

## ДЕЙСТВИЕ ПРОЛИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА НА АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ

Жаркова М.С.<sup>1</sup>, Копейкин П.М.<sup>1</sup>, Афиногенов Г.Е.<sup>2</sup>, Орлов Д.С.<sup>1,2</sup>,  
Артамонов А.Ю.<sup>1</sup>, Сафиуллина К.Э.<sup>1</sup>, Сухарева М.С.<sup>1</sup>,  
Цветкова Е.В.<sup>1,2</sup>, Мильман Б.Л.<sup>1</sup>, Афиногенова А.Г.<sup>2,3</sup>, Шамова О.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Резистентность патогенных микроорганизмов к применяемым в медицине антибиотикам в последние годы стремительно растет, повышается смертность от внутрибольничных инфекций. Поэтому поиск новых лекарственных средств для борьбы с антибиотикоустойчивыми бактериями является одной из первоочередных задач биомедицины. Есть все основания считать, что природные соединения, содержащиеся в защитных клетках человека и животных, могут послужить прототипами принципиально новых антибиотических препаратов. К таким соединениям относятся антимикробные пептиды врожденного иммунитета, в частности группа пролин-богатых пептидов. Целью данной работы явилось исследование антимикробной активности пролин-богатых пептидов семейства бактенецинов в отношении ряда клинических изолятов антибиотикоустойчивых грамотрицательных бактерий. Объектами исследования послужили бактенецины, обнаруженные ранее в лейкоцитах домашней козы *Capra hircus*: ChVac3.4, ChVac5, miniChVac7.5N $\alpha$ , miniChVac7.5N $\beta$ . Установлено, что химически синтезированные нами аналоги этих пептидов проявляют выраженную антимикробную активность в отношении *Escherichia coli* и *Acinetobacter baumannii* (минимальные ингибирующие концентрации (МИК), определенные методом серийных разведений в жидкой питательной среде, находились в пределах 1-4 мкМ) и в несколько меньшей степени в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae* (МИК – 2-16 мкМ) *in vitro*. Показано, что антибактериальная активность пептидов может повышаться при их совместном использовании с антибиотиками, применяемыми в медицине. Выявлен синергический эффект при действии бактенецина mini-ChVac7.5N $\alpha$  в комбинации с амикацином на *E. coli* (минимальный индекс фракционной ингибирующей концентрации (иФИК) – 0,375), *A. baumannii* (иФИК 0,5) и *K. pneumoniae* (иФИК – 0,325), а также с офлоксацином – на *K. pneumoniae* (иФИК – 0,5). Важной характеристикой исследуемых пептидов является отсутствие у этих соединений гемолитической активности в отношении эритроцитов человека при применении их в концентрациях, в несколько раз превышающих антимикробные. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего исследования рассматриваемых пролин-богатых пептидов и их структурных модификаций для разработки на основе этих соединений новых комбинированных

### Адрес для переписки:

Шамова Ольга Валерьевна  
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика  
Павлова, 12  
Тел.: 8 (911) 253-09-29.  
E-mail: oshamova@yandex.ru

### Address for correspondence:

Shamova Olga V.,  
Institute of Experimental Medicine  
197376, Russian Federation, St. Petersburg,  
Acad. Pavlov str., 12  
Phone: 7 (911) 253-09-29.  
E-mail: oshamova@yandex.ru

### Образец цитирования:

М.С. Жаркова, П.М. Копейкин, Г.Е. Афиногенов,  
Д.С. Орлов, А.Ю. Артамонов, К.Э. Сафиуллина,  
М.С. Сухарева, Е.В. Цветкова, Б.Л. Мильман,  
А.Г. Афиногенова, О.В. Шамова «Действие пролин-  
богатых пептидов врожденного иммунитета  
на антибиотикоустойчивые штаммы бактерий»  
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 107-114.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-107-114

© Жаркова М.С. и соавт., 2018

### For citation:

M.S. Zharkova, P.M. Kopeykin, G.E. Afinogenov, D.S. Orlov,  
A. Yu. Artamonov, K.E. Safiullina, M.S. Sukhareva,  
E.V. Tsvetkova, B.L. Milman, A.G. Afinogenova, O.V.  
Shamova "Effects of proline-rich peptides of the innate  
immune system on drug-resistant bacterial strains", *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,  
Vol. 20, no. 1, pp. 107-114.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-107-114

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-107-114

лекарственных средств для борьбы с антибиотикоустойчивыми микроорганизмами: различных препаратов местного применения, компонентов изделий медицинского назначения, в частности венозных катетеров, стентов, а также раневых покрытий.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, антибиотикорезистентные бактерии, пролин-богатые пептиды, бктенецины

## EFFECTS OF PROLINE-RICH PEPTIDES OF THE INNATE IMMUNE SYSTEM ON DRUG-RESISTANT BACTERIAL STRAINS

Zharkova M.S.<sup>a</sup>, Kopeykin P.M.<sup>a</sup>, Afinogenov G.E.<sup>b</sup>, Orlov D.S.<sup>a, b</sup>,  
Artamonov A.Yu.<sup>a</sup>, Safiullina K.E.<sup>a</sup>, Sukhareva M.S.<sup>a</sup>, Tsvetkova E.V.<sup>a, b</sup>,  
Milman B.L.<sup>a</sup>, Afinogenova A.G.<sup>b, c</sup>, Shamova O.V.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> St. Petersburg L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Resistance of pathogenic microorganisms to conventional antibiotics is growing rapidly in recent years, accompanying with an increase of mortality caused by hospital-acquired infections. Therefore, a search for novel drugs to combat antibiotic resistant bacteria is one of the priorities in biomedicine. Natural compounds which are contained in host defense effector cells of humans and animals, may serve as prototypes for developing principally new antibiotics. Such compounds include antimicrobial peptides of innate immunity, in particular, a group of proline-rich peptides. The aim of this work was to evaluate antimicrobial activity of proline-rich peptides, belonging to bctenecins family, against several clinical isolates of drug-resistant Gram-negative bacteria. The bctenecins under examination (ChBac3.4, ChBac5, mini-ChBac7.5N $\alpha$ , mini-ChBac7.5N $\beta$ ) have been previously found in leukocytes of a domestic goat *Capra hircus*. We have shown that chemically synthesized analogs of these peptides exhibited a pronounced *in vitro* antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii* (minimum inhibitory concentrations (MIC) as estimated by a broth microdilution assay varied between 1 to 4  $\mu$ M) and, to a lesser degree, against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* (MIC 2-16  $\mu$ M). It was revealed that antibacterial activity of these peptides may be increased if applied in combination with some conventional, antibiotics. E.g., synergistic antimicrobial effects against *E. coli* have been shown for mini-ChBac7.5N $\alpha$  bctenecin combined with amikacin (minimal fractional inhibitory concentration index (FICI), 0.375), *A. baumannii* (FICI, 0.5), and *K. pneumoniae* (FICI, 0.325), and, using ofloxacin, towards *K. pneumoniae* (FICI 0.5). Lack of hemolytic activity towards human red blood cells is an important benefit of the studied peptides when used at concentrations several times higher than those showing antimicrobial effects. The data obtained presume certain prospects for further investigations of proline-rich peptides, as well as their structural modifications, for the development of new combined drugs based on these compounds, in order to combat antibiotic-resistant microorganisms, e.g., medications for local applications, various components of medical devices, in particular, venous catheters, stents and wound dressings.

Keywords: innate immunity, drug-resistant bacteria, proline-rich peptides, bctenecins

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-02177.

Проблема устойчивости микроорганизмов к применяемым в медицине антибиотическим препаратам все более остро встает в последние годы. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) опубликован список «приоритетных патогенов» – 12 видов бактерий, устойчивых к действию антибиотиков и представляющих наибольшую угрозу для жизни и здоровья человека. Особое внимание в сообщении ВОЗ уделяется мульти-

резистентным грамотрицательным бактериям. К числу наиболее опасных представителей таких бактерий, отнесенных к 1 категории приоритетности, принадлежат *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и различные виды семейства Enterobacteriaceae (включая *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* и *Proteus*), устойчивые к карбопенемам и другим антибиотикам и вызывающие тяжелые, часто неизлечимые, госпитальные инфекции. Данный список приоритетных возбудителей был составлен ВОЗ, чтобы предоставить ориентиры первоочередных

разработок для научно-исследовательских организаций. Наша работа посвящена исследованиям в этом направлении, что и определяет ее актуальность. Среди возможных кандидатов на роль новых антибиотических препаратов – природные антимикробные пептиды (АМП) врожденного иммунитета. Эти пептиды содержатся в клетках организма, выполняющих защитную функцию, – в первую очередь, в фагоцитах, клетках барьерных эпителиев, а также, в меньших количествах, и во многих других типах клеток. Кроме прямого антимикробного действия многие АМП проявляют иммуномодулирующие эффекты, что тоже способствует ограничению микробной инвазии [1, 9]. Некоторые пептиды обладают и ранозаживляющим действием [2, 7]. АМП имеют разные структуры – в эту группу объединяются как пептиды, содержащие дисульфидные мостики и имеющие в составе молекулы  $\beta$ -слои, в том числе АМП с конформацией  $\beta$ -шпильки, так и линейные молекулы. К одной из обширных групп линейных пептидов относятся пролин-богатые АМП (ПБ-АМП). В составе молекулы ПБ-АМП присутствует большое количество остатков пролина (до 50%) и аргинина, что и определяет их физико-химические и биологические свойства. Подобные пептиды обнаружены у беспозвоночных, причем наиболее часто встречаются у насекомых [12], а также позвоночных – в основном выявлены в лейкоцитах животных отряда парнокопытных [13]. Известно, что многие ПБ-АМП проявляют высокую антимикробную активность в отношении грамотрицательных бактерий, в том числе и антибиотикоустойчивых, что позволяет рассматривать их в качестве прототипов новых лекарственных средств, эффективных в борьбе с патогенными микроорганизмами, резистентными к применяемым в клинике антибиотикам. В Санкт-Петербургском университете уже разработано несколько иммуномодулирующих и антимикробных препаратов на основе ПБ-АМП насекомых [3]. В Европе также создается антибактериальный препарат на базе одного из пептидов насекомых – АЗ-АРО [11]. Необходимость дальнейшего интенсивного изучения ПБ-АМП и разработки подобных препаратов в нашей стране не вызывает сомнений.

**Целью данной работы** явилось исследование антимикробной активности пролин-богатых пептидов семейства бактенецинов (ChBac3.4, ChBac5, miniChBac7.5N $\alpha$ , miniChBac7.5N $\beta$ ) в отношении антибиотикоустойчивых грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*). Перечисленные пептиды, относящиеся к ПБ-АМП млекопитающих, были выделены нами ранее из лейкоцитов домашней

козы *Capra hircus* и охарактеризованы [4, 14, 15]. Для сравнения использовали антимикробный пептид, имеющий другую структуру (конформацию бета-шпильки) – протегрин 1 (ПГ1) [8]. Учитывая, что, по данным ВОЗ, указанные выше грамотрицательные бактерии относятся к списку наиболее опасных патогенов, исследования, посвященные поиску новых антимикробных лекарственных средств, эффективных в борьбе с этими микроорганизмами, являются актуальными и перспективными.

## Материалы и методы

Антимикробные пептиды получены методом химического твердофазного синтеза с использованием Fmoc/tBu-стратегии на 2-хлортритил-хлоридной смоле. Нарастивание пептидной последовательности проводилось в автоматическом синтезаторе Symphony X (Protein Technologies Inc., США). Для временной защиты  $\alpha$ -аминогрупп аминокислот применялась Fmoc-защита. Активация проводилась *in situ* под действием HSTU/N-этилморфолин в среде диметилформамида. Аминокислотная последовательность отщеплялась с полимера с одновременным удалением всех защитных групп под действием трифторуксунной кислоты с добавками H<sub>2</sub>O/Tis (триизопропилсилан). Пептиды очищали с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на установке Gold System (Beckman, США) и высушивали. Чистота полученных пептидов была не менее 95%, что подтверждалось с помощью аналитического электрофореза, ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрического анализа (MALDI-ToF MS) на приборе Ultraflexxtreme фирмы Bruker (Германия).

### Бактерии

Использовали 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, колистин), *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.

Оценку антимикробной активности проводили методом серийных разведений в жидкой

питательной среде. Использовали стандартную методику, но с небольшими модификациями, разработанными с учетом специфики АМП [5]. В качестве жидкой питательной среды использовали бульон Мюллера–Хинтона (Oxoid, Германия). Двукратные серийные разведения исследуемых препаратов проводили в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,4 с 150 мМ NaCl (НФБ) и вносили в лунки стерильной микрокамеры Терасаки, куда затем добавляли суспензии микроорганизмов, находящихся в фазе логарифмического роста ( $1 \times 10^4$  КОЕ на лунку). Пробы инкубировали при 37 °С в течение 24 или 48 часов. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали наименьшую концентрацию вещества, при использовании которой отсутствовал видимый рост микроорганизмов в соответствующих лунках микрокамеры. Для каждого разведения образца или контрольных проб результаты исследований представлены как медианы, полученные по данным трех независимых экспериментов.

Характер совместного действия пептидов и антибиотиков (наличие аддитивных, синергических, антагонистических эффектов) исследовали с использованием метода «шахматной доски» (“checkerboard assay”) [5]. При изучении совместного действия веществ А и В двукратные разведения одного из исследуемых соединений (вещество А) производили в камере Терасаки по горизонтали, а другого (вещество В) – по вертикали. После инкубации проб с микроорганизмами в течение 24 или 48 часов определяли МИК каждого из исследуемых веществ и МИК для их комбинаций. Далее рассчитывали индексы фракционной ингибирующей концентрации (иФИК; FICI – fractional inhibitory concentration index) по формуле:

ФИК индекс = ФИК А + ФИК В =  $[A]/[МИК А] + [B]/[МИК В]$ ,

где [А] и [В] – МИК веществ А и В, соответственно, в их смеси (комбинации), при которых наблюдается ингибирование роста бактерии; [МИК А] и [МИК В] – МИК индивидуальных фракций веществ А и В соответственно. При иФИК  $\leq 0.5$  совместное действие соединений рассматривали как синергическое (препараты усиливают антимикробный эффект друг друга);  $0.5 < \text{иФИК} \leq 1$  – как аддитивное (антимикробный эффект препаратов аддитивно складывается);  $1 < \text{иФИК} \leq 2$  – как индифферентное или независимое (эффект одного вещества никак не зависит от присутствия другого); иФИК  $> 2$  – как антагонистическое (эффект веществ в комбинации снижается).

Для определения гемолитической активности пептидов использовали эритроциты человека. Кровь здорового донора собирали в пластиковые

гепаринизированные пробирки, центрифугировали в течение 10 мин при 250 g при 4 °С. Супернатант удаляли, к осадку добавляли 10 мл охлажденного забуференного физиологического раствора (ЗФР), рН 7,4 с 4 мМ ЭДТА, центрифугировали в течение 10 мин в тех же условиях. Надосадочную жидкость удаляли, процедуру отмывания эритроцитов ЗФР повторяли три раза. Из полученного осадка эритроцитов отбирали 280 мкл, доводили объем суспензии до 10 мл охлажденным ЗФР. Анализируемые пептиды по 3 мкл на пробу в ЗФР вносили в пластиковые пробирки объемом 0,5 мл, добавляли по 27 мкл суспензии эритроцитов и инкубировали 30 мин при периодическом перемешивании. Для получения положительного контроля (100% лизис эритроцитов) к 27 мкл раствора эритроцитов добавляли 3 мкл детергента (10% раствор Triton X-100 в ЗФР). Для получения негативного контроля (0% лизис эритроцитов) к 27 мкл раствора эритроцитов добавляли 3 мкл ЗФР. После инкубации реакцию останавливали добавлением 75 мкл охлажденного ЗФБ, пробы центрифугировали при 5000 g при 4 °С в течение 4 мин. Супернатант отбирали и проводили измерение оптической плотности проб при длине волны 540 нм на фотометре Multiscan (Labsystems, Финляндия). Процент гемолиза эритроцитов рассчитывали по формуле:

Гемолиз (%) =  $[\text{OD}_{540}(\text{образца}) - \text{OD}_{540}(0\% \text{ лизис})] / [\text{OD}_{540}(100\% \text{ лизис}) - \text{OD}_{540}(0\% \text{ лизис})] \times 100 \%$ .

Эксперименты повторяли три раза, для каждой из опытных или контрольных проб имелось по три повторности. Результаты представлены как средние величины и среднеквадратичные отклонения.

## Результаты и обсуждение

Исследована активность антимикробных пептидов (АМП) в отношении четырех видов грамотрицательных бактерий, относящихся к группам патогенов, приведенных в списке ВОЗ как одни из самых опасных для человечества видов, являющихся причиной внутрибольничных инфекций. Использованные в работе микроорганизмы проявляли резистентность к ряду применяемых в медицине антибиотиков. Данные, полученные методом серийных разведений в жидкой питательной среде, представлены в таблице 1.

Установлено, что антимикробные пептиды, относящиеся к классу пролин-богатых пептидов млекопитающих, а именно бактенецины лейкоцитов домашней козы, проявляют выраженную активность в отношении *E. coli* и *A. baumannii* и, хотя и в меньшей степени, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. Пептид протегрин 1, имеющий структуру бета-шпильки и, как показано ранее,

ТАБЛИЦА 1. МИНИМАЛЬНЫЕ ИНГИБИРУЮЩИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ (МИК) БАКТЕНЕЦИНОВ И ПРОТЕГРИНА 1, мкМ\*  
TABLE 1. MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATIONS (MIC) OF BACTENECINS AND PROTEGRIN 1, μM\*

Вещество Substance	МИК (мкМ) в отношении бактерий MIC (μM) towards bacteria				Гемолиз эритроцитов человека, % при обработке их пептидами в указанных концентрациях Hemolysis of human red blood cells (%) in the presence of the peptides at the indicated concentrations	
	<i>Escherichia coli</i> 521/17	<i>Acinetobacter baumannii</i> 7226/16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 522/17	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 344/17	10 мкМ 10 μM	60 мкМ 60 μM
ChBac3.4	2	1	4	2	0,6 ± 0,46	1,2 ± 0,74
ChBac5	1	2	16	4	0,7 ± 0,45	1,2 ± 0,56
miniChBac7.5Nα	2	2	8	16	0,2 ± 0,09	0,3 ± 0,21
miniChBac7.5Nβ	2	2	8	16	1,5 ± 0,09	0,3 ± 0,1
ПГ1 PG1	1	1	2	1	35,6 ± 5,4	83,4 ± 3,7
амикацин amikacin	2	8	1	0,25	—	—
офлоксацин ofloxacin	50	25	> 50	0,25	—	—

Примечание. \* – данные МИК представлены как медианы, полученные по результатам 3-5 независимых экспериментов (метод серийных разведений в жидкой питательной среде). Приводятся также МИК двух антибиотиков, определенные в тех же условиях. Результаты оценки гемолитической активности указаны как средние величины и среднеквадратичные отклонения.

Note. \*, all the MIC values are presented as medians derived from 3 to 5 independent experiments (broth microdilutions assays). MIC values for two antibiotics evaluated at similar conditions are also given. The data on hemolytic activity are shown as means ± standard deviations.

обладающий высокой мембранолитической активностью, проявлял значительное антибактериальное действие в отношении всех исследованных микроорганизмов. Однако его гемолитическая активность в отношении эритроцитов человека была существенно выше по сравнению с эффектами бактенецинов, которые не вызывали лизиса эритроцитов в концентрациях, значительно превышающих антимикробные (табл. 1), что свидетельствует о более высокой цитотоксичности этих соединений по отношению к прокариотическим клеткам по сравнению с клетками макроорганизма. В работах итальянских исследователей показано, что синтетические пептиды, являющиеся фрагментами бактенецина быка Bac7 (сходные по первичной структуре с мини-бактенецинами козы), тоже проявляют антимикробную активность в отношении антибиотикоустойчивых клинических изолятов [6]. Эффективность бактенецинов, вероятно, определяется тем, что эти пептиды имеют несколько молекулярных

мишеней в бактериальных клетках [10, 13]. Однако значения активности АМП могут показаться несколько более низкими по сравнению с активностью применяемых в медицине антибиотиков. Чтобы выяснить возможность повышения активности пептидов, нами исследовано их совместное действие с двумя антимикробными препаратами – амикацином и офлоксацином – для установления наличия или отсутствия синергидного эффекта. Данные анализа антибактериального действия одного из мини-бактенецинов – mini-ChBac7.5Nα с перечисленными антибиотиками в отношении исследуемых клинических изолятов представлены в таблице 2.

Показано, что для трех из четырех исследованных видов бактерий наблюдается синергическое антимикробное действие мини-бактенецина с амикацином (ФИК ≤ 0,5), причем оно установлено и в случае *A. baumannii*, проявляющего устойчивость к ряду аминогликозидов. В комби-

**ТАБЛИЦА 2. СОЧЕТАННОЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ МИНИ-БАКТЕНЕЦИНА miniChBac7.5N $\alpha$  С АНТИБИОТИКАМИ, ОЦЕНИВАЕМОЕ ПО ВЕЛИЧИНЕ ИНДЕКСА ФРАКЦИОННЫХ ИНГИБИРУЮЩИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ (ФИК), РАССЧИТАННОГО ДЛЯ ПРИВЕДЕННЫХ КОМБИНАЦИЙ**

TABLE 2. COMBINED ACTION OF MINI-BACTENECIN miniChBac7.5N $\alpha$  WITH ANTIBIOTICS, ESTIMATED USING FRACTIONAL INHIBITORY CONCENTRATION INDEXES (FICI), CALCULATED FOR EACH COMBINATION

Сочетание веществ Substances combined	Минимальный индекс ФИК Minimal FICI			
	<i>E. coli</i> 521/17	<i>A. baumannii</i> 7226/16	<i>P. aeruginosa</i> 522/17	<i>K. pneumoniae</i> 344/17
miniChBac7.5N $\alpha$ и амикацин miniChBac7.5N $\alpha$ and Amikacin	0,375	0,5	0,62	0,325
miniChBac7.5N $\alpha$ и офлоксацин miniChBac7.5N $\alpha$ and Ofloxacin	1,12	0,62	–	0,5

нации с офлоксацином выявлен синергический эффект в отношении *K. pneumoniae*.

## Заключение

Установлено, что пролин-богатые пептиды – синтетические аналоги бактенецинов лейкоцитов домашней козы – проявляют антимикробное действие в отношении исследованных антибиотикоустойчивых грамотрицательных бактерий, причем в ряде случаев наблюдали синергические антибактериальные эффекты при использовании пептидов с амикацином и офлоксацином. Изучаемые пептиды – бактенецины – не обладают гемолитическим действием в отношении эритроцитов человека. Полученные данные сви-

детельствуют о перспективности дальнейшего исследования рассматриваемых пролин-богатых пептидов и их структурных модификаций для разработки на их основе новых лекарственных препаратов для борьбы с микроорганизмами, представляющими серьезную опасность для пациентов. Использование пептидных препаратов в комбинации с применяемыми в клинике антибиотиками позволит повысить эффективность антимикробной терапии при местном применении, а также при создании изделий медицинского назначения, например, устройств, входящих в состав аппаратов для искусственной вентиляции легких, венозных катетеров и раневых покрытий.

## Список литературы / References

1. Жаркова М.С., Орлов Д.С., Коряков В.Н., Шамова О.В. Антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения // Вестник СПбГУ. Сер. 3, 2014. Вып. 1. С. 98-114. [Zharkova M.S., Orlov D.S., Kokryakov V.N., Shamova O.V. Mammalian antimicrobial peptides: classification, biological role, perspectives of practical use. *Vestnik SPbGU. = Bulletin of St. Petersburg State University. Biology*, 2014, Iss. 1, pp. 98-114. (In Russ.)]
2. Кудряшов Б.А., Ляпина Л.А., Мазинг Ю.А., Кокряков В.Н., Кондашевская М.В., Шамова О.В. Действие дефенсина на процесс заживления асептической кожной раны и на проницаемость кровеносных сосудов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1990. Т. 59, № 4. С. 391-393. [Kudriashov B.A., Kondashevskaya M.V., Liapina L.A., Kokriakov V.N., Mazing Yu.A., Shamova O.V. Effect of defensin on the process of healing of aseptic skin wound and on the permeability of blood vessels. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1990, Vol. 59, Iss. 4, pp. 391-393. (In Russ.)]
3. Черныш С.И., Гордя Н.А. Антимикробное вещество // Патент РФ 2447896. Заявка: 2010146289/15, 15.11.2010. Опубликовано: 20.04.2012. Бюл. № 11. 27 с. [Chernysh S.I., Gordya N.A. Antimicrobial substance. Patent of the Russian Federation 2447896. Application: 2010146289/15, 15.11.2010]. Published: 20.04.2012. Bulletin No. 11. 27 p.
4. 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. Т. 8, № 3 (30). С. 108-118. [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 ChBac7.5N $\alpha$  and ChBac7.5N $\beta$  – antimicrobial peptides from leukocytes of the goat *Capra hircus*. *Acta Naturae*, 2016, Vol. 8, no. 3 (30), pp. 136-146.
5. Antibacterial peptide protocols. in: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 78, 1997. Ed. Shafer W., Totowa, N.J.: Humana Press Inc., 1997. 259 p.
6. Benincasa M., Scocchi M., Podda E., Skerlavaj B., Dolzani L., Gennaro R. Antimicrobial activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates. *Peptides*, 2004, Vol. 25, Iss. 12, pp. 2055-2061.

7. Chan Y., Gallo R. PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130(Cas). *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, pp. 28978-28985.
8. 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, Vol. 327, Iss. 2, pp. 231-236.
9. Mansour S.C., Pena O.M., Hancock R.E. Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol.*, 2014, Vol. 35, Iss. 9, pp. 443-450.
10. 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, Vol. 21, Iss. 12, pp. 1639-1647.
11. 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, Vol. 3, Iss. 5, pp. 480-484.
12. Otvos L. Jr. Antibacterial peptides isolated from insects. *J. Pept. Sci.*, 2000, Vol. 6, Iss. 10, pp. 497-511.
13. Scocchi M., Tossi A., Gennaro R. Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, Iss.13, pp. 2317-2330.
14. 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, Vol. 67, no. 8, pp. 4106-4111.
15. 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, Vol. 15, Iss. 1, pp. 31-35.

---

**Авторы:**

**Жаркова М.С.** — к.б.н., научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Копейкин П.М.** — аспирант, младший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Афиногенов Г.Е.** — д.м.н., профессор, профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Орлов Д.С.** — к.м.н., доцент, заведующий лабораторией ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Authors:**

**Zharkova M.S.**, PhD (Biology), Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Kopeykin P.M.**, Postgraduate student, Junior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Afinogenov G.E.**, PhD, Dr. of Sci. (Medicine), MD, Professor, Dentistry Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Orlov D.S.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Head of Laboratory, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Артамонов А.Ю.** — к.б.н., научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Artamonov A.Yu.**, PhD (Biology), Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Сафиуллина К.Э.** — студент-бакалавр, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, выполняющий работу в ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Safiullina K.E.**, Bachelor student at the Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Сухарева М.С.** — студент-бакалавр, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, выполняющий работу в ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Sukhareva M.S.**, Bachelor student at the Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Цветкова Е.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Tsvetkova E.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Мильман Б.Л.** — д.х.н., заведующий лабораторией ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Milman B.L.**, PhD, Dr. of Sci. (Chemistry), Professor, Head of Laboratory, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Афиногенова А.Г.** — д.б.н., руководитель испытательного лабораторного центра ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Afinogenova A.G.**, PhD, Dr. of Sci. (Biology), Head, Testing Laboratory Centre, St. Petersburg L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Professor, Dentistry Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Шамова О.В.** — д.б.н., доцент, заведующий отделом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; профессор кафедры биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Shamova O.V.**, PhD, Dr. of Sci. (Biology), Associate Professor, Head of Department, Institute of Experimental Medicine; Professor, Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 01.07.2017

Отправлена на доработку 13.07.2017

Принята к печати 18.07.2017

Received 01.07.2017

Revision received 13.07.2017

Accepted 18.07.2017