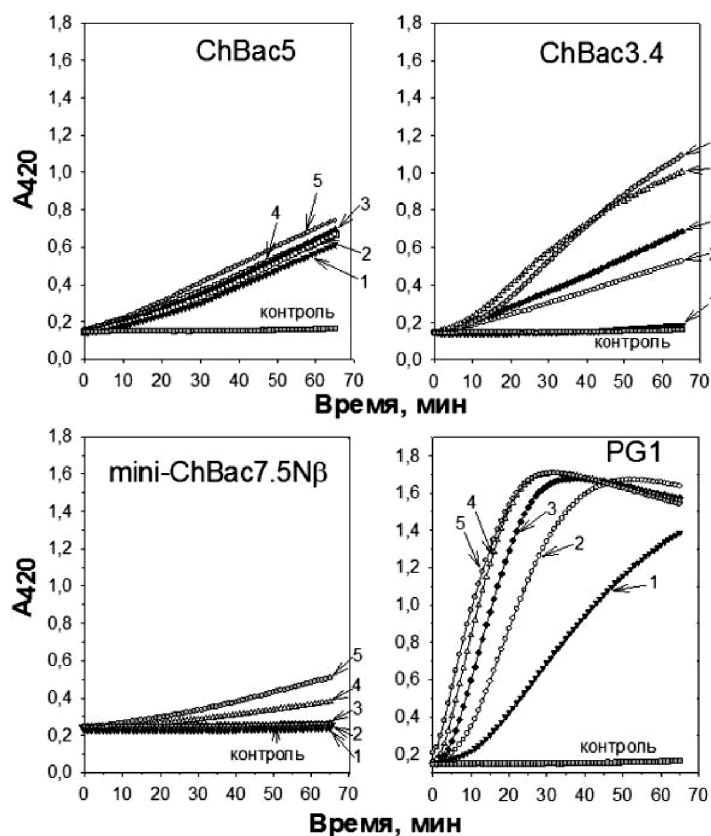


Рис. 2. Кинетика изменения проницаемости цитоплазматической мембраны *E. coli* ML35р для хромогенного маркера о-нитрофенил-β-галактопиранозид (ONPG) при действии пептидов (указаны на графиках) в различных концентрациях: 1 – в концентрации, равной минимальной ингибирующей концентрации (МИК); 2 – в концентрации, в 2 раза превышающей МИК, 3 – в 4 раза; 4 – в 8 раз и 5 – в 16 раз превышающей МИ. По оси ординат – время инкубации пептидов в разных концентрациях с бактерией (в мин); по оси абсцисс – оптическая плотность раствора, содержащего продукты гидролиза ONPG, при длине волны 420 нм.

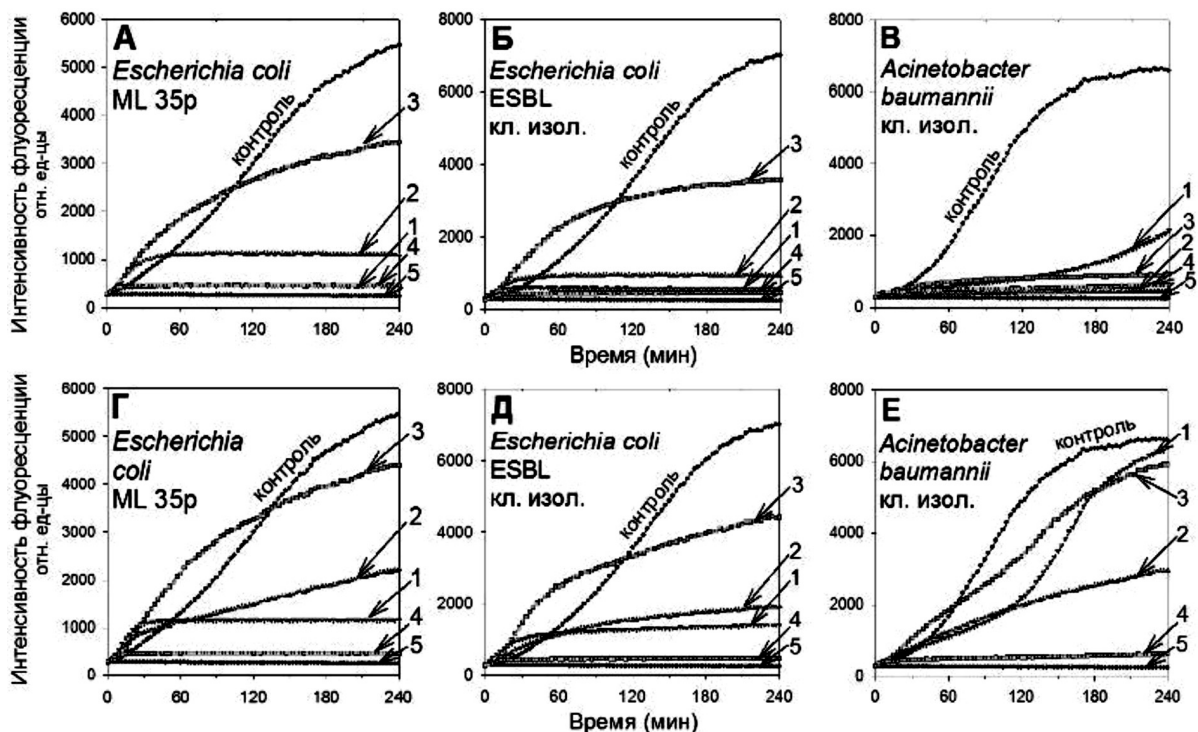


Рис. 3. Кинетика накопления флуоресцентного продукта восстановления резазурина, отражающая интенсивность метаболических процессов в клетках *Escherichia coli* ML35р и антибиотикоустойчивых клинических изолятов *Acinetobacter baumannii* и *Escherichia coli* ESBL (содержание бактерий в пробе –  $2,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл) при обработке микроорганизмов пептидами в концентрации, равной минимальной бактерицидной концентрации (а, б, ) или минимальной ингибирующей концентрации (г, , е), определенных методом серийных разведений в жидкой питательной среде с последующим высевом на плотную питательную среду. По оси ординат – интенсивность флуоресценции в относительных единицах; по оси абсцисс – время от начала инкубации в минутах.

использовании его в концентрации 4 МИК (равной МБК) метаболическая активность этого микроорганизма практически полностью подавляется (рис. 3 в). Другие бактерицины демонстрируют более высокую активность в использованной модельной системе. Пептид ChVac3.4, проявляющий наиболее выраженное свойство повреждать цитоплазматическую мембрану бактерий по сравнению с другими бактенецинами, полностью ингибирует клеточное дыхание в концентрации, равной МБК, у исследуемых штаммов *E. coli*, что, по-видимому, свидетельствует о гибели бактерий (рис. 3 а, б), так как в этой концентрации он нарушает барьерную функцию бактериальных мембран (рис. 2).

В присутствии пептида ChVac5 метаболическая активность бактерий тоже подавляется, хотя и в несколько меньшей степени, чем при действии ChVac3.4 (рис. 3). Можно предположить, что бактерицидный эффект этих пептидов был во многом обусловлен их действием на бактериальные мембраны, дополняя нарушение внутриклеточных процессов. Что касается пептида mini-ChVac7.5Nβ, возможно, его относительно низкая активность в экспериментах с резазурином и отсутствие выраженного действия в концентрации, равной по величине его бактерицидной концентрации, определяется тем, что он имеет более высокий суммарный положительный заряд молекулы по сравнению с другими исследуемыми бактенецинами и в присутствии большого количества бактериальных клеток значительная часть пептида остается связанной с отрицательно заряженными сайтами на поверхности их наружной мембраны, а не проникает в клетки. С другой стороны, вероятно, для реализации бактерицидного действия этого пептида требуется более продолжительное время, так как можно предположить, что его основные мишени — внутриклеточные, как это описано в литературе для структурно сходного с мини-бактенецином пептида — N-концевого фрагмента бактенецина 7 быка, который связывается с 70S рибосомами бактерий и блокирует процесс белкового синтеза [13]. Молекулярный механизм повреждающего действия бактенецинов в отношении бактериальных мембран остается малоизученным — хотя работы, предлагающие различные модели действия мембраноактивных АМП, например, протегринов, многочисленны. Несмотря на быстрое антибактериальное действие и широкий его спектр, практическое применение пептидов, обладающих высокой мембранолитической активностью, ограничено из-за наличия у большинства из них цитотоксических эффектов в отношении клеток макроорганизма, что вынуждает искать пути повышения избирательности их действия в отношении бактерий с помощью создания различных структурных аналогов с оптимизированными свойствами [4].

Учитывая высокую антимикробную активность пептидов семейства бактенецинов в отношении антибиотикорезистентных штаммов и слабо выраженную по сравнению со многими АМП токсичность для клеток человека, можно заключить, что эти соединения являются одними из наиболее перспективных прототипов новых антибиотических препаратов для борьбы с грамотрицательными бактериями, устойчивыми к применяемым в клинике антибиотикам [5]. Открывающиеся возможности для разработки подобных препаратов, в частности, на основе структур исследуемых в работе бактенецинов лейкоцитов

домашней козы, определяют необходимость всестороннего исследования механизмов их действия. Использованные в данной работе подходы позволили проанализировать эффекты рассматриваемых антибиотических соединений на функциональную активность бактерий в режиме реального времени, что, несомненно, важно при изучении действия не только бактенецинов, но и других антимикробных молекул. Показано, что применение данных методик и сопоставление полученных результатов требует тщательного анализа условий эксперимента в каждом методе и учета физико-химических свойств исследуемых веществ.

Учитывая полученные нами ранее результаты, можно заключить, что при создании структурных модификаций бактенецинов на основе пептидов из лейкоцитов козы наибольшее внимание следует обратить на выяснение того, какие особенности молекул этих пептидов обуславливают наличие мембранолитических свойств и возможно ли повышение их эффективности при сохранении свойственной пролин-богатым пептидам низкой токсичности для клеток человека и высокой избирательности эффектов в отношении микробных клеток.

### Заключение

В результате проведенной работы получена новая информация об особенностях действия на бактериальные клетки, в том числе на антибиотикоустойчивые бактерии, пролин-богатых пептидов — аналогов природных защитных молекул, содержащихся в лейкоцитах домашней козы и рассматривающихся как прототипы новых антибиотиков. Эта информация вносит вклад в развитие фундаментальных представлений о механизмах действия пролин-богатых пептидов врожденного иммунитета и их роли в патогенезе инфекционных заболеваний, а также представляет интерес для биотехнологических исследований, направленных на разработку на базе этих соединений новых антибиотических препаратов для коррекции инфекционных заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями. На основании полученных данных будет проведено дальнейшее исследование молекулярных механизмов антимикробного действия бактенецинов, предприняты попытки создания их структурных модификаций с оптимальными для применения в медицине свойствами.

### Список литературы

1. S. Galdiero, A. Falanga, R. Berisio, P. Grieco, G. Morelli, M. Galdiero. Antimicrobial Peptides as an Opportunity Against Bacterial Diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 2015; 22: 1665-77.
2. A.L. Hilchie, K. Wuerth, R.E.W. Hancock. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nature Chemical Biology*. 2013; 9: 761-8.
3. Жаркова М.С., Орлов Д.С., Коряков В.Н., Шамова О.В. Антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения. *Вестник СПбГУ. Серия 3. Биология*. 2014; 1: 98-114.
4. Zharkova M.S., Orlov D.S., Kokryakov V.N., Shamova O.V. Antimicrobial peptides of mammals: classification, biological role, prospects of the practical use. *Vestnik SPbGU. Seriya 3. Biologia*. 2014; 1: 98-114. (in Russian)
5. C.D. Fjell, J. A. Hiss, R.E. W. Hancock, G. Schneider. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov*. 2011; 11(1): 37-51.

5. W. Li, J. Tailhades, N. M. O'Brien Simpson, F. Separovic, L. Otvos Jr., M. A. Hossain, J. D. Wade. Proline-rich antimicrobial peptides: potential therapeutics against antibiotic resistant bacteria. *Amino Acids*. 2014; 46(10): 2287-94.
6. Scocchi M., Tossi A., Gennaro R. Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011; 68(13): 2317-30.
7. Chernysh S., Kim S.I., Bekker G., Pleskach V.A., Filatova N.A., Anikin V.B., Platonov V.G., Bulet P. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99: 12628-32.
8. Ostorhazi E., Holub M.C., Rozgonyi F., Harnos F., Cassone M., Wade J.D., Otvos L. Jr. Broad-spectrum antimicrobial efficacy of peptide A3-APO in mouse models of multidrug-resistant wound and lung infections cannot be explained by in vitro activity against the pathogens involved. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2011; 3(5): 480-4.
9. Shamova O.V., Brogden K.A., Zhao C., Nguen T., Turner J., Kokryakov V.N., Lehrer R.I. Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infection and Immunity*. 1999; 67(8): 4106-11.
10. Shamova O., Orlov D., Stegemann C., Czihal P., Hoffmann R., Brogden K., Kolodkin N., Sakuta G., Tossi A., Sahl H.-G., Kokryakov V., Lehrer R.I. ChBac3.4: A novel proline-rich antimicrobial peptide from goat leukocytes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2009; 15(1): 31-5.
11. Шамова О.В., Орлов Д.С., Жаркова М.С., Баландин С.В., Ямщикова Е.В., Кнаппе Д., Хоффманн Р., Кокряков В.Н., Овчинникова Т.В. Минибактенецины ChBac7.5N-альфа и ChBac7.5N-бета — антимикробные пептиды из лейкоцитов козы *Capra hircus*. *Acta Naturae*. 2016; 8(3/30): 108-18.
- Shamova O.V., Orlov D.S., Zharkova M.S., Balandin S.V., Yamschikova E.V., Knappe D., Hoffmann R., Kokryakov V.N., Ovchinnikova T.V. Minibactenecins ChBac7.N $\alpha$  and ChBac7.N $\beta$  — antimicrobial peptides from leukocytes of the goat *Capra hircus*. *Acta Naturae*. 2016; 8(3/30):108-18. (in Russian)
12. Жаркова М.С., Копейкин П.М., Афиногенов Г.Е., Орлов Д.С., Артамонов А.Ю., Сафиуллина К.Э., Сухарева М.С., Цветкова Е.В., Мильман Б.Л., Афиногенова А.Г., Шамова О.В. Действие пролин-богатых пептидов врожденного иммунитета на антибиотикоустойчивые штаммы бактерий. *Медицинская иммунология*. 2017; 19(6), в печати.
- Zharkova M.S., Kopeykin P.M., Afinogenov G.E., Orlov D.S., Artamonov A.Yu., Safiullina K.E., Suhareva M.S., Tsvetkova E.V., Milman B.L., Afinogenova A.G., Shamova O.V. Effects of proline-rich peptides of the innate immunity on antibiotic-resistant bacterial strains. *Medical immunology (in Russian)*. 2017; 19(6), In Press.
13. Mardirossian M., Grzela R., Giglione C., Meinel T., Gennaro R., Mergaert P., Scocchi M. The host antimicrobial peptide Bac7 1-35 binds to bacterial ribosomal proteins and inhibits protein synthesis. *Chem. Biol.* 2014; 21(12): 1639-47.
14. Krizsan A., Volke D., Weinert S., Strater N., Knappe D., Hoffmann R. Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70S ribosome. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014; 53(45): 12236-9.
15. Zahn M., Kieslich B., Berthold N., Knappe D., Hoffmann R., Strater N. Structural identification of DnaK binding sites within bovine and sheep batenecin Bac7. *Protein Pept Lett.* 2014; 21(4): 407-12.
16. Podda E., Benincasa M., Pacor S., Micali F., Mattiuzzo M., Gennaro R., Scocchi M.. Dual mode of action of Bac7, a proline-rich antibacterial peptide. *Biochimica Biophysica Acta*. 2006; 1760: 1732-41700.
17. Shafer W., ed. *Antibacterial peptide protocols. in: Methods in Molecular Biology*, Vol. 78, 1997. Totowa, N.J.: Humana Press Inc.; 1997. 259 p.
18. R. Lehrer, A. Barton, T. Ganz. Concurrent assessment of inner and outer membrane permeabilization and bacteriolysis in *E. coli* by multiple-wavelength spectrophotometry. *J. Immunol. Methods*. 1988; 108: 5-8.
19. Артамонов А.Ю., Шамова О.В., Кокряков В.Н., Орлов Д.С. Фото- и флюориметрические методы оценки проницаемости мембран *E. coli* ML-35p. *Вестник СПбГУ. Сер. 3: Биология*. 2008; 2: 139-42.
- Artamonov A.Yu., Shamova O.V., Kokryakov V.N., Orlov D.S. Photo- and fluorometric methods of estimation of *E. coli* ML35p membrane permeabilization. *Vestnik SPbGU. Ser. Biologia*. 2008; 2: 139-42 (in Russian).
20. Kokryakov V.N., Harvig S.S.L., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.V., Shamova O.V., Korneva E.A., Lehrer R.I. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Letters*. 1993; 327(2): 231-6.
21. A. Mariscal, R.M. Lopez-Gigosos, M. Carnero-Varo, J. Fernandez-Crehuet Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 82(4): 773-83.
22. Benincasa M., Scocchi M., Podda E., Skerlavaj B., Dolzani L., Gennaro R. Antimicrobial activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates. *Peptides*. 2004; 25(12): 2055-61.

#### Сведения об авторах

Шамова Ольга Валерьевна, доктор биол. наук, доцент, зав. отделом общей патологии и патофизиологии

Жаркова Мария Сергеевна, канд. биол. наук, научн. сотр.

Копейкин Павел Максимович, аспирант, мл. научн. сотр.

Орлов Дмитрий Сергеевич, канд. мед. наук, доцент, зав. лаб. иммунопатофизиологии отдела общей патологии и патофизиологии

Корнева Елена Андреевна, доктор мед. наук, профессор, академик РАН, главн. научн. сотр.