

На правах рукописи



Ремизов Евгений Кириллович

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
НАСЕКОМЫХ, И ПЕРСПЕКТИВА ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ
ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова».

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Ларионова Ольга Сергеевна

Официальные оппоненты:

Сухинин Александр Александрович,
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет
ветеринарной медицины», заведующий
кафедрой микробиологии, вирусологии
и иммунологии

Карташова Ольга Львовна,
доктор биологических наук, доцент,
Институт клеточного и
внутриклеточного симбиоза УрО РАН –
обособленное структурное
подразделение Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Оренбургского
федерального исследовательского
центра Уральского отделения
Российской академии наук, ведущий
научный сотрудник лаборатории
персистенции и симбиоза
микроорганизмов

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Московская
государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологии – МВА
имени К.И. Скрябина»

Защита состоится « ____ » _____ 2024 года в ____ 00 часов на заседании
диссертационного совета 35.2.035.01 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский
государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И.
Вавилова» по адресу: 410005, Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Вавиловский
университет и на сайте www.vavilovsar.ru

Отзывы направлять по адресу: 410012, г. Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина, зд. 4,
стр.3, ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор

Карпунина Лидия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В современных условиях интенсификации сельского хозяйства промышленное разведение животных предполагает использование антибактериальных препаратов, направленных на профилактику и лечение инфекционных болезней сельскохозяйственных животных (ИБ СХЖ). Среди всех инфекционных болезней животных (ИБЖ) зоонозы занимают значительную долю, которая увеличивается с каждым годом. Наиболее частыми причинами зоонозных инфекций в мире, наносящих серьезный экономический ущерб, являются *Salmonella spp.* и *Escherichia coli spp.*. Наряду с этим следует отметить возрастающее влияние таких микроорганизмов, как *Staphylococcus aureus spp.* и *Bacillus cereus spp.* в инфицировании продуктов питания и заболевании сельскохозяйственных животных. При лечении животных неконтролируемое использование антибиотиков приводит к селекции антибиотикорезистентных штаммов, что в свою очередь затрудняет лечение заболеваний, вызываемых такими возбудителями. Помимо этого, необходимость разработки новых, безопасных, эффективных и натуральных противомикробных средств обусловлена необходимостью снижения процента синтетических химических веществ, используемых в качестве пищевых консервантов (Carmona-Ribeiro, A. M. et al., 2014).

Среди них антимикробные пептиды (АМП) являются важной противомикробной альтернативой (Brogden, N. K. et al., 2011; Сычева, М.В., 2016). Пептиды насекомых обладают барьерной функцией и способны защищать макроорганизм от различных патогенных агентов. В процессе эволюции насекомые сформировали огромный потенциал с большим арсеналом пептидов, как результат они являются наиболее перспективным источником для поиска новых агентов, обладающих широким спектром фармакологического действия (Antimicrobial Peptides in 2014..., 2015). Антимикробные пептиды способны оказывать негативное воздействие на бактерии, микроскопические грибы, а также, согласно последним исследованиям, обладают противоопухолевой активностью. Кроме этого, АМП способны вызывать эффективный киллинг вирусов, обладают потенциально низкой возможностью селекции антибиотикорезистентных штаммов, оказывают сопутствующий спектр противовоспалительных свойств (Diamond, G. et al., 2009).

В этой связи выделение антимикробных пептидов и изучение их

антибактериальной активности позволит выявить потенциальную возможность их использования в качестве противомикробных препаратов, но и создаст предпосылки к разработке антибактериальных препаратов нового поколения на их основе.

В настоящее время имеются сведения об антимикробных пептидах, свойствах, спектре и механизме их действия, однако комплексных исследований касаясь антимикробной активности пептидов в отношении нескольких патогенов, в том числе зоонозов не достаточно. Кроме этого, выбор объекта для получения искомым антимикробных агентов не был случайным, поскольку насекомые являются крупнейшим классом беспозвоночных на планете Земля и обладают широким спектром защитных барьеров. Таким образом, требуется сравнение спектров действия антимикробных пептидов разных видов, принадлежащих к разным таксонам, а также изучение специфичности их действия в отношении спектра микробов. Научно-исследовательская работа по выделению наиболее перспективных АМП позволит решить проблемы нарушения микробиоценозов живых организмов, будет способствовать терапии заболеваний, в том числе антибиотикорезистентными штаммами.

Таким образом, изучение антимикробной активности пептидов, выделенных из различных насекомых, зависимости их биологической активности от фазы развития насекомого и его вида, а также разработка экспериментальной технологии их индивидуального получения позволит пополнить сведения о АМП, которые станут основой для экспериментальной разработки антимикробных препаратов нового поколения.

Степень разработанности темы исследования

Имеющиеся в открытой печати литературные сведения подтверждают целесообразность использования насекомых для получения антимикробных пептидов, в частности имеются данные о влиянии некоторых АМП животного происхождения на ряд патогенных микроорганизмов (Сычева, М.В. и др., 2019).

В частности, подобными исследованиями занимались ранее, в отдельных работах изучалось влияние АМП на *S. typhimurium*, их воздействие на организм животных; влияние АМП, получаемых из кишечника животных на некоторые бактерии. В литературных источниках также имеются доказательства того, что использование насекомых в целях извлечения из них АМП, является приоритетным

вектором в работах по поиску противомикробных препаратов (Davis, R., 2009; Antimicrobial activity of human..., 2010; Ashby, M., 2014). Вместе с тем, более поздними исследованиями ученых детально изучался механизм действия антимикробных пептидов в целом, а также перспективы использования АМП в медицинских целях (Identification and characterization of a novel antimicrobial protein..., 2017; Tonk, M., 2017; Technological Potential of..., 2020). В этой связи выбор темы работы был обусловлен актуальностью данных исследований и недостаточностью сведений по получению антимикробных пептидов из насекомых *Galleria mellonella*, *Musca domestica*, *Hermetia illucens*, а также изучение их антимикробного действия на микроорганизмы, являющиеся, в том числе возбудителями зоонозов.

Цель работы – выделение пептидов из биомассы личинок *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* и изучение их антимикробной активности по отношению к референтным штаммам микроорганизмов.

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработка методики получения антимикробных пептидов и изучение их физико-химических свойств.
2. Изучение антимикробной активности пептидов, выделенных из *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* по отношению к референтным штаммам *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027.
3. Изучение острой токсичности антимикробных пептидов.
4. Исследование локализации антимикробных пептидов в организме лабораторных животных.

Научная новизна. Разработана оригинальная методика получения водорастворимых пептидов из биомассы личинок. Установлено, что для получения фармацевтической композиции на основе антимикробных пептидов необходимо соблюдение трех основных стадий: высаливания, хроматографического разделения и создания конечной фармацевтической композиции. Доказана антимикробная активность пептидов, выделенных из *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* по отношению к штаммам *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027, в том числе к мультирезистентным. Выявлены пептиды 3 и 6, выделенные из *G. mellonella*, обладающие наиболее высокой антимикробной активностью. Пептид 3 ингибировал рост *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) в

концентрации 0,18 мг/л; пептид № 6 проявлял антимикробную активность в концентрации 0,111 мг/л по отношению к *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. Пептид 4.2, выделенный из биомассы личинок *G. mellonella*, обладал высокой антимикробной активностью по отношению к штаммам *B. cereus* ATCC 10702, *S. typhimurium* 1626.

Установлено, что АМП, меченые флюоресцеин изотиоционатом (ФИТЦ), спустя сутки после внутримышечного и внутрибрюшинного введения белым нелинейным мышам, локализуются, главным образом, в печени и селезенке.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретически обоснован и разработан алгоритм получения экспериментальных серий антимикробных пептидов. Установлено, антимикробное действие полученных антимикробных композиций на вышеуказанные штаммы, в том числе мультирезистентные штаммы *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027, что дополняет имеющиеся сведения о биологических свойствах возбудителей инфекций, вызываемых этими штаммами. Представленные нами данные по локализации антимикробных пептидов в организме лабораторных мышей при различных способах введения представляют теоретическую значимость для дальнейших исследований. По материалам диссертационной работы получен патент на изобретение: Композиция антимикробных пептидов, полученных из личинок *M. domestica*, и способ ее получения (№ 2018142602 от 04.12.2018). Результаты исследований используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторных занятий с обучающимися факультета ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

Методология и методы исследований. Методология данного диссертационного исследования заключалась в поиске способов получения пептидов из личинок некоторых насекомых, подборе способов для максимально эффективной их экстракции из биомассы личинок, исследования каждой полученной фракции белка на наличие антимикробной активности. Для достижения цели диссертационной работы, обоснования ее теоретической и практической значимости нами был использован комплекс сертифицированных методов, включающих физико-химические, микробиологические, морфологические, статистические.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оригинальная методика является оптимальной для получения фракций водорастворимых пептидов с молекулярной массой в диапазоне 3,4-6 кДа.
2. Экспериментальные серии антимикробных пептидов (n=15) обладают антимикробной активностью по отношению к референтным штаммам *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027.
3. Экспериментальные серии АМП в виде 10% растворов относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные).
4. После внутримышечного и внутривентриального введения АМП, меченых ФИТЦ, белым нелинейным мышам их накопление происходит через сутки в печени и селезенке. При внутримышечном введении интенсивное свечение зарегистрировано в костном мозге.

Работа выполнена на кафедре микробиологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии Н.И. Вавилова».

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов подтверждена значительным объемом экспериментальных данных с подтверждением их методами математической статистики.

Материалы диссертации были представлены на: Международном конкурсе инноваций «Молодой Учёный Alltech (2018)», где работа стала региональным победителем (Европа-Азия); Международной конференции BIT's 9th Anniversary World DNA Day – 2018 (Китай, Далянь, 2018); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России на II этапе (Киров, 2018); Национальной научно-практической конференции в ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им Н. И. Вавилова (Саратов, 2018); Конкурсе научно-инновационных работ молодых ученых и студентов ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им Н. И. Вавилова, Грант Ректора (Саратов, 2018); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России на III этапе (Оренбург, 2018); XXIII Агропромышленном форуме юга России и выставке «Интерагромаш» «Состояние и перспективы развития агропромышленного

комплекса», посвященной 90-летию ФГБОУ ВО Донской государственной технической университет (Ростов-на-Дону, 2020).

Публикации. Основные результаты отражены в 9 публикациях, из них 3 статьи из перечня рецензионных научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и 1 патент.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Автору данной работы принадлежат подготовка, организация и осуществление, физико-химических, микробиологических, морфологических исследований, непосредственное участие в обсуждении полученных результатов и их формулировке, написании выводов, подготовке публикаций и патента.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованных литературных источников, содержащего 201 наименование, в том числе 177 иностранных научных работ. Работа представлена на 115 страницах, иллюстрирована 19 таблицами и 26 рисунками.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты, материалы и методы исследований

Антимикробные пептиды получали из следующих биологических объектов: *Galleria mellonella*, *Musca domestica*, *Hermetia illucens*. *Galleria mellonella* – большая восковая моль, огневка пчелиная, вредитель медоносных пчел из семейства огневки настоящей, отряда чешуекрылые. *Musca domestica* – муха домашняя, принадлежит к отряду двукрылых, из всех видов семейства *Muscidae* они наиболее многочисленны. *Hermetia illucens* – чёрная львинка (отряд двукрылые).

Для проведения исследований были использованы следующие микроорганизмы: *S. aureus* ATCC 6538 (209-P); *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027 из музея кафедры микробиологии и биотехнологии ФГБОУ ВО Вавиловский университет: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P), *Salmonella typhimurium* 1626, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов; *B. cereus* ATCC 10702, любезно предоставленный ФГБУ "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский

институт»; *E. coli* 1027, полученный из Городской санитарно-эпидемиологической станции г. Саратова. Выбор данных микроорганизмов был обусловлен, тем, что эти биологические агенты являются наиболее частыми причинами пищевых инфекций, в том числе зоонозов.

Для получения искомых пептидов использовали биомассу личинок *G. mellonella* после 24 суток культивирования (до окукливания) и 40 суток (на стадии окукливания); *H. illucens* - 15 суток культивирования; *M. domestica* - 5 суток культивирования.

Выделение водорастворимых пептидов из биомассы личинок *G. mellonella*, *M. domestica* и *H. illucens* проводили отдельно для каждого вида насекомых методом холодной экстракции, взяв за основу метод, модифицированный под объекты настоящего исследования для выделения пептидов, обладающих определенными свойствами, в том числе растворимостью в воде, что является необходимым условием для дальнейшего применения в качестве антибактериального средства (Швайцер М. и др., 2009). Методика включала следующие этапы, которые также проводили отдельно для биомассы каждого вида насекомых: гомогенизация биомассы личинок, экстракция, центрифугирование, высаливание водорастворимых пептидов сульфатом аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, повторное растворение; высаливание водорастворимых пептидов сульфатом аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Полученные образцы хранили при температуре - 20 °С для последующих манипуляций. Затем образцы были проанализированы и разделены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с подбором оптимальных растворителей и условий для проведения хроматографирования. Предварительно, до хроматографического разделения в образцы добавляли небольшое количество раствора фосфатно-солевого буфера (ФСБ) для растворения осадка, и только потом раствор вводили в инжектор хроматографа (Стайер Аквилон, Россия). Колонкой для проведения ВЭЖХ была выбрана следующая модель: BioSep S2000 300x2120 мм (Phenomenex, USA). Разделение проводилось при длине волны 280 нм, при объеме петли 1575 мкл, элюентом служил 0,1 М ФСБ. Анализ осуществляли в следующих условиях: температура колонки 25 °С, объем вводимой пробы - 20 мкл, скорость потока - 1,0 мл/мин, время анализа 60 мин. Содержание белка в анализируемых образцах водорастворимых пептидов определяли по методу Лоури с применением реактива Фолина (Protein measurement

with..., 1951). Концентрацию белка анализируемых фракций определяли на спектрофотометрическом оборудовании UV-1280 фирмы «Shimadzu» (Япония) при длине волны 450 нм. Молекулярную массу выделенных пептидов определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-Na) с использованием камеры Helicon (Россия) и блока питания PowerPac Basic (BIO-RAD, США) в соответствии с рекомендациями с незначительными модификациями (Schagger, H. et al., 1987). Определение протеиногенных аминокислот в белковых фракциях проводили с помощью системы «КАПЕЛЬ® 105М» согласно методике (Майорова, Н.А., 2009).

Антибактериальную активность выделенных пептидов определяли согласно методике МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания» (МУК 4.2.1890-04, 2004). Кроме этого, использовали методику «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар» (ОФС.1.2.4.0010.15 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар»).

Изучение общетоксического действия АМП на биомоделях (белых мышах) проводили в соответствии с «Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» (Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, М., 2005).

Изучение локализации пептидов в тканях и органах белых мышей проводили на базе центра коллективного пользования «Симбиоз» с применением научного оборудования в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения ФГБУН ФИЦ «Саратовский научный центр Российской академии наук», (г. Саратов). Для этого АМП конъюгировали с ФИТЦ по методике (Иммунологические методы. Под ред. Фримеля Г., 1987). Через 24 ч после начала эксперимента проводили эвтаназию животных обеих групп согласно Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes, 1986). Мазки-отпечатки готовили постмортально из образцов почки, печени, селезенки, костного мозга и крови каждого животного. Микроскопирование мазков-отпечатков проводили на флуоресцентном

микроскопе «Leica DMi 3000B» (Германия). Анализ и поиск поля зрения изображения достигался при помощи видеокамеры Leica DFC420C (Германия), а также программного обеспечения Leica Application Suite (<https://www.leica-microsystems.com/products/microscope-software/p/leica-application-suite/>, Германия).

Статистический анализ полученных результатов проводили с вычислением средней арифметической абсолютных и относительных величин (M), средней ошибки средней арифметической (m), коэффициента достоверности различия средних (t) общепринятыми методами (Ашмарин И.П. и др., 1962). Уровень значимости (P) для различия между средними значениями вычисляли при помощи критерия t_p Стьюдента – Фишера. Для построения графиков, диаграмм и выполнения сканограмм использованы программы «Excel» и «Photoshop», реализованные на персональном компьютере с процессором «Intel Core i5-7400». Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение белковых фракций из личинок *G. mellonella*, *M. domestica*,

H. illucens и изучение их физико-химических свойств

На первом этапе исследования нами была разработана методика получения водорастворимых пептидов из биомассы личинок *G. mellonella*, *M. domestica* и *H. illucens*. Использование для этой цели метода однократного высаливания приводило к повышенным потерям из-за флотации белков и, как следствие, трудности отделения белков от маточного раствора, поэтому была разработана технология дробного высаливания с последовательным нарастающим насыщением раствора, содержащего водорастворимые пептиды, 20-40-60-80-100% сульфатом аммония. Это позволило существенно повысить выход белковых фракций, в результате чего нами суммарно было получено 70 фракций водорастворимых пептидов из биомассы личинок *G. mellonella* (n=50), *M. domestica* (n=5) и *H. illucens* (n=15).

Для дальнейшей оптимизации получения максимального количества белковой концентрации, проводили разделение белковых фракций методом ВЭЖХ. После разделения пептидов, полученных из биомассы личинок *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* проводили диализ на протяжении 24 часов против 0,9% раствора хлорида натрия. Методом электрофореза в денатурирующих условиях по методу (Laemmli,

У.К., 1970) было установлено, что м.м. выделенных пептидов находилась в диапазоне 3,4-6 кДа.

Таким образом, нами приготовлены экспериментальные серии пептидов (n = 47) из биомассы личинок трех видов насекомых: *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens*. В таблице 1 представлены данные полученные при исследовании методом высокоэффективной жидкостной хроматографии пептидов, которые показали антимикробную активность по отношению к штаммам возбудителям пищевых инфекций. При этом максимальное содержание белка отмечали в пробах, полученных из биомассы личинок *G. mellonella* в белковых фракциях 6.1, 3.4, 4.2 – 390,0; 284,58; 284,06 мг.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика пептидов, полученных из биомассы личинок насекомых, методом ВЭЖХ

№ п/п	tR - время удерживания, мин	Площадь пика, mAU*сек	Хроматографический выход, %	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общее содержание белка в пробе, мг
<i>G. mellonella</i>						
1.2	13,19	6643,15	31,84	3	0,83±0,05	2,49
3 д/о	37,72	1644,01	43,21	9	11,26±0,21	101,34
6 д/о	46,07	367,15	9,65	3	41,27±0,79	123,81
3 с/о	37,63	2669,49	38,33	13	7,83±0,21	101,79
6 с/о	46,00	472,71	6,79	4,5	27,64±0,11	124,38
2.3	22,35	524,57	16,12	4	16,12±0,11	64,48
2.6	43,46	74,91	2,30	2	4,61±0,08	9,22
3.2	13,58	139,46	6,81	4	10,22±0,11	40,88
3.4	25,06	971,21	47,43	3	94,86±0,21	284,58
3.6	59,00	0,28	0,01	2	0,04±0,03	0,08
4.2	12,48	11332,36	71,02	14	20,29±1,11	284,06
6.1	12,82	20897,49	100	15	26,00±1,11	390,0
<i>H. illucens</i>						
4	39,84	1373,62	19,73	3	17,28±0,68	51,84
7	51,06	457,75	6,57	4,5	4,61±0,14	20,745
<i>M. domestica</i>						
1.2	20,20	3574,26	22,43	4	33,65±0,65	134,6

Определение антимикробной активности белковых фракций макрометодом

Антимикробная активность полученных белковых фракций, выделенных из биомассы личинок *G. mellonella* была изучена по отношению к возбудителям ИБ

СХЖ с подтвержденной резистентностью/чувствительностью к АБ, а именно *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. По результатам исследований было выявлено наличие антимикробной активности у двух фракций - № 3 (в концентрации 0,18 мг/л) по отношению к *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) и № 6 (в концентрации 0,111 мг/л) по отношению ко всем оставшимся тестовым микроорганизмам. Аналогичные данные были получены при исследовании антимикробной активности белковых фракций из биомассы личинок *G. mellonella* на стадии окукливания. Поскольку принципиальных отличий в антимикробной активности пептидов в зависимости от стадии развития личинок не было обнаружено, в дальнейших исследованиях этот факт не учитывали. Все дальнейшие исследования антимикробной активности проводили на стадии развития до окукливания.

Далее этим же методом были проанализированы пептиды, выделенные из биомассы личинок *G. mellonella* № 2.1-2.7 и 3.1-3.6 до окукливания с использованием панели тех же тестовых патогенов. Нами было установлено, что пептид № 2.6 ингибирует рост всех тестовых патогенов, а пептид № 2.3 только пролиферацию штамма *S. aureus* ATCC 6538 (209-P). У пептидов № 2.1; 2.2; 2.4; 2.5 и 2.7 антимикробную активность выявить не удалось. В результате изучения антимикробной активности пептидов 3.1-3.6 было установлено, что антимикробной активностью в отношении штамма *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) обладают пептиды № 3.4 и 3.6. Пептид № 3.6 также ингибировал рост штаммов *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, а пептид № 3.2 только трёх последних тестовых микроорганизмов.

Антимикробную активность белковых фракций № 1-6, выделенных из биомассы личинок *M. domestica*, определяли аналогичным методом. Было установлено, что только белковая фракция № 2 обладала антимикробной активностью по отношению ко всем изучаемым пищевым патогенам.

При исследовании антимикробной активности белковых фракций № 1-7, выделенных из биомассы личинок *H. illucens*, оказалось, что белковая фракция № 4 обладала таковой по отношению к *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *E. coli* 1027. Белковая фракция № 7 демонстрировала бактерицидное действие по отношению ко всем патогенам, кроме *E. coli* 1027.

Таким образом, на данном этапе исследований нам удалось выявить

антимикробную активность у 9 пептидов, изолированных из биомассы личинок *G. mellonella*, одного пептида *M. domestica* и двух пептидов *H. illucens*, что позволило отнести данные молекулы к группе антимикробных пептидов.

Определение антимикробной активности диффузным методом

На этом этапе исследований для определения антимикробной активности использовали метод диффузии препарата в агар. Антимикробную активность определяли с применением плотных питательных сред, на которых культивировали те же штаммы тестовых патогенных микроорганизмов: *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) и *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. В этом эксперименте изучали свойства пептида № 1.2, изолированного из биомассы личинок *G. mellonella*, в 6 разных концентрациях – от 0,31 мг/л до 10,0 мг/л. Нами установлено, что указанный пептид 1.2 оказался способен ингибировать пролиферацию всех патогенов. При этом указанный пептид полностью подавлял рост бактерий штамма *S. typhimurium* 1626 независимо от использованных концентраций, а применение 0,31 мг/л было достаточно для угнетения роста тестовых микроорганизмов. Максимальная задержка роста штамма *B. cereus* ATCC 10702 наблюдалась в случае использования 2,5 мг/л пептида, для штамма *E. coli* 1027 при концентрации 0,625 мг/л.

Таким образом, у пептида 1.2 обнаружена выраженная антимикробная активность по отношению ко всем тестовым патогенным бактериям – независимо от использованных концентраций для штамма *S. typhimurium* 1626 и, при определенных концентрациях, для штаммов *S. aureus* ATCC 6538(209-P), *B. cereus* ATCC 10702 и *E. coli* 1027.

Определение антимикробной активности микрометодом

Для определения антимикробной активности микрометодом были использованы пептиды 4.1, 4.2 и 6.1, выделенные из биомассы личинок восковой моли *G. mellonella*. Судя по полученным данным, пептид № 4.1 не обладал антимикробной активностью ни в одной из использованных концентраций. Два других пептида, № 4.2 и 6.1 – обладали указанным свойством. Оба пептида подавляли рост тестовых микроорганизмов, за исключением штамма *S. aureus* ATCC 6538 (209-P). В ряде случаев при использовании данных пептидов наблюдался дозозависимый эффект. Так, для пептида 6.1 концентрация 10 мг/л была эффективной по отношению к *S. typhimurium* 1626, а пептид 4.2 вызывал бактерицидное действие по отношению к

E. coli 1027 в этой же концентрации. Пептид № 6.1 также оказался высокоэффективен при ингибировании роста штамма *B. cereus* ATCC 10702 в концентрации 0,625 мг/л.

Анализируя полученные результаты можно заключить, что этот пептид 4.2 обладает высокой противомикробной активностью по отношению к штаммам *B. cereus* ATCC 10702, *S. typhimurium* 1626 в минимальной использованной концентрации 0.625 мг/л, и относительно низкой по отношению к *E. coli* 1027, поскольку оказался способен вызывать гибель данного патогена только в концентрации 10 мг/л.

Характеристика выделенных антимикробных пептидов

В таблице 2 представлена информация о количестве пептидов, выделенных из *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* и их антимикробной активности. Была доказана антимикробная активность 12 пептидов, полученных из биомассы *G. mellonella*, одного - *M. domestica* и двух - *H. illucens*. Следует отметить, что экспериментальные серии АМП, выделенные из биомассы личинок *G. mellonella* 6 д/о, 6 с/о, 2.6, 1.2; а также АМП 2 д/о, выделенный из личинок *M. domestica*, обладали антимикробной активностью по отношению ко всем изученным штаммам.

Таблица 2 – Антимикробная активность белковых фракций

Источник (вид насекомого)	Кол-во выделенных АМП	АМП №	Антимикробная активность к тестовым штаммам			
			<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>E. coli</i> 1027
<i>G. mellonella</i> (д/о)		3	+	-	-	-
		6	+	+	+	+
<i>G. mellonella</i> (с/о)		3	+	-	-	-
		6	+	+	+	+
<i>G. mellonella</i> (д/о)		2.3	+	-	-	-
		2.6	+	+	+	+
		3.2	-	+	+	+
		3.4	+	-	-	-
		3.6	+	+	+	-
		1.2	+	+	+	+
		4.2	-	+	+	+
		6.1	-	+	+	-
		6.1	-	+	+	-
<i>M. domestica</i> (д/о)	1	2	+	+	+	+
<i>H. illucens</i> (д/о)	2	4	+	+	-	+
		7	+	+	+	-

Примечание – д/о - личинки до окукливания; с/о - личинки на стадии окукливания.

Изучение острой токсичности антимикробных пептидов

Оценку острой токсичности проводили с пептидом *G. mellonella* 6 д/о на белых беспородных мышах. Для презентативных экспериментов использовали 10 % раствор АМП. Результаты регистрировали после однократного внутрижелудочного и внутрибрюшинного введения указанного раствора. Животным массой 18-20 г АМП однократно вводили три разные концентрации 10% раствора АМП, варьируя объемы вводимых препаратов: 0,1 мл, что соответствовало 1000 мг/кг; 0,15 мл – 1500 мг/кг и 0,2 мл – 2000 мг/кг. В качестве отрицательного контроля применяли воду для инъекций. Всего нами было сформировано 8 групп животных, включая две контрольные. Животным первой группы 10 % раствор АМП вводили внутрибрюшинно, животным второй – внутрижелудочным способом. При учете результатов через 24 часа и на протяжении 14 дней наблюдения оказалось, что все 100% животных в каждой из экспериментальных групп остались живы. Ни одна из использованных концентраций АМП как при внутрижелудочном, так и при парентеральном введении не была фатальной для мышей. Соответственно, нам не удалось установить среднесмертельную дозу АМП для биомоделей, поскольку максимально возможные дозы для внутрижелудочного и парентерального введения не привели к гибели ни одного животного. Согласно общепринятой гигиенической классификации ГОСТ 12.1.007-76, 10 % раствор АМП *G. mellonella* №6 д/о относится к 4 классу опасности (вещества малоопасные). На следующем этапе была проведена оценка острой токсичности всех остальных полученных нами АМП и получены аналогичные результаты.

Изучение локализации пептидов в организме белых мышей

Для понимания механизма метаболизма антимикробных пептидов в макроорганизме, нами были проведены эксперименты по определению локализации АМП в конкретных таргетных органах организма белых мышей.

В результате проведенного эксперимента, было установлено, что АМП, меченые ФИТЦ через 24 ч после внутрибрюшинного введения не вызывали флуоресценции в крови, что явилось свидетельством их способности к быстрому транзиторному движению через кровяное русло биомоделей. Аналогичные данные были получены при внутримышечном введении АМП, меченых ФИТЦ, поскольку через 24 ч, отмечали полное выведение препарата из крови.

Флуоресценция не была обнаружена и при микроскопии мазка отпечатка из костного мозга после внутривнутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ, что говорит о полном отсутствии пептидов в мозге. Однако довольно сильная и интенсивная флуоресценция в указанный период отмечалась после внутримышечного введения, что явилось результатом локализации искомого вещества в клетках костного мозга (Рисунок 1).

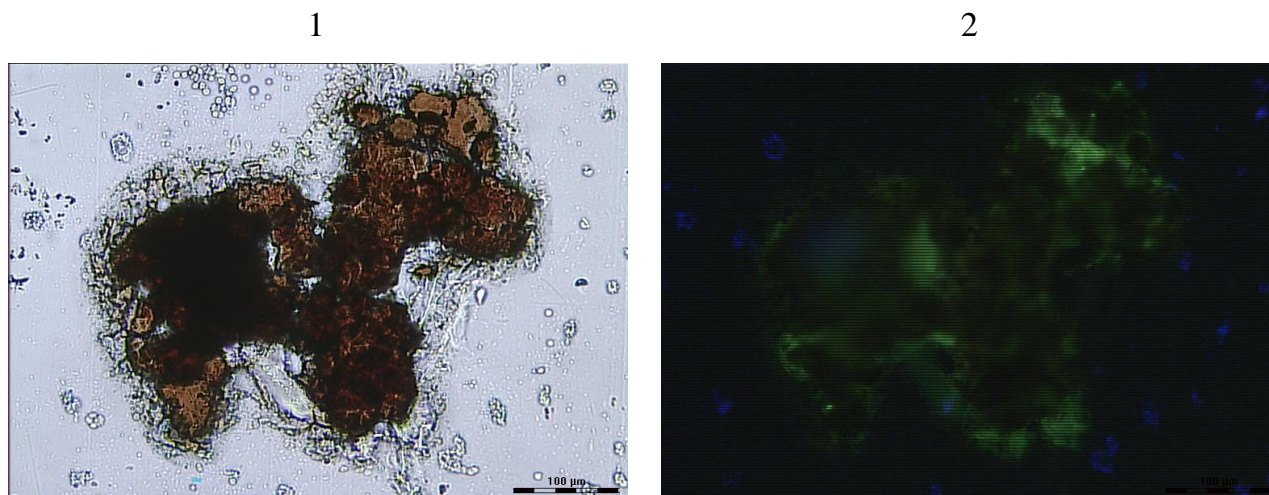


Рисунок 1 – Мазок отпечаток костного мозга мыши через 24 ч после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1).

Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x200

При микроскопии мазка отпечатка из паренхимы печени после внутривнутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ, в те же сроки регистрировали довольно интенсивное свечение внутри структурных образований (Рисунок 2), что указывало на сосредоточение пептидов в паренхиматозных клетках.

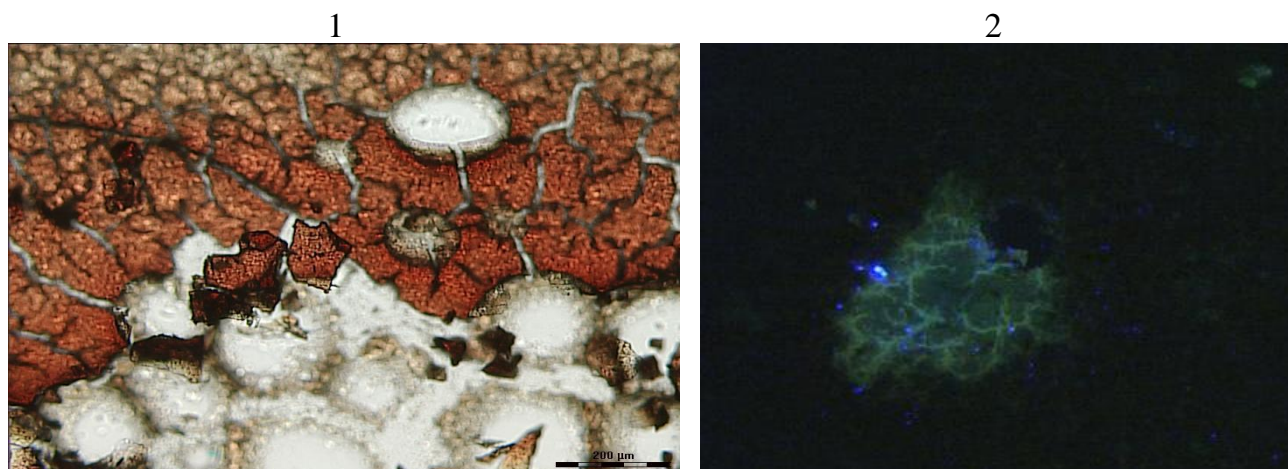


Рисунок 2 – Мазок отпечаток паренхимы печени мыши через 24 ч после внутривнутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1).

Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x100

Следует отметить, что после внутримышечного введения пептиды оказались способными также локализоваться в паренхиме печени, где выявлялись в течение последующих 24 ч с момента их введения, сосредотачиваясь внутри структурных образований, имеющих оболочку (Рисунок 3).

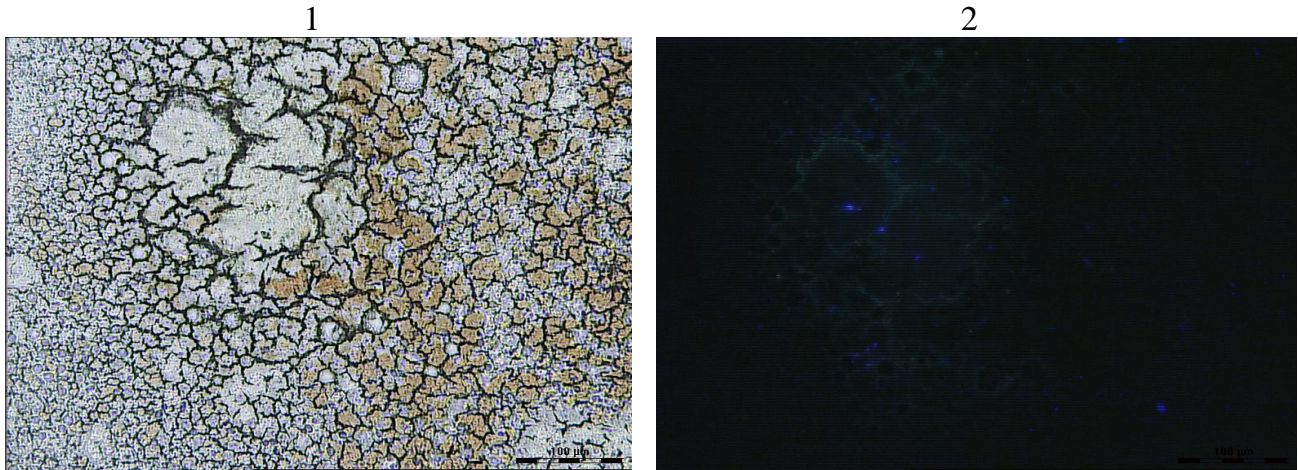


Рисунок 3 – Мазок отпечаток паренхимы печени мыши через 24 ч после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1).

Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x200

Локализация пептидов в клетках селезёнки в течение 24 ч была подтверждена при микроскопии мазка отпечатка паренхимы селезенки мыши после внутрибрюшинного введения АМП с регистрацией флюоресценции, имеющей строго очерченную форму и границы (Рисунок 4).

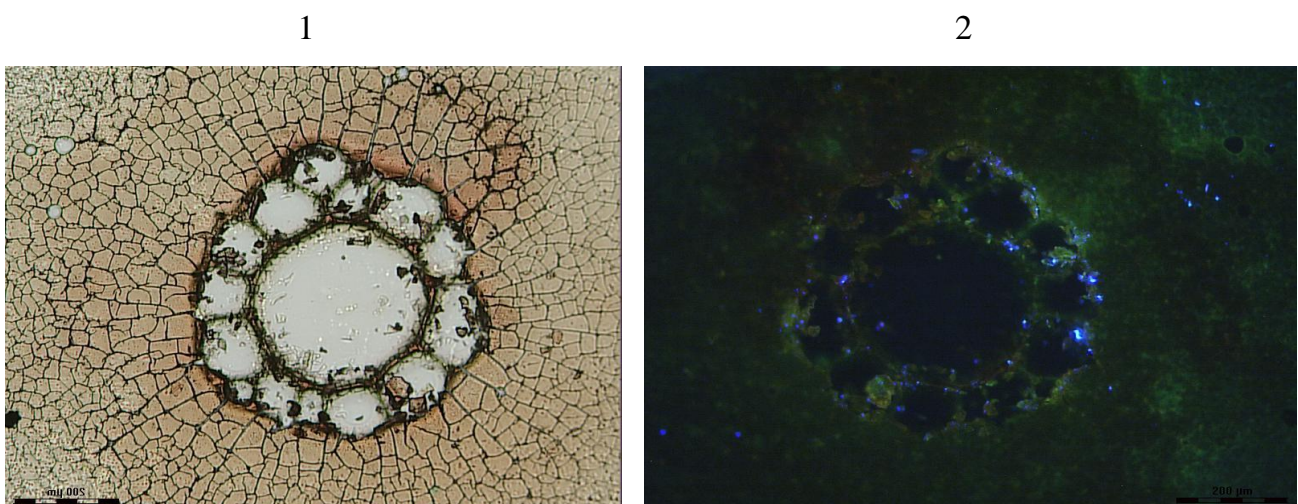
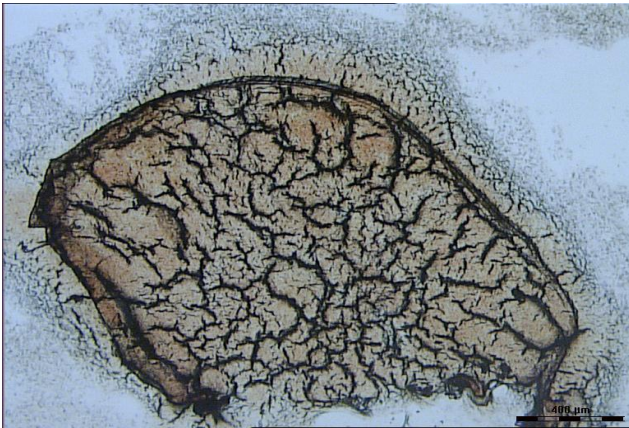


Рисунок 4 – Мазок отпечаток паренхимы селезенки мыши через 24 ч после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1),

Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x100

При внутримышечном введении АМП, меченых ФИТЦ, наблюдали аналогичные результаты (Рисунок 5).

1



2

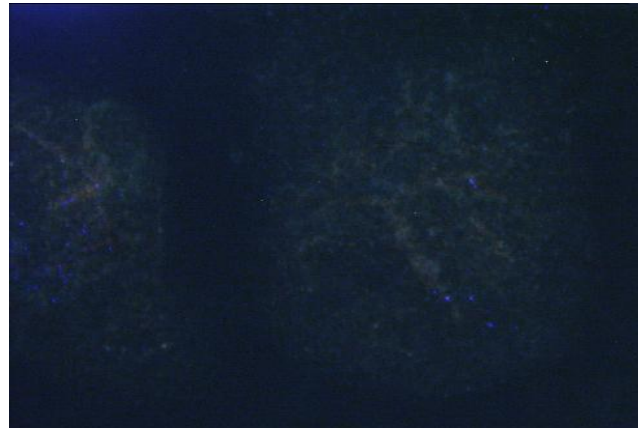


Рисунок 5 – Мазок отпечаток паренхимы селезенки мыши через 24 ч после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1), Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x50

Таким образом, нами было установлено, что через сутки независимо от способа после введения белым нелинейным мышам АМП, меченых ФИТЦ, происходит их накопление, в основном, в печени и селезенке. Кроме того, при внутримышечном введении АМП выявлено интенсивное свечение в костном мозге.

Следовательно, можно предположить, что АМП обладают тропизмом к паренхиматозным органам преимущественно, печени и селезенке, участвующим в девитализации и элиминации патогенов из макроорганизма млекопитающих, в том числе, сельскохозяйственных животных и человека, а также врожденном и адаптивном иммунном ответе на таргетные антигены возбудителей инфекционных болезней.

Заключение

В результате проведенных нами исследований было получено 15 АМП из биомассы личинок *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens*, доказана их антимикробная активность по отношению к референтным штаммам, в том числе к антибиотикоустойчивым, что создает предпосылки к использованию данных молекул в разработке противомикробных препаратов.

Выводы

1. Разработана методика выделения водорастворимых пептидов из личинок *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* и изучены их физико-химические свойства.

Получено 15 водорастворимых пептидов с молекулярной массой в диапазоне 3,4-6 кДа.

2. Экспериментальные серии пептидов 3 и 6, выделенных из *G. mellonella*, обладали наиболее высокой антимикробной активностью по отношению ко всем изученным штаммам. Пептид 3 ингибировал рост *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) в концентрации 0,18 мг/л; пептид № 6 проявлял антимикробную активность в концентрации 0,111 мг/л по отношению к *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027.

3. Экспериментальный образец АМП № 2, выделенный из *M. domestica*, обладал бактерицидным действием на тестовые штаммы *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702 и *E. coli* 1027. Экспериментальные пептиды 4 и 7, выделенные из *H. illucens*, обладали антимикробной активностью по отношению к *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, фракция 4 также к штамму *E. coli* 1027, а фракция 7 – к штамму *B. cereus* ATCC 10702.

4. Изучена острая токсичность 10 % растворов всех 15 полученных АМП. Установлено отсутствие токсичности АМП для биомоделей (белых аутбредных мышей) после внутрижелудочного и парентерального введения максимально возможных доз экспериментальных серий пептидов. Соответственно, 10% раствор АМП следует отнести к 4 классу опасности (вещества малоопасные).

5. Установлено, что через сутки независимо от способа введения белым нелинейным мышам АМП, меченых ФИТЦ, происходит их накопление, в основном, в печени и селезенке, а при внутримышечном введении - в костном мозге.

Практические предложения

1. Для получения экспериментальных серий антимикробных пептидов из биомассы насекомых рекомендуется использовать разработанный нами оригинальный алгоритм, включающий в себя следующие стадии: гомогенизацию; экстракцию; центрифугирование; многократное высаливание сульфатом аммония; повторное растворение.

2. При разделении белковых фракций методом ВЭЖХ для получения антимикробных серий пептидов использовать время хроматографирования 43-46 минут при скорости потока 1 мл/мин и колонку BioSep S2000 300x2120 мм.

3. Экспериментальные серии антимикробных пептидов в перспективе могут быть использованы для лечения и профилактики пищевых инфекций.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Настоящее исследование по выделению новых АМП является предпосылкой к разработке высокоэффективных антимикробных препаратов, которые могут быть использованы в качестве безвредных профилактических и терапевтических средств контроля пищевых инфекций, в том числе, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами возбудителей ИБ животных. Дальнейшее внедрение предлагаемых АМП, не способных в отличие от классических антибиотиков вызывать у животных развитие лекарственной резистентности, в практическую ветеринарию будет способствовать решению проблемы нарушения микробиоценозов живых организмов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России:

1. Выделение антимикробных пептидов из личинок *Hermetia illucens* и перспектива их использования / Смирнова К.Ю., Крылова Л.С., **Ремизов, Е.К.**, Горшунова С.В. *Международный вестник ветеринарии*. – 2020. – № 2. – С. 58-62.

2. Индикация пептидов из биомассы личинок насекомых и изучение их антимикробной активности / Л.С. Крылова, **Е.К. Ремизов**, К.Ю. Смирнова, О.С. Ларионова // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. – 2019. – № 4 (44). – С. 3-6.

3. Получение водорастворимых пептидов из биомассы личинок *Musca domestica* и изучение их свойств / **Е.К. Ремизов**, К.Ю. Смирнова, Е.И. Сорокатыя, Я.Б. Древко // *Вестник КрасГАУ*. – 2020. – №4. – С. 97-101.

Патенты:

4. Пат. 2714128 Российская Федерация. МПК 61К 35/64. Композиция антимикробных пептидов, полученных из личинок *Musca domestica*, и способ ее получения / Крылова Л.С., Древко Б.И., Фауст Е.А., Ремизов Е.К., Смирнова К.Ю., Древко Я.Б., Бородина М.А., Осина Т.С., Ларионова О.С.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. - № 2018142602; заявл. 04.12.2018; опубл. 12.02.2020; бюл. 20.

В материалах конференций, семинаров и в других изданиях:

5. Биотрансформация антимикробных пептидов *M. domestica* при различных способах введения *in vivo* / О.С. Ларионова, Л.С. Крылова, Я.Б. Древки, А.М. Буров, С.В. Козлов, **Е.К. Ремизов**, Е.А. Фауст // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2018. – № 8. – С. 21-29.

6. Индикация антимикробных пептидов и изучение их антибактериальной активности / А.А. Амеликина, **Е.К. Ремизов**, О.С. Ларионова, Я.Б. Древки, Е.А. Фауст // «Биотехнология: состояние и перспективы развития»: Мат. межд. форума. – Москва, 2018. – С. 147-149.

7. **Ремизов, Е.К.** Разработка способа разделения водорастворимых пептидов методом ВЭЖХ и изучение их антибактериальной активности / Е.К. Ремизов, О.С. Ларионова, Я.Б. Древки // «Современные проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса»: Сб. трудов конф. – Саратов, 2018. – С. 228-231.

8. Antimicrobial Peptides as a Base for the Development of Novel Antimicrobial Drugs / O.S. Larionova, Ya. B. Drevko, A.V. Bannikova, **Е.К. Remizov**, E.A. Faust, L.S. Krylova // BI's 9th anniversary World DN Day – China. – Dalian, 2018. – P. 196.

9. **Remizov, E. K.** Insect antimicrobial peptides: isolation, separation and antimicrobial activity / E. K., Remizov, O.S Larionova // BIO Web of Conferences, 2021. – 37, 00154.