

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Саратовский государственный аграрный
университет имени Н.И Вавилова»**

На правах рукописи



Ремизов Евгений Кириллович

**РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ПЕПТИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЛИЧИНОК
GALLERIA MELLONELLA И *MUSCA DOMESTICA* И ИЗУЧЕНИЕ ИХ
БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
доцент Ларионова О.С.

Саратов – 2020

Содержание

Введение	4
1. Обзор литературы	10
1.1. Антимикробные пептиды и их характеристика	10
1.2. Содержание и выращивание <i>G. mellonella</i> и <i>M. domestica</i>	12
1.3. Механизм действия антимикробных пептидов	15
1.4. Сравнительная оценка антибактериальной активности антибиотиков и антимикробных пептидов	19
1.5. Перспективы использования антимикробных пептидов в профилактике и терапии болезней сельскохозяйственных животных	22
2. Собственные исследования	24
2.1. Объекты исследования	24
2.2. Методы исследования	26
2.2.1. Методика содержания и выращивания биомассы восковой моли <i>G. mellonella</i>	26
2.2.2. Методика содержания и выращивания биомассы <i>M. domestica</i>	28
2.2.3. Методика выделения водорастворимых пептидов из личинок <i>G. mellonella</i> и <i>M. domestica</i>	29
2.2.4. Методика разделения водорастворимых пептидов методом ВЭЖХ	30
2.2.5. Определение содержания белка и молекулярной массы выделенных пептидов	31
2.2.6. Методика определения антимикробной активности	32
2.2.7. Изучение биотрансформации пептидов в тканях и органах белых мышей	32

2.3.	Результаты исследований и их обсуждение	34
2.3.1.	Выделение пептидов, полученных из личинок <i>G. mellonella</i> и <i>M. domestica</i>	34
2.3.2.	Разделение водорастворимых пептидов методом ВЭЖХ и изучение их физико-химических свойств	34
2.3.3.	Определение антимикробной активности макрометодом	50
2.3.4.	Определение антимикробной активности диффузным методом	55
2.3.5.	Определение антимикробной активности микрометодом	57
2.3.6.	Изучение биотрансформации пептидов в организме белых мышей	62
	Заключение	69
	Выводы	75
	Практические предложения	76
	Список литературы	77
	Приложения	94

Введение

Актуальность темы. В современных условиях интенсификации сельского хозяйства промышленное разведение животных предполагает использование антибактериальных препаратов, направленных на профилактику инфекционных заболеваний. Однако неконтролируемое использование антибиотиков приводит к селекции антибиотикорезистентных штаммов, следует отметить, что терапия заболеваний вызываемых этими штаммами затруднена. Пептиды насекомых обладают барьерной функцией и способны защищать макроорганизм от различных патогенных агентов. В процессе эволюции насекомые сформировали огромный потенциал с большой разновидностью пептидов, как результат они являются наиболее перспективным источником для поиска новых агентов, обладающих широким спектром фармакологического действия (Wang G. et al., 2015). Антимикробные пептиды (АМП) 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 (Gennaro, R. et al., 2002; Diamond, G. et al., 2009).

В этой связи выделение, изучение антимикробных пептидов и исследование их биологических свойств позволит не только решить задачи фундаментального характера, но и создаст предпосылки к разработке антибактериальных препаратов нового поколения на их основе.

Отдельные антимикробные пептиды обладают цитотоксическим эффектом и поэтому могут быть использованы при лечении заболеваний слизистых оболочек, покровных тканей животных, действуя на животные клетки, без введения в кровь пациента. Такие пептиды активно используются для создания новых лекарственных препаратов.

В настоящее время имеются сведения об антимикробных пептидах, свойствах, спектре и механизме их действия, однако систематизировать эти знания на данный момент не удалось, вследствие недостаточности фактического материала. Список изученных в этом отношении видов живых организмов слишком мал, чтобы делать обобщения, касающиеся больших систематических групп. Кроме того, требуется сравнение спектров действия антимикробных пептидов разных видов, принадлежащих к разным таксонам, а также изучение специфичности их действия в отношении спектра микробов, контактирующих с данным видом организмов в естественных условиях. Научно-исследовательская работа по выделению наиболее перспективных АМП позволит решить проблемы нарушения микробиоценозов живых организмов, будет способствовать терапии заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами, и может использоваться для профилактики заболеваний различной этиологии.

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. В частности, подобными исследованиями занимались такие ученые, как R. Davis, 2009; G. Maisetta, 2010; M. Ashby, 2014. В отдельных работах изучалось влияние АМП на *Salmonella typhimurium*, воздействие АМП 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.

Вместе с тем, более поздними исследованиями ученых G. Guo 2017; M. Tonk, 2017; V. Machado, 2020 детально изучался механизм действия антимикробных пептидов в целом, а также перспективы использования АМП в медицинских целях. В этой связи выбор темы работы был обусловлен актуальностью данных исследований и недостаточностью сведений по получению антимикробных пептидов из насекомых *Galleria mellonella* и *Musca domestica*, а также изучение их антимикробного действия на различные штаммы микроорганизмов.

Цель работы – выделение пептидов из биомассы личинок *G. mellonella*, *M. domestica*, изучение их антимикробной активности и биотрансформации в организме белых мышей.

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработка методики пробоподготовки биомассы личинок для получения белковых фракций.
2. Разработка методики проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для разделения белковых фракций.
3. Изучение антимикробной активности полученных пептидов различными способами.
4. Исследование биотрансформации 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* и *M. domestica* по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P), *Salmonella typhimurium* 1626, *Candida albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Escherichia coli* 1027. Выявлены пептиды 3 и 6, выделенные из *G. mellonella*, обладающие наиболее высокой антимикробной активностью. Пептид 3 ингибировал рост микроорганизмов *S.*

albicans РКПГУ–401/NCTC–885-653, *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), *E. coli* 1027, *B. cereus* ATCC 10702, *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653. Пептид 4.2, выделенный из биомассы личинок *G. mellonella*, обладал антимикробной активностью к *E. coli* 1027 в концентрации 10 мг/л. 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. Полученные нами данные по метаболизации антимикробных пептидов в организме лабораторных мышей при различных способах введения представляет теоретическую значимость для дальнейших исследований. Таким образом, проведенные исследования создают предпосылки к созданию препаратов на основе антимикробных пептидов *G. mellonella* и *M. domestica*. 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). Разработаны способы культивирования имаго и выращивания личинок *G. mellonella* и *M. domestica*. В работе представлена оригинальная методика выделения водорастворимых пептидов из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica*. Разработанный нами алгоритм получения антимикробных пептидов может быть использован в дальнейших исследованиях по конструированию противомикробных препаратов на основе АМП. Результаты исследований используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторных занятий со студентами факультета ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

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 пробоподготовки для получения фракций водорастворимых пептидов, включает в себя гомогенизацию биомассы личинок, экстракцию, центрифугирование, многократное высаливание сульфатом аммония.
2. Оптимальные условия для разделения водорастворимых пептидов: 80 мм при скорости потока 1 мл/мин и длине волны 280 нм, на колонке BioSep SEC S-2000 300x7, время хроматографирования 60 мин, объем вводимой пробы 20 мкл и температуре 25 °С.
3. Пептиды, выделенные из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica* оказывали ингибирующее действие на *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027.
4. Накопление АМП, было выявлено в основном, в печени и селезенке через сутки после внутримышечного и внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ, белым нелинейным мышам. Отмечали интенсивное свечение при внутримышечном введении в костном мозге.

Работа выполнена на кафедре микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени 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); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России на II этапе работа заняла 1 место (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 СГАУ (Грант Ректора) работа заняла 2 место (Саратов, 2018); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России на III этапе работа заняла 1 место (Оренбург, 2018); XXIII Агропромышленном форуме юга России и выставке «Интерагромаш» «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса», посвященной 90-летию ДГТУ (РИСХМ) (Ростов-на-Дону, 2020).

Публикации. Основные результаты отражены в 7 публикациях, из них 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК РФ и 1 патент РФ.

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 165 наименований, в том числе 135 иностранных научных работ. Работа представлена на 99 страницах, иллюстрирована 21 таблицей и 32 рисунками.

1. Обзор литературы

1.1. Антимикробные пептиды и их характеристика

Антимикробные пептиды синтезируются практически всеми видами, от бактерий до млекопитающих, представляют собой защитные молекулярные механизмы врождённого и приобретённого иммунитета организма (Zhang L.-J. et al., 2016).

Антимикробные пептиды животного происхождения могут проявлять активность в отношении бактерий, мицелиальных и дрожжевых грибов, простейших, оболочечных вирусов, а также могут играть роль медиаторов иммунной системы.

АМП играют важную роль в тех организмах, которые не имеют адаптивной иммунной системы и основывают свою защиту только на врожденном иммунном ответе, например - беспозвоночные. Из них - насекомые являются крупнейшим классом на Земле, содержащем 50% всех известных видов животных, и представляет собой широкий источник АМП (Brady D. et al., 2019)

Впервые, АМП были обнаружены около 40 лет назад, с тех пор было охарактеризовано большое разнообразие АМП насекомых. Эти молекулы были интенсивно изучены, не только за их физиологическую роль в иммунитете насекомых, но и как потенциальные альтернативы обычным антибиотикам при лечении инфекционных заболеваний (Yi, H et al., 2014; Wu, Q. et al., 2018).

Более того, было показано, что некоторые АМП насекомых обладают иммуномодулирующими функциями, а также противоопухолевой активностью (Wu Q. et al., 2018). Эти биологические свойства в сочетании с современными достижениями в области биотехнологии, привели к возобновлению интереса к АМП насекомых и их потенциалу для борьбы с современными биомедицинскими проблемами.

АМП насекомых можно классифицировать на основе их последовательности и структуры на следующие группы:

Класс I-(α -спираль) - линейные пептиды, которые принимают настройку,

называемую α -спираль, примеры включают цекропин, магайнин, пексиганан, дермасептин и диптеран (Machado V. et al., 2020).

Класс II (β -лист) - пептиды, которые имеют две или более β -цепи, которые стабилизированы присутствием дисульфидных связей, такие как дефенсин, протегрин и гелиомицин.

Класс III (расширенный) - линейные пептиды, которые имеют большое количество аминокислот, таких как пролин, гистидин, аргинин или глицин, примеры включают дрозцин, лебоцин и морицин, пиррокорицин, индолидицин и гистатины.

Класс IV (β -шпилька или петли) – пептиды которые имеют структуры, похожие на скобы, соединенные мостиками дисульфидов и обладают большим количеством остатков пролина, примеров тахиплезинов, бактенецин и додекапептидов.

Классы I и II (α -спираль и β -лист) являются более распространенными АМП и более изученными; в качестве примера- цекропин и дефенсин (Peters et al., 2010; Ahmad A. et al., 2012; Godreuil S. et al., 2014; Harrison P. et al., 2016; Kvensakul M. et al., 2016).

Противомикробные, противоопухолевые, противовирусные, антипротозойные и фунгицидные эффекты способны вызывать катионные антимикробные пептиды (СAMP), изолированные из тканей эпителиального происхождения и нейтрофилов - кателицидины, дефензины, белки и т. д. Данные молекулы оказывают стимулирующее влияние на выработку цитокинов, миграцию и пролиферацию клеток, модулируют гуморальный иммунный ответ и увеличивают титр антител после вакцинации, и их можно использовать совместно с веществами, которые ингибируют неферментативный фибринолиз в дефензинах, при разработке препаратов для борьбы с кровотечением при инфекционных заболеваниях (Ojo O.O. et al., 2011)

1.2. Содержание и выращивание *G. mellonella* и *M. domestica*

На сегодняшний день существует большое количество инсектариев для выращивания насекомых. Главными критериями при разработке данных конструкций являются:

- свободный доступ к насекомым;
- герметичность;
- поддержание условий способствующих росту, размножению и развитию насекомых.

Для конструирования инсектария необходимо учитывать конкретный вид насекомого и соблюсти оптимальные условия для его культивирования.

Отличительной особенностью имаго *G. mellonella* является всеядность и многостадийность развития. Размер личинки составляет около 0,2 мм, они могут испортить изделия из полиэтилена, полистирола и другого пластикового материала. Культивировать необходимо в темном помещении. Параметры микроклимата для выращивания большой восковой моли следующие: оптимальная температура в пределах 30-32 °С, относительная влажность - 65-75%.

Известно достаточное количество способов для содержания насекомых, среди их числа устройство, которое представляет собой контейнер с вентиляционными отверстиями на торцевых поверхностях, изогнутую наружу крышку с таким же отверстием, зажатый мелкой сеткой, и зажимами для крепления крышки, созданные (А. Д. Логачевым, 1981) состоящее из сложенной рамки, покрытое сеткой.

Однако данное устройство малоприспособно для содержания личинок большой восковой моли. Личинки могут разрушить целостность ткани и оказаться снаружи.

В работе (А.В. Гущина, 2016) предложен альтернативный вариант. Предлагается использовать шкаф, состоящий из несущих конструкций.

Поскольку большая восковая моль питается пчелиными сотами, в состав которых входит воск – схожий по своей химической инертности и похожий на полиэтилен. Данная конструкция выполнена из стекла, т.к. картон, древесину и

пластмассу личинки могут прогрызть. Листы стекла соединены при помощи эластичного силиконового герметика.

На рисунке 1 и 2 изображены составные элементы контейнера.

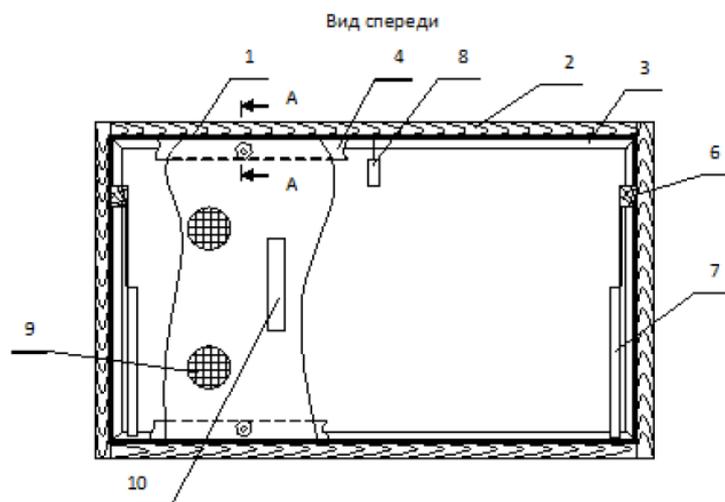


Рисунок 1 – Устройство контейнера для культивирования личинок *G. mellonella* (передняя часть)

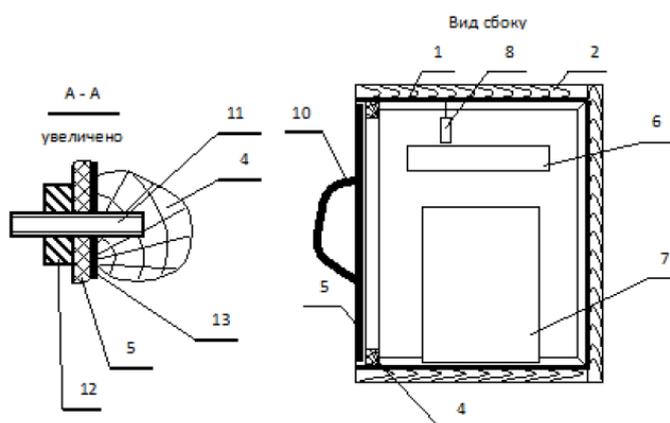


Рисунок 2 – Устройство контейнера для культивирования личинок *G. mellonella* (в профиль)

На рисунке 1 и 2 показаны конструкция емкости, ее основные элементы (вид спереди и сбоку).

Компоненты контейнера:

- шкаф, в который встроен молярый 2;
- стенки конструкции, выполненные из стекла 1;
- фланец для крепления передней съемной стенки 4;
- уплотнительные хлорвиниловые уголки, приклеенные герметиком 3;
- нагревательные элементы 7
- датчик температуры 8;
- передняя съёмная стенка 5;
- бруски для креплений нагревательных элементов приклеенные эластичным герметиком 6;
- вентиляционные отверстия, закрытые мелкой сеткой 9;
- защитная ПВХ пленка 13.
- ручки 10;
- резьбовые шпильки крепления съемной крышки 11;
- гайки 12.

Например, N. Marston и тд., для содержания личинок *G. mellonella* использовали пластиковые ящики с сеткой для вентиляции. Для откладки яиц добавляли бумажный вкладыш в контейнер после появления имаго. В инсектарии при постоянном освещении обеспечивалась стабильная температура равная $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, с относительной влажностью $60\pm 5\%$ в помещении (Marston N. et al., 1973).

Sohail Ahmed et al., изначально содержали имаго большой восковой моли в банках, изготовленных из пластмассы, для спаривания особей и сбора, отложенных ими яиц. После чего, в условиях, приближенных к естественным, яйца моли переносили на питательные среды, подготовленные для выращивания личинок (Ashfad M. et al., 2005).

A. Dietz и A. Eischen, в своих целях применяли банки из стекла, в крышке имелись отверстия для вентиляции, сама же крышка плотно прилегалась к корпусу. Банки помещали в термостаты (при температуре $31\pm 2^{\circ}\text{C}$, и относительной влажности $40\pm 5\%$) (Frank A. E. et al., 1990).

В своей работе для содержания имаго *G. mellonella*, автор Н. Haydak описывает стеклянную банку объемом 0,57 л, в условиях относительной влажности 75% постоянной температуры- 33 °С (Haydak M. et al.,1936).

А.К. Рачков и др., 1991, в лабораторных условиях выращивали большую восковую моль в чашках Петри и банках из стекла.

Б.Г. Севастьянов и др., 2002 предлагает для массового разведения большой восковой моли, лучше всего, использовать шкаф с подогревом. Для обеспечения обогрева, в качестве теплового прибора, автор советует установить лампу накаливания необходимой мощности, помещенную в банку из жести и наполненную сухим песком. На шкаф помещается герметично закрывающаяся дверца для предотвращения потери тепла, а также расползания личинок из шкафа.

Анализируя литературные источники, можно заключить, что в данное время существует большое количество способов разведения *G. mellonella* в условиях лаборатории. Все имеют схожее оснащение и конструкцию: наличие отверстий для аэрации, для предотвращения повышенной влажности, основной материал емкостей – стекло. Оптимальный температурный режим содержания 20-32 °С при относительной влажности 50-75%.

Для разведения и культивирования *M. domestica* в условиях лаборатории используют инсектарии, которые представляют собой ящик размером 1х1 м, обтянутый москитной сеткой. Для осуществления работы с насекомыми используют специальный рукав, изготовленный из москитной сетки и пришитый спереди к стенке инсектария. В качестве корма для имаго используют сухие отруби, сухое молоко и воду. Температура в инсектарии поддерживается на уровне 28-30 °С при относительной влажности 60 – 70 %.

1.3. Механизм действия антимикробных пептидов

Большинство АМП в составе противомикробных препаратов способны взаимодействовать с липидными мембранами благодаря амфипатическому строению и наличию положительного заряда, что обеспечивает гидрофобную и электростатическую реакцию (Khandelia H., et al., 2008). Механизмы их работы

описаны в большом количестве работ, где для определения особенностей этого процесса был использован широкий спектр современных методов, включая создание мембран, компьютерное моделирование, изучение образования отдельных ионных каналов, флуоресцентные методы, рассеяние нейтронов с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР), круговой дихроизм (Wimley W.C., et al., 2010).

Уничтожение пептидами клеток может проходить очень быстро для некоторых пептидов и до полутора часа для других. В основном же все пептиды имеют схожие этапы ингибирования бактерий, независимо от механизма их действия.

- Взаимодействие отрицательно заряженных компонентов в клеточной мембране микроорганизмов (фосфатных групп, изученных липоевой и липотической кислот) с положительно заряженными молекулами АМП.
- Проникновение через клеточную стенку Грам⁺ и Грам⁻ бактерий, состоящую из пептидогликана. Этот этап недостаточно изучен, несмотря на большое количество работ, посвященных мембранотропному механизму действия АМП (Wiesner J. et al., 2010).
- Нарушение структуры мембраны микробных клеток при встраивании АМП. Потеря клетками жизненно важных компонентов через мембранные зазоры, переход части энергии упорядоченных процессов в энергию неупорядоченных процессов мембранных потенциалов, растворение многих мембраносвязанных ферментных комплексов и сборка заряженных липидов (Nguyen L. et al., 2011; Wimley W.C. et al., 2011). Подавление дыхания, окислительное фосфорилирование, размножение, транскрипция, синтез белка и другие метаболические процессы, а также накопление воды в клетках, вызывающее осмотический лизис, приводящий к гибели микроорганизмов. Ряд исследований показал, что слияние АМП на начальной стадии приводит к истончению липидного слоя мембраны. Для описания мембранолитического действия АМП, на текущий день, рассматривается три основополагающих механизма:

1) *Модель бочарной клетки.* Пептиды концентрируются на клеточной мембране, встраиваясь гидрофобными областями в сторону липидных хвостов мембранных фосфолипидов, а гидрофильные области формируют внутреннюю поверхность поры.

2) *Образование тороидальных пор.* Пептиды, которые адсорбируются на мембране, способствуют агрегации и формированию пор таким образом, что их гидрофильные области остаются электростатически связанными с фосфолипидами. В зоне мембранных фосфолипидов поры располагаются не поперек, а вдоль плоскости мембраны.

3) *Ковровый механизм.* Контактируя с мембраной, пептиды адсорбируются на ее поверхности и располагаются параллельно этой поверхности с образованием сплошного слоя или «ковра». Когда концентрация пептидов достигает определенного уровня, некоторые пептиды проникают в мембрану, образуя тороидальные поры. Таким образом, в итоге антимикробные пептиды способствуют разрушению мембраны с образованием мицелл (Diamond G. et al., 2009).

По мнению авторов, действие АМП, главным образом, нацелено на бактериальные мембраны. Эволюционное обоснование данного факта заключается в том, что такие структуры трудно изменить микроорганизмам без последующей потери общего состояния. Это уменьшает вероятность того, что бактерии будут развивать устойчивость к таким АМП (Guo G. et al., 2017).

С точки зрения структуры АМП, они представляют собой чрезвычайно разнообразную группу активных молекул, при этом все обладают катионными и амфипатическими свойствами, которые делают их подходящими для мембранного нацеливания (Li J. et al., 2007). Эти наблюдения, о чем говорят современные литературные источники, показывают, что антимикробная активность не зависит от конкретных аминокислотных последовательностей или от конкретных пептидных структур (Koszalka P. et al., 2011; Lai, Y. et al., 2009; Löfgren, S.E. et al., 2008). Вместо этого, активность наиболее зависима от аминокислотного состава пептида и его физико-химических свойств. Смешанный

катионный и гидрофобный состав АМП позволяет хорошо взаимодействовать с микробной цитоплазматической мембраной, которая, обычно, представляет анионную поверхность, богатую липидами, такие как: фосфатидилглицерин или кардиолипин. Дело в том, что все грамотрицательные и грамположительные бактерии проявляют этот тип отрицательно заряженных липидов, что объясняет отсутствие специфичности большинства АМП и способствуют притяжению между АМП и бактериальными мембранами, предотвращая их связывание с большинством мембран клеток хозяина. Одним из наиболее часто цитируемых объяснений для селективности АМП к микроорганизмам в мембранных взаимодействиях по отношению к клеткам-хозяевам является различия в наличии анионного липида. Связывание АМП с микробными мембранами является значительным явлением, в то время как связывание АМП с нейтральными фосфатидилхолиновыми/холестериновыми/сфингомиелиновыми поверхностями плазматических мембран животных слабее. Еще одна гипотеза, существующая для объяснения селективной токсичности: АМП варьируются в различиях в мембранном потенциале микробов и клеток млекопитающих. Микробы, как правило, имеют значительно большую разность зарядов на их мембранах, по сравнению с клетками млекопитающих, которые отдают предпочтение катионным дефенсинам для селективного воздействия на микробов. Существует достаточно много прямых доказательств того, что большинство АМП проникают в микробную цитоплазму (Guo G. et al., 2017). АМП могут рассеивать электрохимические градиенты через микробные плазматические мембраны в течение нескольких секунд после внедрения (Lobo D.S. et al., 2007; Rothan H.A. et al., 2012). Это подразумевает, то, что АМП способны быстро проходить через пептидогликановый слой грамположительных бактерий или липополисахаридный слой внешней мембраны грамотрицательных бактерий за несколько секунд. Наибольшая проницаемость происходит через цитоплазматическую мембрану от нескольких минут до десятков минут (Nicole L. et al., 2013; Rahnamaeian M. et al., 2011). По истечению часа или более в контакте с АМП, происходит серьезное нарушение структуры и морфологии микробной мембраны, часто отмечают:

мембранный блеббинг, везикуляция, фрагментация, высвобождение ДНК, агрегация клеток, и разрушение морфологии клеток. Одним из самых очевидных механизмов действия является так называемое притягивание. При этом образуется электростатическая связь между анионными или катионными пептидами и поверхностью бактерий. Катионные АМП, скорее всего, в первую очередь притягиваются к отрицательно заряженным грамотрицательным бактериям. На следующем этапе происходит прикрепление клеток, в процессе которого пептиды, находящиеся вблизи микробной поверхности, должны проходить через полисахариды, прежде чем они могут взаимодействовать с внешней мембраной, которая содержит липополисахариды у грамотрицательных бактерий и траверс капсульных полисахаридов, тейхоевых кислот и липотейхоевых кислот, прежде чем они смогут взаимодействовать с цитоплазматической мембраной у грамположительных бактерий. После чего они уже получают доступ к цитоплазматической мембране, и могут взаимодействовать с липидным бислоем. При инкубировании пептидов *in vitro* с искусственными мембранами или везикулами их связывание происходит в двух физически различных состояниях (Guo G. et al., 2017). Степень истончения мембраны специфична для пептида и прямопропорциональна концентрации пептида.

Высокий интерес биотехнологии к АМП обусловлен тем, что многие антимикробные пептиды проявляют высокую активность против грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов, вирусов. Значительная часть АМП характеризуется положительным зарядом, их называют катионными АМП и способностью формировать спирали и/или слои при взаимодействии с отрицательно заряженными молекулами мембран и клеточных стенок микроорганизмов.

1.4. Сравнительная оценка антибактериальной активности антибиотиков и антимикробных пептидов

Снижение чувствительности микроорганизмов к антимикробным средствам

– это эволюционный процесс, который вполне закономерно способствует адаптации патогенов к непрерывному контакту с антибиотиками. Широкое использование антибиотиков в качестве антимикробных лекарственных препаратов способствует селекции антибиотикорезистентных штаммов. В этой связи поиск новых перспективных антибактериальных агентов биологического генеза может стать предпосылкой к разработке высокоэффективных антимикробных препаратов, которые могут прийти на смену традиционным препаратам.

В настоящее время использование «классических» антибиотиков для борьбы с инфекционными заболеваниями обусловлено их специфическим действием, скоростью воздействия на организм животных и устранением осложнений при лечении вирусных инфекций. Однако не всегда такая терапия проходит без последствий для макроорганизма и может приводить к селекции мультирезистентных штаммов патогенных бактерий, снижению иммунитета и нарушению работы некоторых органов (Guangshun W., et al., 2015).

В отличие от классических антибиотиков антимикробные пептиды имеют низкую вероятность развития антибиотикорезистентности, вместе с тем они обладают противомикробной активностью по отношению к широкому спектру бактерий, грибов и вирусов, вызывая их быстрый киллинг и обладают противовоспалительными свойствами.

Как показывают авторы G. Guo et al., 2017, эффективность 100 мкг / мл АМП17 для ингибирования роста *C. albicans* сопоставим с аналогичным -100 мкг/ мл р-ра клинического фунгицида флуконазола. Чтобы лучше определить противогрибковую активность АМП17, авторы измеряли минимальную ингибирующую концентрацию для подавления роста *C. albicans*, значение в обоих случаях составляло 2 мкг / мл, что указывало на чрезвычайную противогрибковую эффективность АМП17.

Чтобы лучше понять, как АМП17 будет влиять на микробные клетки, обработанные АМП17 клетки *C. albicans* вместе с необработанными и обработанными флуконазолом клетками, подвергали электронному

микроскопированию. Полученные данные показывают, что необработанные *S. albicans* клетки представляют, имеют здоровый, пухлый, слегка яйцевидный вид с гладкими поверхностями, одинаковые в размере. Однако, клетки, обработанные флуконазолом, отображают сильно искаженную неправильную форму с вогнутыми поверхностями, рассеянные по отдельности, в одном поле зрения. Размер клеток сильно варьирует. Клетки, отобранные через 12 часов после обработки АМП17, имеют удлиненную форму с несколько шероховатых поверхностей, плотно прилегающих друг к другу. Результаты, представленные в этом исследовании, показывают, что АМП способны подавлять микроорганизмы. Механизм действия АМП и антибиотиков сильно отличается, кроме того механизмы с помощью которых АМП обеспечивают киллинг микроорганизмов, варьируются в каждом конкретном случае. В случае с АМП17, обработанные им клетки *S. albicans* были вытянуты и приклеены друг к другу, что сильно отличается от того, что авторы наблюдали с клетками, обработанными флуконазолом. Наблюдаемое клеточное искажение на обработанных АМП17 клетках может быть следствием прямого взаимодействия АМП17 с клеточной мембраной, поскольку АМП17 слишком велик, чтобы свободно проникать в ячейки, и удлиненная форма ячейки и размер мелких клеток.

Помимо этого, возможен инновационный подход, заключающийся в использовании АМП в качестве адъювантов в комбинации с обычными антибиотиками (Grassi L. et al., 2017). Одновременное лечение АМП и антибиотиками может определить синергические противомикробные эффекты, которые способны повысить эффективность терапии и снизить эффективность применения дозы, в свою очередь, снижая потенциальную токсичность побочных эффектов. Этот аспект должен оцениваться для каждого Сес или Сес-аналогов, поскольку показания, полученные из исследований *in vitro*, выполненных на Сес-аналоге пептида, такие как гибриды САМ или Сес-LL37, демонстрировали различные степени синергетической активности в зависимости от типа антибиотиков и видов бактерий, например, (Wei X. et al., 2016; Garbacz K. et al., 2017; Geitani R. et al., 2019).

Таким образом, потенциал антимикробных пептидов и их использование для разработки противомикробных препаратов очевиден. Особую актуальность и значимость в данном вопросе приобретает распространение бактериальных штаммов, устойчивых к классическим антибиотикам, для терапии заболеваний, вызываемых таким штаммами, перспективно использование препаратов на основе АМП, как принципиально нового класса антибиотиков, потенциально эффективных против мультирезистентных патогенов.

1.5. Перспективы использования антимикробных пептидов в профилактике и терапии болезней сельскохозяйственных животных

Стремительная эскалация инфекционных заболеваний, устойчивых к обычным антибиотикам, требует срочных глобальных действий, таких как разработка новых методов лечения. Антимикробные пептиды представляют собой потенциальную альтернативу в лечении мультирезистентных инфекций. Отдельные антимикробные пептиды, в частности цекропины, являются перспективными антибактериальными терапевтическими препаратами, примечательна их низкая токсичность в отношении клеток млекопитающих и наличие противовоспалительной активности. Однако имеются некоторые сложности, связанные с использованием пептидов в качестве препаратов для эффективной терапии. Пути решения заключаются в применении нанотехнологий при конструировании препаратов на основе АМП (Brady D. et al., 2019).

В недавнем исследовании Rai, A. et al., продемонстрировали, что сопряжение САМ пептида с наночастицами золота усиливает противомикробную активность и стабильность САМ *in vitro*, а также *in vivo* в модели мышей с сепсисом (Rai A. et al., 2016). Эти обнадеживающие результаты открывают новые перспективы для использования цекропинов (и АМП в целом) в качестве терапевтических средств для лечения инфекционных заболеваний.

Исследования показывают, что новые составы на основе природных цекропинов позволят разработать лекарственные препараты, эффективные в

отношении грамотрицательных бактерий. Цекропины и их аналоги могут быть также использованы для покрытия биоматериалов для предотвращения развития на них микрофлоры.

Инновационный подход заключается в использовании АМП в качестве адъювантов в комбинации с обычными антибиотиками (Grassi L. et al., 2017). Одновременное лечение АМП и антибиотиками может определить синергические противомикробные эффекты, которые способны повысить эффективность терапии и снизить эффективность применения дозы, в свою очередь, снижая потенциальную токсичность побочных эффектов.

Кроме того, перспективными являются исследования использования биоразлагаемых и биосовместимых органических материалов для капсулирования пептидов для неинвазивной или менее инвазивной адресной доставки (например, назальные, буккальные /сублингвальные или трансдермальные маршруты).

Пептидные соединения могут быть получены с использованием различных методов, включая химический синтез, бесклеточные системы экспрессии, технологии рекомбинантных ДНК для производства гетерологичных клеточных систем и трансгенных организмов. Так как натуральные цекропины и их аналоги, как правило, имеют низкую молекулярную массу (<4 кДа), химический синтез является лучшим вариантом для их производства (Bédard F. et al., 2018).

Следует отметить что, распространение инфекционных заболеваний, вызванных мультирезистентными штаммами, представляет социальную и экономическую угрозу (Report to the Secretary General of the Nations Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance (IACG), 2019). Антимикробные пептиды могут быть использованы при конструировании противомикробных препаратов и стать перспективными аналогами классическим антибиотикам.

Наряду с этим полученные данные будут способствовать решению проблем нарушения микробиоценозов живых организмов, что в свою очередь позволит осуществлять терапию заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами, и может использоваться для профилактики заболеваний различной этиологии.

3. Собственные исследования

2.1. Объекты исследования

Биологическим объектом для проведения исследования явился вид насекомых: большая восковая моль и комнатная муха *M. domestica* (Рисунок 3) и *G. mellonella* (Рисунок 4).

Из всех видов семейства *Muscidae* наиболее многочисленны *M. domestica*.



Рисунок 3 – Муха домашняя (*M. domestica*) имаго и личинка

Муhy культивировались в инсектарии с соблюдением оптимальных параметров микроклимата. Личинка комнатной муhy – полифаги, они способны развиваться на любых органических отходах.

Цикл развития комнатной муhy включает в себя следующие стадии. Глубина, на которую самки откладывают яйца, составляет 2 – 3 мм. Развитие яиц продолжается 8 – 15 часов. Развитие личинок заканчивается через 5 – 7 суток, куколки через 8 – 10 дней. В среднем за жизнь самка откладывает 600 яиц, яйцекладка начинается через 5 – 7 дней после вылета. При инкубировании мух в условиях инсектария, длительность каждого из этапов несколько увеличивается: активность личинок наступает через 12 - 18 ч, развитие до куколки занимает 7 - 8 дней, от куколки до вылета имаго - 8 - 10 дней. В природных условиях *M. domestica* на различной стадии: личинки, куколки или имаго способны перезимовать. Когда температура окружающей среды достигнет оптимальных значений, имаго начинают лет и откладку яиц. Однако в условиях инсектария они могут жить весь год без диапаузы.

Следует принять во внимание то, что на культивирование личинок могут оказывать воздействие ряд факторов, такие как, влажность, температура,

соотношение яиц и субстрата, качество яиц мух.



Рисунок 4 – Большая восковая моль (*G. mellonella*) имаго и личинка

Большая восковая моль, огневка пчелиная *G. mellonella* – вредитель медоносных пчел из семейства огневки настоящей (*Pyralidae*).

У самок размах крыльев 15 - 35 мм, длина тела в среднем 13 мм.

Тело и крылья чешуйчатые, содержат пигмент. Цвет передних крыльев серый с темными пятнами, задние крылья - темного цвета, задний край передних крыльев ровный, а задние крылья имеют округлую форму. Самка в спокойном состоянии держит крылья сложенными в форме, напоминающую форму крыши. Голова самок вытянута, имеет хоботок с опушением, имеют фасеточные глаза и тонкие подвижные антенны, состоящие из 60 частей. Брюшко насекомого состоит из 10 частей, при надавливании виден длинный яйцеклад.

Самцы большой восковой моли мельче самок: размах крыльев у них составляет 13 - 32 мм, длина тела около 11,5 мм. Передние крылья темно-коричневые, с глубокой выемкой на заднем крае. В отличие от самки в спокойном состоянии самец держит крылья распушенными. Голова круглая, на ней также имеется опушение, шипики менее развиты, чем у самки, и направлены вверх. При надавливании на тело выступает копулятивный аппарат.

Окраска имаго обоих полов серебристо-белая при выращивании на среде из воска, а тех, которые выращиваются на диете из сот с расплодом пчел, – окраска варьирует преимущественно от коричневой до темно-серой и почти черной.

Яйца большой восковой моли круглые или слегка овальные, белого цвета, размером 0,5 × 0,35 мм. У личинки длина тела составляет 1 мм, передняя часть

значительно шире задней; голова светло-желтого цвета, несколько упрощена; восемь ног и на заднем конце две щетинки. Взрослая личинка длиной 18 - 28 мм, беловато-серого цвета, ее тело состоит из 13 сегментов, широкое в средней части и слегка сужающейся к головному и заднему концу, голова бурая.

Кокон длиной 14 - 20 мм, диаметром 5 - 7 мм, гладкие, белые, покрытые в большинстве случаев темными комочками фекалий и остатками корма.

Длина куколок самки составляет 15 мм, а длина самца - 13 мм, в начале развития имеет светло-соломенный цвет до темно-коричневого в конце. С наступлением темноты имаго перемещаются к деревьям и распространяются по всей массе листвы на высоте более 10 метров, оплодотворенные самки слетают с деревьев и пытаются проникнуть в ульи. Самки выбирают в основном пчелиные семьи, чтобы отложить яйца. На одну семью может приходиться 7-12 особей моли. Взрослые особи перемещаются вдоль сот, и когда они находят подходящее место для откладки яиц, начинают сильно вибрировать антеннами. Яйца откладывают отдельными порциями на стенку улья со свежей пылью, на частично закрытые соты, часто в узких отверстиях (до 0,2 мм) в рамках и стенках, на любых внешних поверхностях, под крышкой.

За час до рассвета имаго большая восковая моль покидает улей и летит обратно к деревьям, где ведут неподвижный образ жизни.

Кладка яиц при температуре окружающего воздуха свыше 22 - °С продолжается в течении 4 ночей. За свою жизнь самка откладывает от 500 до 900 яиц, но отдельные особи могут отложить до 1800 яиц (Коновалова Т.В. и др., 2011).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методика содержания и выращивания биомассы восковой моли

G. mellonella

В лаборатории кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» большую восковую моль содержали в садках (деревянных ящиках, размером

35×15×10 см, с пластиковой крышкой, размером 35×13×3 см, в которой просверлены отверстия диаметром 1 мм) (Рисунок 5), в которые помещали питательную среду (Таблица 1) и пчелиный воск.



Рисунок 5 – Садок для разведения личинок *G. mellonella*

Садок для содержания имаго восковой моли представлял собой герметичный контейнер из древесины с плотно закрывающейся верхней частью, и при необходимости сдвигающейся прозрачной крышкой из оргстекла с многочисленными вентиляционными отверстиями маленького диаметра, обеспечивающими достаточное количество воздуха для жизнедеятельности *G. mellonella*. Конструкция данного пенала позволяла максимально эффективно контролировать стадии развития восковой моли, наличие корма для нее без лишней необходимости тревожить насекомых. Культивировали личинок большой восковой моли до стадии окукливания.

Для разведения *G. mellonella* применяли следующее оборудование и расходные материалы:

- садок (деревянный пенал с крышкой из оргстекла с отверстиями);
- комнатно-уличный термометр ТМ-1011;
- емкости для хранения личинок;
- опилки;
- субстрат для взрослых особей из смеси пчелиного воска, глицерина, меда, кукурузной и пшеничной муки, дрожжей, зерновых отрубей, воды);

- пинцеты для отделения личинок.

Таблица 1 – Оптимальная рецептура питательной среды для выращивания личинок большой восковой моли *G. mellonella*

Наименование компонентов среды	Количество компонентов среды по массе, %
Мед	25,00
Пчелиный воск	25,00
Глицерин	10,00
Кормовые дрожжи	10,00
Пшеничные отруби	20,00
Дистиллированная вода	10,00
Итого	100,00

Для проведения исследований в лаборатории кафедры был оборудован специальный инсектарий, в котором стабильно поддерживался температурный режим на уровне от 28 до 35 °С без проникновения солнечного света и относительная влажность воздуха составляла от 70 до 80 %. Помещение инсектария оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией.

2.2.2. Методика содержания и выращивания биомассы *M. domestica*

Нами была проведены испытания по выведению популяции мух адаптированной к массовому культивированию в лабораторных условиях. Имаго *M. domestica* содержали в специальных садках, оборудованных в инсектарии кафедры, где стабильно поддерживалась температура воздуха около 27 – 30 °С и относительная влажность 70 %. В помещении инсектария была оборудована приточно – вытяжная вентиляция. Для кормления *M. domestica* использовали

белковые и углеводные и корма. Поение, кормление и получение биомассы производили в садке.

2.2.3. Методика выделения водорастворимых пептидов из личинок

G. mellonella* и *M. domestica

Выделение водорастворимых пептидов, полученных из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica*, проводили методом холодной экстракции.

Методика включает следующие этапы:

1. Гомогенизация биомассы личинок;
2. экстракция;
3. центрифугирование;
4. высаливание сульфатом аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
5. повторное растворение;
6. высаливание сульфатом аммония.

Пробоподготовка. Экстракция водорастворимых пептидов из биомассы личинок.

Из биомассы личинок подготавливали навеску массой 3 г растирали в ступке с песком 5 г, перетирали 1-2 часа до однородной массы. Далее в процессе растирания добавляли по 0,5 мл азида натрия 0,25% и раствор фосфатно-солевого буфера (ФСБ) 20 мл перемешивали в течение 2 ч.

Образцы центрифугировали в течение 30 мин. при температуре 5 °С со скоростью 4200 об/мин. Наблюдали выпадение осадка, появление сверху (около 1 см) надосадка маслянистой консистенции (более светлого цвета относительно самой жидкости). Появившийся надосадок и осадок собирали и убирали в отдельные пробирки.

В надосадок добавляли по 5 мл раствора фосфатно-солевого буфера (ФСБ), перемешивали и ставили центрифугировать в течение 30 мин. при температуре 5°С со скоростью 4200 об/мин, собирали надосадок.

Для высаливания рассчитывали массу сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ следующим образом, на 100 мл раствора - 70 г вещества для получения 100% раствора; для 40% раствора необходимо 28 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2,8г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ постепенно добавляли к 10мл раствора (образца) в колбу, которая стояла на магнитной мешалке, добивались полного растворения соли. После полного растворения соли пробы убирали в морозилку на 14 часов или сразу центрифугировали при $(-5\text{ }^\circ\text{C})$ в течение 30 мин. Осадок представлял собой водорастворимые пептиды. Растворы помещали в новые пробирки, высаливали 20% от насыщения сульфатом аммония из расчета 14 г на 100мл. После полного растворения соли образцы центрифугировали в течение 40 мин. при $t = -4\text{ }^\circ\text{C}$ со скоростью 4200 об/мин. (Общая концентрация соли 60%)

Осадок собирали в отдельную пробирку, а надосадок высаливали 20% от насыщения сульфатом аммония из расчета 14 г на 100мл. После полного растворения соли образцы центрифугировали в течение 40 мин. при $t = -4\text{ }^\circ\text{C}$ со скоростью 4200 об/мин. (Общая концентрация соли 80%.)

Осадок собирали в отдельную пробирку, а в надосадок высаливали 20% от насыщения сульфатом аммония из расчета 14 г на 100 мл. После полного растворения соли образцы центрифугировали в течение 40 мин. при $t = -4\text{ }^\circ\text{C}$ со скоростью 4200 об/мин (Общая концентрация соли 100%).

Осадок собирали в отдельную пробирку, а надосадок выливали. Все образцы после центрифугирования замораживали для последующих манипуляций.

2.2.4. Методика разделения водорастворимых пептидов методом ВЭЖХ

Полученные фракции были проанализированы и разделены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение, и определение производилось методом ВЭЖХ с предварительным поиском оптимального набора растворителей и условий для проведения хроматографирования.

Предварительно, до хроматографического разделения в образцы добавляли небольшое количество раствора ФСБ для растворения осадка, и только потом раствор вкалывали в хроматограф.

Для выполнения данной работы, колонкой для проведения ВЭЖХ была выбрана следующая модель: BioSep S2000 300x2120 мм. Разделение проводилось на длине волны равной 280 нм, при объеме петли 1575 мкл, элюентом был выбран 0,1 М фосфатный буферный солевой раствор (ФСБ).

Анализ осуществляли в следующих условиях:

1. Температура колонки 25 °С.
2. Объем вводимой пробы - 20 мкл.
3. Скорость потока - 1,0 мл/мин.

По 20 мкл исследуемого раствора с помощью микрошприца вводят в хроматографическую колонку. Время анализа для одной пробы занимает 60 мин, поток 1 мл/мин.

2.2.5. Определение содержания белка и молекулярной массы выделенных пептидов

Содержание белка в испытуемых образцах определяли по методу Лоури (Lowry O.H. et al., 1951). Для построения калибровочной кривой используют бычий альбумин. Для каждого вновь приготовленного реактива Фолина строили новый калибровочный график.

Концентрацию белка анализируемых фракций определяли колориметрическим методом по Лоури на спектрофотометрическом оборудовании фирмы «ShimadzuUV-1280» 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 и блока питания BIO-RAD (Schagger H. et al., 1987).

2.2.6. Методика определения антимикробной активности

Антибактериальную активность определяли согласно методике МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания (МУК 4.2.1890-04, 2004). Изучение антибактериальной активности проводили макро- и микрометодом.

Кроме этого использовали методику ОФС.1.2.4.0010.15. Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар.

В исследованиях использовали следующие культуры микроорганизмов: *S. aureus* ATCC 6538 (209-P); *S. typhimurium* 1626, которые были получены из государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора; *B. cereus* ATCC 11778, предоставленный ФГУ ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»; *C. albicans* РКПГУ-401/НСТС-885-65, *E. coli* 1027, полученные из лаборатории «Российская коллекция патогенных грибов» ГБОУ ВПО Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России.

2.2.7. Изучение биотрансформации пептидов в тканях и органах белых мышей

Исследования проводили на базе центра коллективного пользования «Симбиоз» с применением научного оборудования в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (г. Саратов).

Этап 1. Полученные нами из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica* антимикробные пептиды высаливали сульфатом аммония, затем проводили диализ против фосфатно-солевого буфера. Затем полученные пептиды лиофильно высушивали при помощи лиофильной сушки марки CoolSafe 55-4 System.

Этап 2. Затем проводили конъюгирование антимикробных пептидов с флуорисцеин изотиоционатом (ФИТЦ) по следующей методике: перед

маркировкой раствора АМП с концентрацией белка 15 мг/мл проводили его диализ в течение 10 часов при температуре 4 °С против карбонат-бикарбонатного буфера. При этом на 1 грамм белка расходовали 12,5 мг флуоресцентного красителя (ФИТЦ), таким образом, достигалось оптимальное соотношение красителя и белка. При постоянном помешивании к раствору АМП медленно, по каплям, добавляли раствор красителя ФИТЦ. Для приготовления красителя 1 мг ФИТЦ растворяли в 2 мл 0,1 М Na₂HPO₄. Процесс конъюгирования проводили в течение 18 часов при температуре 4 °С в темноте, затем избыток красителя удаляли гель-фильтрацией на колонке ПД-10, уравновешенной фосфатно-солевым буфером. Раствор, который содержал меченые АМП и свободный краситель, аккуратно наносили на колонку, которую промывали ФСБ. Меченые антимикробные пептиды двигались через сефадекс быстрее, чем свободный краситель, и при прохождении через колонку были визуализированы в виде окрашенной полосы на ПД-10.

Объектом исследования служили белые нелинейные мыши (n = 10), массой 20 г. Первым пяти мышам (n = 5) антимикробные пептиды, меченые ФИТЦ, вводили внутримышечно в область бедра в дозе 100 мкл, оставшимся мышам (n = 5) препарат вводили внутрибрюшинно в дозе 100 мкл. Спустя сутки методом транслокации шейных позвонков под эфирным наркозом проводили эвтаназию. После чего были взяты мазки-отпечатки почки, печени, селезенки, костного мозга и мазок крови.

Микроскопирование мазков-отпечатков проводили на флуоресцентном микроскопе «Leica DMi 3000B» с применением ультрафиолетового фильтра. Анализ и поиск поля зрения изображения достигался при помощи видеокамеры Leica DFC420C, а также программного обеспечения Leica Application Suite.

2.3. Результаты исследований и их обсуждение

2.3.1. Выделение пептидов, полученных из личинок *G. mellonella* и *M. domestica*

Таким образом, по разработанной нами оригинальной методике было получено 46 фракций водорастворимых пептидов из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica*.

2.3.2. Разделение водорастворимых пептидов методом ВЭЖХ и изучение их физико-химических свойств

Предварительно для качественного разделения пептидов были проведены эксперименты подбора оптимальных условий разделения водорастворимых пептидов. Полученные фракции были проанализированы и разделены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Известны методы разделения водорастворимых пептидов методом ВЭЖХ с применением в качестве элюента додецилсульфата натрия (SDS) 0,1 % и 1 ммоль/л азиды натрия. Поэтому для исследования возможности получения пептидов из биомассы личинок *G. mellonella* было проведено разделение водорастворимых пептидов методом ВЭЖХ. В качестве элюента использовали SDS 0,1 % и 1 ммоль/л азиды натрия при скорости потока 1 мл/мин при 214 нм.

Во время данных исследований было установлено, что использование длины волны в 214 нм является менее эффективным, чем 280 нм, что можно объяснить высокой оптической плотностью всех органических соединений и высоким уровнем шумов в связи с использованием воды в качестве основного компонента элюента. Кроме этого данный способ разделения пептидов не позволяет набирать их в препаративном количестве, а является только аналитическим методом определения их содержания и соотношения. Так как SDS разрушает белки, а азид натрия обладает антибактериальным действием, что затрудняет и требует дополнительных работ по очистке образцов для исследований на антимикробную активность полученных после

хроматографирования образцов.

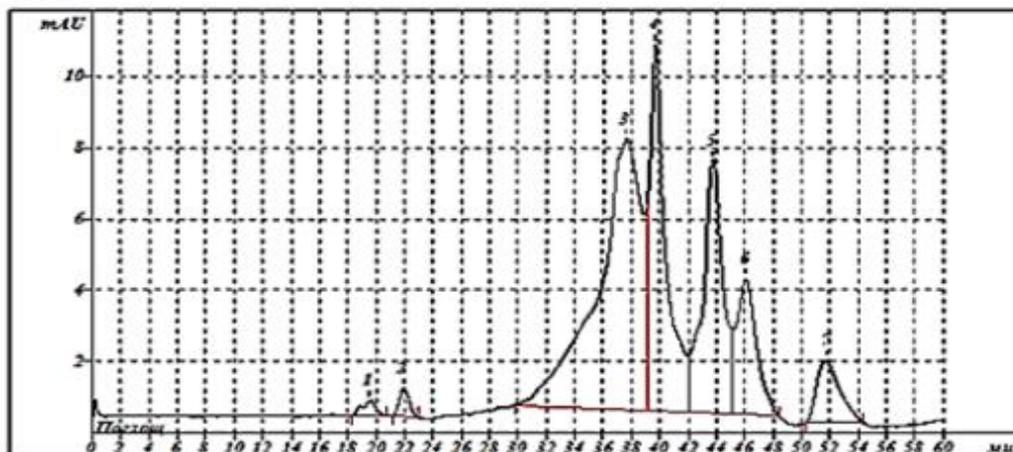
Для устранения недостатков, связанных с применением SDS и азидата натрия для разделения водорастворимых пептидов проводили с использованием колонки SEC S-2000 300 × 2120 мм фирмы BioSep при скорости потока 1 мл/мин и длине волны 280 нм с применением в качестве подвижного растворителя 0,1 М фосфатно-солевого буферного раствора, время хроматографирования составляло 60 минут, объем вводимой пробы 1575 мкл и температуре колонки 25 °С. Данная скорость потока является оптимальной для разделения пептидов, полученных из биомассы личинок. Уменьшение скорости потока подвижной фазы не приводит к лучшему разделению фракций, однако, увеличивает время анализа, а увеличение скорости потока приводит к объединению фракций.

Таким образом, используя метод разделения пептидов, с применением в качестве элюента фосфатно-солевого буфера, получали фракции водорастворимых пептидов, которые использовали в дальнейших исследованиях.

ПРОБА: Длина волны 280 нм
 Пробирка №: 1
 Объем: 20.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00

КОЛОНКА: Bio Sep S-2000 300x7.80 мм
 Размер: 2.0x300 мм

ПОШВИЖНАЯ ФАЗА А: 0.1 М PBS .025 % азид натрия pH 6,8
 Скорость подачи: 2.00 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Метод расчета: Заказной
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Высота mAU	Площадь mAU*сек	K'	Разрешение n, n+1	TТ	Конц. мкг/мл
1	19.56	0.43	29.35	0.00	1.37	1608	1.467
2	21.88	0.77	38.19	0.00	4.81	4379	1.909
3	37.72	7.61	1644.01	0.00	0.57	686	82.2
4	39.75	10.26	823.04	0.00	2.05	5543	41.15
5	43.8	7.10	706.78	0.00	0.88	4343	35.34
6	46.07	3.80	367.15	0.00	1.87	5147	18.36
7	51.72	1.74	196.87	0.00	0.00	4711	9.843
7	60.01	31.70	3805.37	0.00		3774	190.3

КОММЕНТАРИЙ

Отчет выдан программой МультиХром
 © 1993-2008 ЗАО Асперсенд

Рисунок 6 – Хроматограмма белковых фракций, выделенных из биомассы личинки *G. mellonella* на стадии до окукливания

Хроматографический выход белковой фракции № 1 составил 0,77 %, при времени удерживания 19,56 минуты; № 2 – 1,04 %, при времени удерживания 21,88 минуты; № 3 – 43,21 %, при времени удерживания 37,72 минуты; № 4 – 21,63 %, при времени удерживания 39,75 минуты; № 5 – 18,55 %, при времени удерживания 43,8 минут; № 6 – 9,65 %, при времени удерживания 46,07 минут; № 7 – 5,15 %, при времени удерживания 51,72 минуты (Таблица 2).

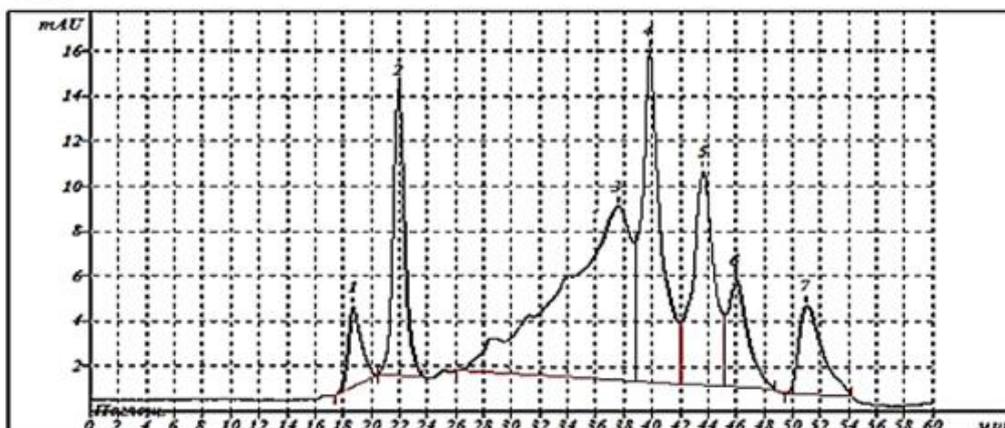
Таблица 2 – Хроматографический выход белковых фракций, полученных из биомассы личинок *G. mellonella*, %

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Площадь пика, mAU · сек	Хроматографический выход, %
1	19,56	29,35	0,77
2	21,88	38,19	1,04
3	37,72	1644,01	43,21
4	39,75	823,04	21,63
5	43,80	706,78	18,55
6	46,07	367,15	9,65
7	51,72	196,87	5,15
Сумма		3805.37	100,00

Таблица 3 – Концентрация белка в полученных фракциях (Рисунок 6), мг/мл

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл
1	19,56	1	52,56±0,43
2	21,88	0,8	73,49±0,36
3	37,72	9	11,26±0,21
4	39,75	3	35,6±0,18
5	43,8	3	39,23±0,26
6	46,07	3	41,27±0,79
7	51,72	3,9	35,64±0,87

ПРОБА:
 Длина волны 280 нм
Пробирка №: 1
Объем: 20.0 мкл
Разведение: 1.00
Количество: 1.00
КОЛОНКА: Bio Sep S-2000 300x7.80 мм
Размер: 2.0x300 мм
ПОПВИКНАЯ ФАЗА А: 0.1 М PBS .025 % азид натрия pH 6,8
Скорость подачи: 2.00 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА
 Метод расчета: Заказной
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Высота mAU	Площадь mAU*сек	K'	Разрешение n, n+1	TТ	Конц. мкг/мл
1	18.75	3.54	227.45	0.00	2.14	1911	11.37
2	21.94	12.66	742.31	0.00	3.35	3164	37.12
3	37.63	7.70	2669.49	0.00	0.45	266	133.5
4	39.84	14.69	1373.62	0.00	1.78	4101	68.68
5	43.69	9.46	1020.41	0.00	0.85	3711	51.02
6	46	4.72	472.71	0.00	1.70	4776	23.64
7	51.06	3.92	457.75	0.00	0.00	4307	22.89
7	60.01	56.69	6963.74	0.00		3176	348.2

Отчет выдан программой МультиХром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсенд

Рисунок 7 – Хроматограмма белковых фракций, выделенных из биомассы личинки *G. mellonella* на стадии окукливания

Хроматографический выход белковой фракции № 1 составил 3,27 %, при времени удерживания 18 минут; № 2 – 10,66 %, при времени удерживания 21 минута; № 3 – 38,33 %, при времени удерживания 37 минут; № 4 – 19,73 %, при времени удерживания 39 минут; № 5 – 14,65 %, при времени удерживания 43 минуты; № 6 – 6,79 %, при времени удерживания 46 минут; № 7 – 6,57 %, при времени удерживания 51 минута (Таблица 4).

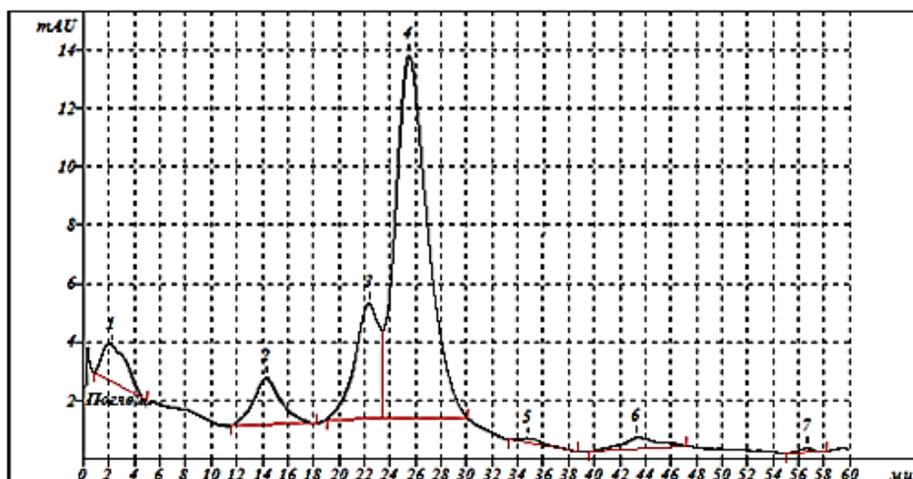
Таблица 4 – Хроматографический выход белковых фракций, полученных из биомассы личинок *G. mellonella*, %

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Площадь пика, mAU · сек	Хроматографический выход, %
1	18,75	227,45	3,27
2	21,94	742,31	10,66
3	37,63	2669,49	38,33
4	39,84	1373,62	19,73
5	43,69	1020,41	14,65
6	46,00	472,71	6,79
7	51,06	457,75	6,57
Сумма		6963,74	100,00

Таблица 5 – Концентрация белка полученных белковых фракций (Рисунок 7), мг/мл

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл
1	18,75	2	25,35±0,31
2	21,94	4	14,83±0,12
3	37,63	13	7,83±0,21
4	39,84	3	35,9±0,39
5	43,69	3	39,37±0,37
6	46,00	4,5	27,64±0,11
7	51,06	4	34,51±0,09

ПРОБА:
 обр4 3фракция
Пробирка №: 1
Объем: 1575.0 мкл
Разведение: 1.00
Количество: 1.00
КОЛОНКА: Bio Sep S-2000 300x2120 мм
Размер: 2.0x300 мм
ПОЛВИЖНАЯ ФАЗА А: 0.1 М ФСВ
Скорость подачи: 1.00 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА
 Метод расчета: Заказной
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Высота mAU	Площадь mAU*сек	K'	Разведение n, n+1	TI	Конц. мкл/мл
1	2.15	1.26	170.32	0.00	3.13	6	0.1081
2	14.27	1.61	240.26	0.00	2.14	203	0.1525
3	22.35	3.93	524.57	0.00	0.75	630	0.3331
4	25.52	12.42	2212.25	0.00	2.27	464	1.405
5	34.87	0.14	21.03	0.00	2.23	1259	0.01335
6	43.46	0.37	74.91	0.00	4.26	1048	0.04756
7	56.65	0.13	10.11	0.00	0.00	13203	0.006417
7	60.01	19.86	3253.44	0.00		2402	2.066

Рисунок 8 – Хроматограмма белковой фракции 2, выделенной из биомассы личинок *G. mellonella*

Хроматографический выход белковой фракции № 2.1 составил 5,24 %, при времени удерживания 2,15 минут; № 2.2 – 7,38 %, при времени удерживания 14,27 минут; № 2.3 – 16,12 %, при времени удерживания 22,35 минут; № 2.4 – 68 %, при времени удерживания 25,52 минуты; № 2.5 – 0,65 %, при времени удерживания 34,87 минут; № 2.6 – 2,30 %, при времени удерживания 43,46 минут; № 2.7 – 0,31 %, при времени удерживания 56,65 минут (Таблица 6).

Таблица 6 – Хроматографический выход белковых фракций, полученных из биомассы личинок *G. mellonella*, %

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Площадь пика, mAU · сек	Хроматографический выход, %
2.1	2,15	170,32	5,24
2.2	14,27	240,26	7,38
2.3	22,35	524,57	16,12
2.4	25,52	2212,25	68,00
2.5	34,87	21,03	0,65
2.6	43,46	74,91	2,30
2.7	56,65	10,11	0,31
Сумма		3253,44	100,00

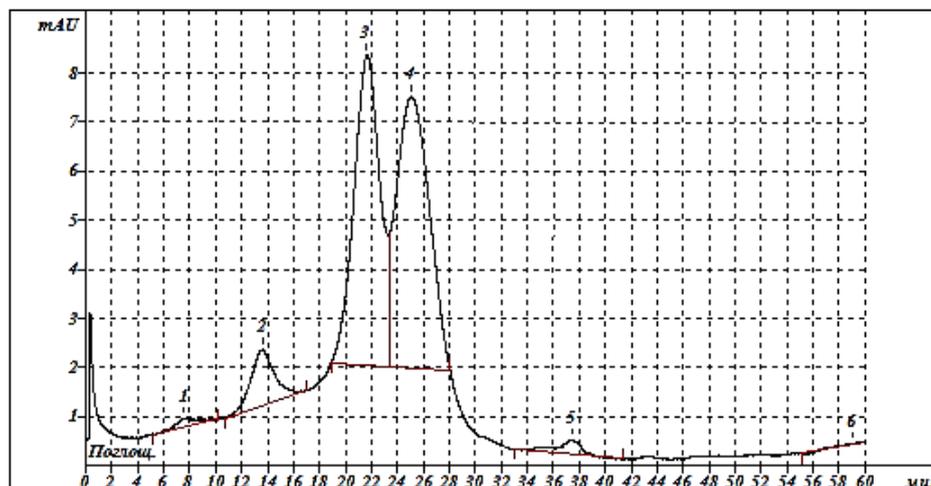
Таблица 7 – Концентрация белка полученных белковых фракций (Рисунок 8), мг/мл

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл
2.1	2,15	3	6,98±0,19
2.2	14,27	4	7,39±0,21
2.3	22,35	4	16,12±0,11
2.4	25,52	6	45,33±0,14
2.5	34,87	1	2,59±0,09
2.6	43,46	2	4,61±0,08
2.7	56,65	1	1,24±0,05

ПРОБА: обр1 3 фракция
 Пробирка №: 1
 Объем: 1575.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00

КОЛОНКА: Bio Sep S-2000 300x2120 мм
 Размер: 2.0x300 мм

ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А: 0.1 М ФСБ
 Скорость подачи: 1.00 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Метод расчета: Заказной
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Высота mAU	Площадь mAU*сек	K'	Разрешение n, n+1	TТ	Конц. мкг/мл
1	7.634	0.18	18.10	0.00	2.27	127	0.01149
2	13.58	1.13	139.46	0.00	2.42	273	0.08854
3	21.67	6.32	879.51	0.00	0.76	546	0.5584
4	25.06	5.52	971.21	0.00	3.18	458	0.6166
5	37.43	0.29	39.11	0.00	4.94	1742	0.02483
6	59	-0.00	0.28	0.00	0.00	79	0.0001751
6	60.01	13.44	2047.67	0.00		538	1.3

Отчет выдан программой Мультихром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсенд

Рисунок 9 – Хроматограмма белковой фракции 3, выделенной из биомассы личинок *G. mellonella*

Хроматографический выход белковой фракции 3.1 составил 0,88 %, при времени удерживания 7,63 минуты; № 3.2 – 6,81 %, при времени удерживания 13,58 минут; № 3.3 – 42,95 %, при времени удерживания 21,67 минут; № 3.4 – 47,43 %, при времени удерживания 25,06 минут; № 3.5 – 1,91 %, при времени удерживания 37,43 минуты; № 3.6 – 0,01 %, при времени удерживания 59 минут (Таблица 8).

Таблица 8 – Хроматографический выход белковых фракций, полученных из биомассы личинок *G. mellonella*, %

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Площадь пика, mAU · сек	Хроматографический выход, %
3.1	7,63	18,10	0,88
3.2	13,58	139,46	6,81
3.3	21,67	879,51	42,95
3.4	25,06	971,21	47,43
3.5	37,43	39,11	1,91
3.6	59,00	0,28	0,01
Сумма		2047,67	100,00

Таблица 9 – Концентрация белка полученных белковых фракций (Рисунок 9), мг/мл

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл
3.1	7,634	2	2,65±0,09
3.2	13,58	4	10,22±0,11
3.3	21,67	5	51,54±0,12
3.4	25,06	3	94,86±0,21
3.5	37,43	2	5,73±0,08
3.6	59	2	0,04±0,03

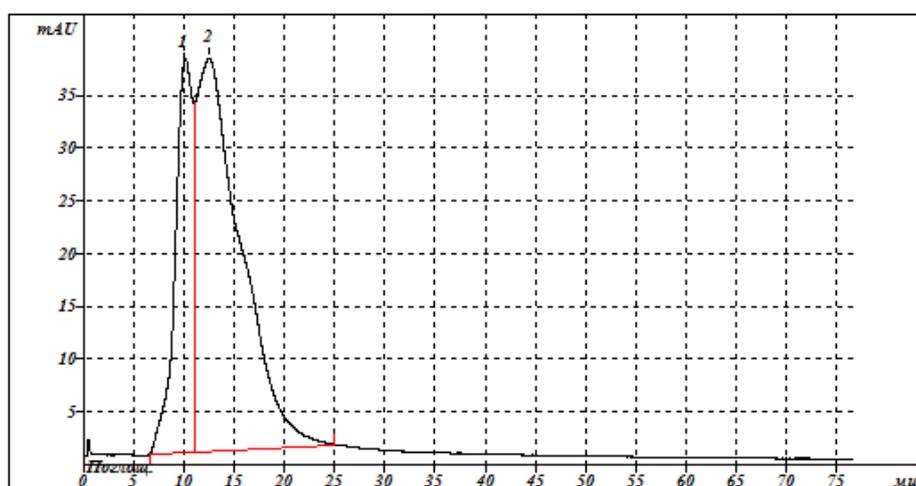
Дата: 24/10/2017 12:24:56
 Автор отчета: 11
 Хроматограмма: Ремизов Моль белок 4 20 мг/мл
 Дата запуска: 18/09/2017 13:13:23
 Файл: с:\Ярослав\ВЭЖХ\Белки\Розовый белок\170918131323
 Дата записи: 18/09/2017 18:04:32 Изменен! Пики вручную!
 Метод: UV-104 ДАФС-
 Дата записи: 18/09/2017 13:10:09
 Оператор анализа: 11
 Номер анализа: 2337

 ПРОБА: 4

 Пробирка №: 1
 Объем: 20.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00

 КОЛОНКА: BioSep SEC S-2000
 Размер: 2.0x60 мм

 ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А:
 Скорость подачи: 1.00 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Метод расчета: Абсолютная концентрация
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь mAU*сек	Площадь %	Название
1	9.925	4624.66	28.98	
2	12.48	11332.36	71.02	
2	76.75	15957.01	100.00	

Отчет выдан программой Мультихром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсенд

Рисунок 10 – Хроматограмма белковой фракции 4, выделенной из биомассы личинок *G. mellonella*

Хроматографический выход белковой фракции № 4.1 составил 28,98 %, при времени удерживания 9,93 минуты; № 4.2 – 71,02 %, при времени удерживания 12,48 минут (Таблица 10).

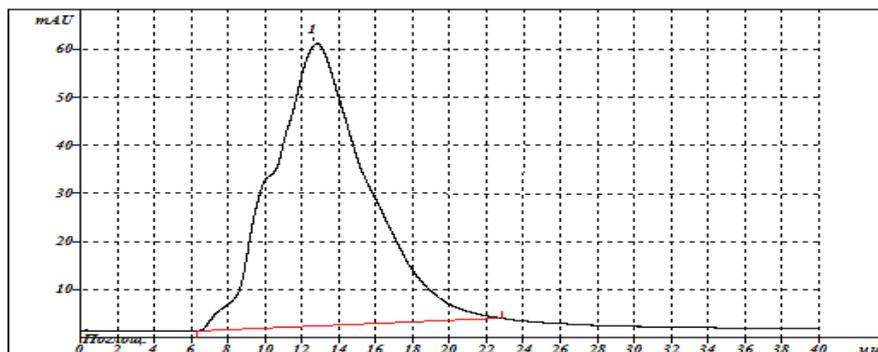
Таблица 10 – Хроматографический выход белковых фракций, полученных из биомассы личинок *G. mellonella*

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Площадь пика, mAU · сек	Хроматографический выход, %
4.1	9,93	4624,66	28,98
4.2	12,48	11332,36	71,02
Сумма		15957,02	100,00

Таблица 11 – Концентрация белка полученных белковых фракций (Рисунок 10), мг/мл

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл
4.1	9,93	5	23,19±0,89
4.2	12,48	14	20,29±1,11

Дата: 24/10/2017 12:29:41
 Автор отчета: 11
 Хроматограмма: Ремизов Моль белок 6 20 мг/мл
 Дата запуска: 18/09/2017 15:27:07
 файл: с:\Ярослав\ВЭЖ\Белки\Розовый белок\170918152707
 Дата записи: 18/09/2017 18:17:50 Изменен! Пики вручную!
 Метод: UV-104 ДАФС-
 Дата записи: 18/09/2017 15:26:09
 Оператор анализа: 11
 Номер анализа: 2339
 ПРОБА: 6
 Пробирка №: 1
 Объем: 20.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00
 КОЛОНКА: BioSep SEC S-2000
 Размер: 2.0x60 мм
 ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А:
 Скорость подачи: 1.00 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА
 Метод расчета: Абсолютная концентрация
 Стандарт: Нет

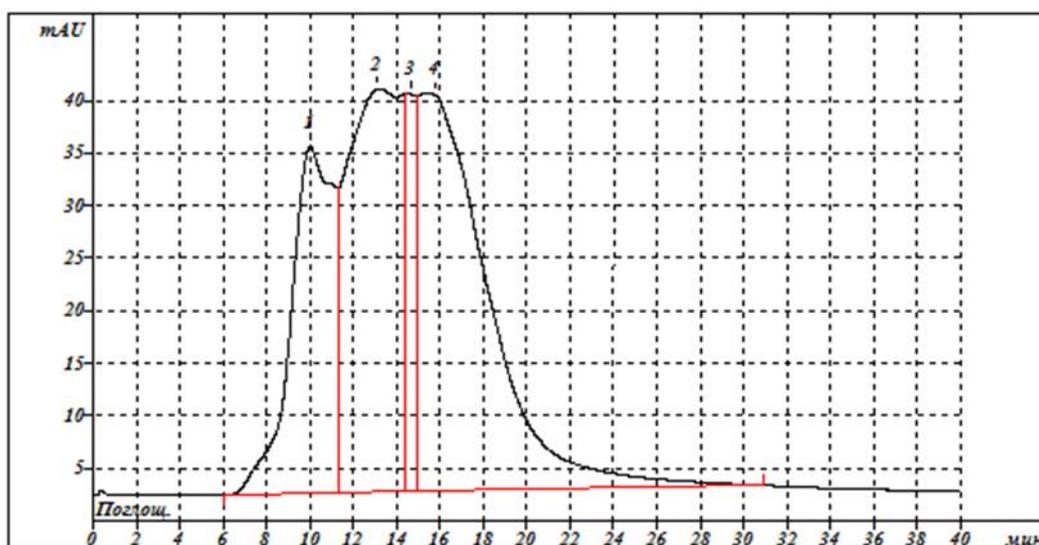
№	Время мин	Площадь mAU*сек	Площадь %	Название
1	12.82	20897.49	100.00	

Отчет выдан программой МультиХром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсенд

Рисунок 11– Хроматограмма белковой фракции б.1, выделенной из биомассы личинок *G. mellonella*

При хроматографировании была выделена одна фракция в объеме 15 мл и с концентрацией белка $26 \pm 1,11$ мг/мл.

Дата: 24/10/2017 12:23:09
 Автор отчета: 11
 Хроматограмма: Ремизов Моль белок 2 20 мг/мл
 Дата запуска: 18/09/2017 12:02:49
 файл: с:\Ярослав\ВЭЖХ\Белки\Розовый белок\170918120249
 Дата записи: 18/09/2017 18:17:54 Изменен! Пики вручную!
 Метод: UV-104 ПАФС-
 Дата записи: 18/09/2017 11:59:32
 Оператор анализа: 11
 Номер анализа: 2336
 ПРОБА: 2
 Пробирка №: 1
 Объем: 20.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00
 КОЛОНКА: BioSep SEC S-2000
 Размер: 2.0x60 мм
 ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А:
 Скорость подачи: 1.00 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Метод расчета: Абсолютная концентрация
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь mAU*сек	Площадь %	Название
1	10.02	4478.78	21.47	
2	13.19	6643.15	31.84	
3	14.68	1285.46	6.16	
4	15.78	8454.91	40.53	
4	40	20862.30	100.00	

Отчет выдан программой МультХром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсэнд

Рисунок 12– Хроматограмма белковой фракции 1 (*G. mellonella*)

Хроматографический выход белковой фракции 1.1 составил 21,47 %, при времени удерживания 10,02 минуты; № 1.2 – 31,84 %, при времени удерживания

13,19 минуты; № 1.3 – 6,16 %, при времени удерживания 14,68 минуты; № 1.4 – 40,53 %, при времени удерживания 15,78 минут (Таблица 12).

Таблица 12 – Хроматографический выход белковых фракций, полученных из биомассы личинок *G. mellonella*, %

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Площадь пика, mAU · сек	Хроматографический выход, %
1.1	10,02	4478,78	21,47
1.2	13,19	6643,15	31,84
1.3	14,68	1285,46	6,16
1.4	15,78	8454,91	40,53
Сумма		20863,30	100,00

Таблица 13 – Концентрация белка полученных белковых фракций (Рисунок 12), мг/мл

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл
1.1	10,02	5	0,33±0,09
1.2	13,19	3	0,83±0,05
1.3	14,68	0,5	0,94±0,1
1.4	15,78	11	0,28±0,08

Экстракция водорастворимых пептидов из личинок *M. domestica* осуществлялась по вышеописанному методу. Полученные фракции были разделены и проанализированы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением в качестве элюента ФСБ.

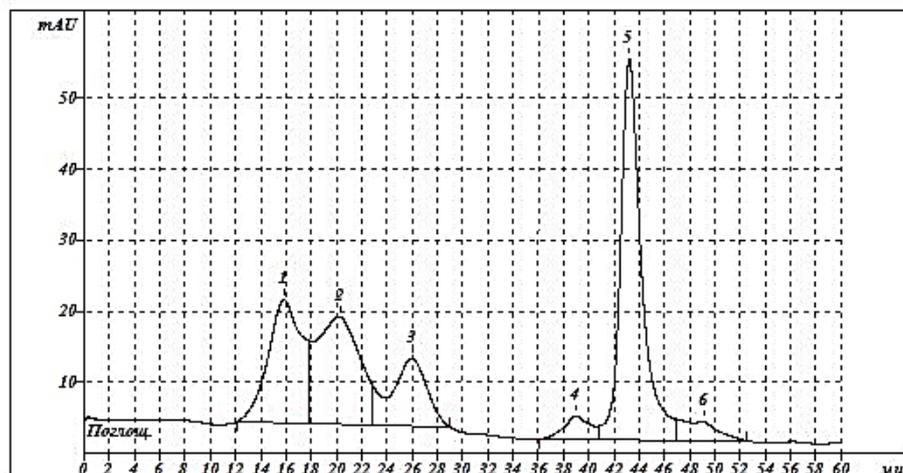
По результатам эксперимента нами были отделены следующие фракции пептидов (Рисунок 13, Таблица 14, 15).

ПРОБА:

Пробирка №: 1
 Объем: 1575.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00

КОЛОНКА: BioSep SEC 2000 3000x2120
 Размер: 2.0x300 мм

ПОЛВИЖНАЯ ФАЗА А: 0.1 М ФСБ
 Скорость подачи: 1.00 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Метод расчета: Заказной
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Высота mAU	Площадь mAU*сек	K'	Разрешение n, n+1	ТТ	Конц. мкг/мл
1	15.85	17.31	3239.77	0.00	0.60	162	2.057
2	20.2	15.14	3574.26	0.00	0.90	164	2.269
3	25.98	9.45	1892.03	0.00	2.99	381	1.201
4	38.96	3.26	476.09	0.00	1.29	1612	0.3023
5	43.23	53.61	6188.91	0.00	1.34	3176	3.929
6	49.02	2.70	563.49	0.00	0.00	1186	0.3578
6	60.01	101.47	15934.54	0.00		1114	10.12

Отчет выдан программой МультИХром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсэнд

Рисунок 13— Хроматограмма пептидов, выделенных из личинок *M. domestica*

Хроматографический выход белковой фракции № 1 составил 20,33 %, при времени удерживания 15,85 минуты; № 2 – 22,43 %, при времени удерживания 20,20 минуты; № 3 – 11,87 %, при времени удерживания 25,98 минуты; № 4 – 2,99 %, при времени удерживания 38,96 минуты; № 5 – 38,84 %, при времени удерживания 43,23 минуты; № 6 – 3,54 %, при времени удерживания 49,02 минуты (Таблица 14).

Таблица 14 – Хроматографический выход белковых фракций из биомассы личинки *M. domestica*, %

№ п/п	tR - время удерживания, мин	Площадь пика, mAU*сек	Хроматографический выход, %
1	15,85	3239,77	20,33
2	20,20	3574,26	22,43
3	25,98	1892,03	11,87
1	2	3	4
4	38,96	476,09	2,99
5	43,23	6188,91	38,84
6	49,02	563,49	3,54
	Сумма	15934,55	100

Таблица 15 – Концентрация белка полученных белковых фракций (Рисунок 13), мг/мл

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл
1	15,85	6	20,33±0,45
2	20,20	4	33,65±0,65
3	25,98	4	17,81±0,78
4	38,96	5	3,59±0,91
5	43,23	6	38,84±0,31
6	49,02	5	4,24±0,15

После разделения пептидов, полученных из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica* проводили диализ на протяжении 24 часов против 0,9% раствора хлорида натрия. При изучении молекулярной массы, выделенных пептидов было выявлено, что она находилась в диапазоне 3,4-6 кДа.

2.3.3. Определение антимикробной активности макрометодом

Антимикробная активность полученных белковых фракций, выделенных из

биомассы личинок *G. mellonella* была изучена по отношению к ряду групп Грам +, Грам– микроорганизмов, а именно *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027.

По данным ВОЗ микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* принадлежат к первой критической группе, имеющей множественную лекарственную устойчивость среди трех «критических, высоких и средних» приоритетных групп, требующих разработки новых антибиотиков (Tacconelli, E. et al., 2017). Кроме этого, согласно, этого списка *S. aureus* относится к группе с высоким приоритетом селекции антибиотикорезистентности.

Следовательно, выбор некоторых штаммов, принадлежащих к данным группам, для проведения исследований на антибактериальную активность пептидов очевиден.

Первоначально, было проведено определение антимикробной активности пептидов *G. mellonella* на стадии до окукливания и после окукливания (см. Рисунок 6, 7).

Данный эксперимент проводили макрометодом с внесением белковых фракций в жидкую питательную среду. Для каждой культуры микроорганизмов и каждой концентрации эксперимент был выполнен в трех повторностях. По результатам исследований было выявлено, что белковая фракция № 3 имела антимикробную активность в концентрации 0,18 мг/л по отношению к *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P). Белковая фракция № 6 имела антимикробную активность в концентрации 0,111 мг/л по отношению ко всем группам исследуемых микроорганизмов (Таблица 16).

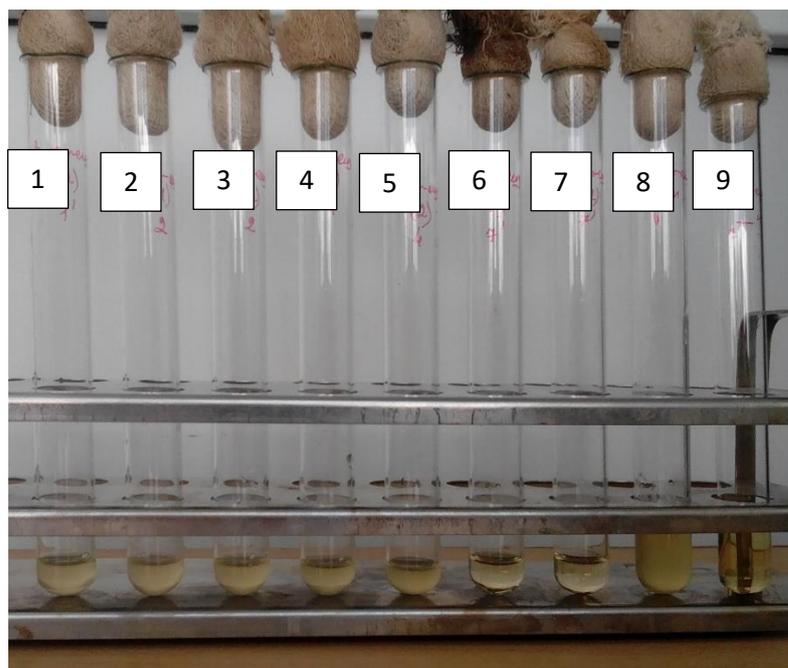
Аналогичные данные при исследовании антимикробной активности белковых фракций из биомассы личинок *G. mellonella* на стадии окукливания. Поскольку принципиальных отличий в антимикробной активности пептидов в зависимости от стадии развития личинок не было обнаружено, таким образом в дальнейших исследованиях этот факт не учитывали.

Таблица 16 – Антимикробная активность белковых фракций № 1 – 7
(*G. mellonella*)

Фракция белка	Штаммы микроорганизмов			
	<i>S. aureus</i> АТСС 6538 (209-Р)	<i>S.</i> <i>typhimurium</i> 1626	<i>C. albicans</i> РКПГУ– 401/НСТС– 885-653	<i>B. cereus</i> АТСС 10702
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	+	-	+	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	+	+	+	+
7	-	-	-	-

Примечание – ‘+’- бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов);
‘-’ – бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

Далее этим же методом были проанализированы следующие пептиды, выделенные из биомассы личинок *G. mellonella* № 2.1-2.7 и 3.1-3.7 (см. Рисунок 8, 9). Для данного эксперимента использовали культуры следующих штаммов: *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* АТСС 6538 (209-Р), *C. albicans* РКПГУ–401/НСТС–885-653, *B. cereus* АТСС 10702. Для каждой культуры микроорганизмов и каждой концентрации эксперимент был выполнен в трех повторностях. Пробирки помещали в термостат при температурном режиме 37 °С в течение 24 часов. По истечению времени производили учет результатов.



Примечание – Пептид №: 1) 2.1; 2) 2.2; 3) 2.4; 4) 2.5; 5) 2.7; 6) 2.3; 7) 2.6.

Пробирки: 8) «+»-контроль; 9) «-»-контроль.

Рисунок 14 – Изучение антимикробной активности пептидов 2.1-2.7 в отношении *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653

Таблица 17 – Антимикробная активность белковых фракций № 2.1 - 2.7 (*G. mellonella*)

Белковые фракции	Штаммы микроорганизмов			
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>C. albicans</i> РКПГУ– 401/NCTC– 885-653	<i>B. cereus</i> ATCC 10702
2.1	–	–	–	–
2.2	–	–	–	–
2.3	+	–	+	–
2.4	–	–	–	–
2.5	–	–	–	–
2.6	+	+	+	+
2.7	–	–	–	–

Примечание – ‘+’- бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов);

‘-’ – бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

В результате изучения антимикробной активности макрометодом было установлено, что пептиды № 2.3 и 2.6 ингибируют рост штамма *S. aureus*

АТСС 6538 (209-Р), пептид № 2.6 – *S. typhimurium* 1626. Пептиды № 2.3 и 2.6 обладают активностью по отношению к штамму *C. albicans* РКПГУ–401/НСТС–885-653, № 2.6 – *B. cereus* АТСС 10702. Антимикробная активность пептидов № 2.1; 2.2; 2.4; 2.5 и 2.7 не была выявлена (Таблица 17).

В результате изучения антимикробной активности пептидов 3.1-3.7 было установлено, что антимикробной активностью в отношении штамма *S. aureus* АТСС 6538 (209-Р) обладают пептиды № 3.4 и 3.6. Пептиды № 3.2 и 3.6 ингибируют рост штамма *S. typhimurium* 1626, пептиды № 3.3 и 3.6 – *C. albicans* РКПГУ–401/НСТС–885-653. В отношении штамма *B. cereus* АТСС 10702 антимикробную активность проявляют пептиды № 3.2, 3.6 и 3.7 (Таблица 18).

Таблица 18 – Антимикробная активность белковых фракций № 3.1 - 3.7
(*G. mellonella*)

Белковые фракции	Микроорганизмы			
	<i>S. aureus</i> АТСС 6538 (209-Р)	<i>S.</i> <i>typhimurium</i> 1626	<i>C. albicans</i> РКПГУ– 401/НСТС– 885-653	<i>B. cereus</i> АТСС 10702
3.1	–	–	–	–
3.2	–	+	–	+
3.3	–	–	+	–
3.4	+	–	–	–
3.5	–	–	–	–
3.6	+	+	+	+
3.7	–	–	–	+

Примечание – «+» - бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов);

«–» - бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

Антимикробную активность белковых фракций 1-6, выделенных из биомассы личинок *M. domestica* определяли аналогичным методом (см. Рисунок 13). Было выявлено, что белковая фракция 2 обладала антимикробной активностью по отношению *S. aureus* АТСС 6538 (209-Р), *S. typhimurium* 1626, *C. albicans* РКПГУ–401/НСТС–885-653, *B. cereus* АТСС 10702.

Таблица 19 – Антимикробная активность белковых фракций, выделенных из биомассы личинок *M. domestica*

Фракция белка	Микроорганизмы			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>	<i>B. cereus</i>
1	-	-	-	-
2	+	+	+	+
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-

Примечание – ‘+’- бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов);
‘-’ – бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

2.3.4. Определение антимикробной активности диффузным методом

На данном этапе исследований для определения антимикробной активности выделенных нами пептидов был использован метод диффузии препарата в агар.

Следует отметить, что нами были изолированы 4 белковых фракции из биомассы личинок *Galleria melonella* (см. Рисунок 12).

Антимикробную активность определяли на плотных питательных средах по отношению к *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *E. coli* 1027, *B. cereus* ATCC 10702, *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653. Результаты учитывались на 1, 2 и 3 сутки. Нами было установлено, что наиболее эффективно действовал пептид 1.2 на грамотрицательные микроорганизмы, а наиболее

эффективными концентрациями по отношению к грамположительным явились – 0,65 мг/л для *S. aureus* ATCC 6538(209-P) и 2.5мг/л для *B. cereus* ATCC 10702, где наблюдалась максимальная задержка роста бактерий.

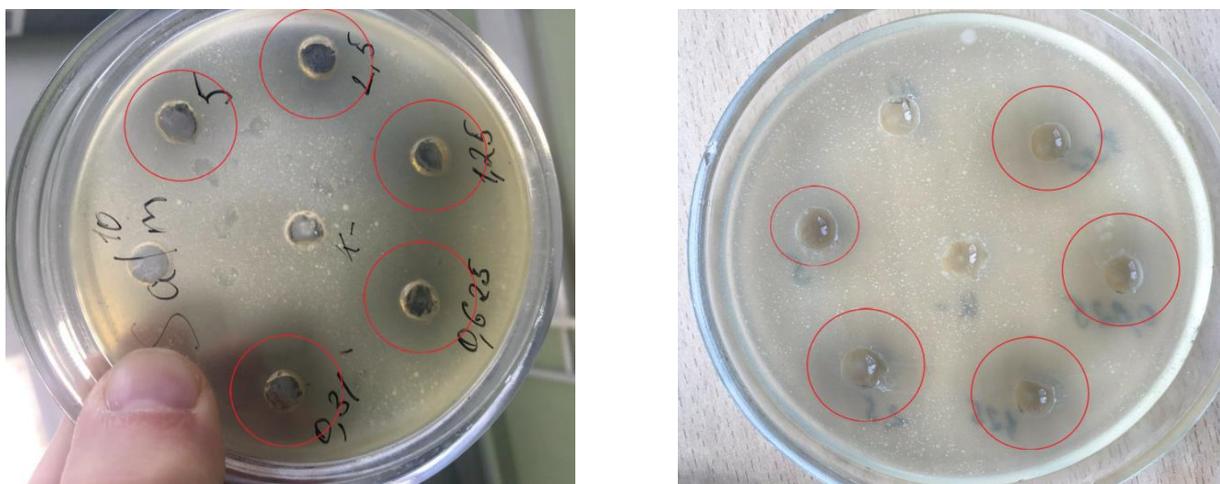


Рисунок 15– Изучение антимикробной активности пептида 1.2 в отношении *S. typhimurium* 1626

Для *S. typhimurium* 1626 (Рисунок 15) при концентрации пептида 1.2 - 1.25 мг/л результаты антимикробной активности были сопоставимы с некоторыми бета-лактамными антибиотиками на микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*. В представленной ниже таблице 20 отображены показатели данных полученных в результате эксперимента.

Таблица 20 – Зоны задержки роста микроорганизмов, мм

Концентрация	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>S. aureus</i> ATCC 6538(209-P)	<i>B. cereus</i> ATCC 10702
10мг/л	10±0,9	-	-
5мг/л	15±1,1	-	15±1,8
1	2	3	4
2.5мг/л	20±1,3	-	19±1,6
1.25мг/л	27±1,4	11±0,8	14±0,9
0.625мг/л	25±1,7	12±0,9	13±1
0.31мг/л	21±1	10±1,2	10±1,1

Таким образом, пептид 1.2 обладал антимикробной активностью в большей степени к штаммам *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702.

2.3.5. Определение антимикробной активности микрометодом

Для определения антимикробной активности микрометодом были использованы пептиды 4.1, 4.2 и 6.1, выделенные из личинок восковой моли (см. Рисунок 10, 11).

Для данного эксперимента использовали культуры *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538(209-P), *E. coli* 1027, *B. cereus* ATCC 10702.

В лунки планшетов вносили инокулюмы микроорганизмов, после чего к ним добавляли испытуемые пептиды в следующих концентрациях: 0,15; 0,31; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 мг/л. Для каждого штамма микроорганизмов и каждой концентрации, эксперимент выполнялся в трех повторностях. Заполненные планшеты укладывали в термостат при установке температуры 37 °С и через 24 часа производили учет.

В результате исследования было выявлено, что антимикробной активностью обладал пептид 4.2 (Рисунок 16). Анализируя полученные результаты можно заключить, что этот пептид 4.2 обладает высокой противомикробной активностью по отношению к *B. cereus* ATCC 10702, *S. typhimurium* 1626 в концентрации 0.625 мг/л, и сравнительно высокой по отношению к *E. coli* 1027 в концентрации 10 мг/л и не вызывает гибели *S. aureus* ATCC 6538(209-P) (Таблица 21).

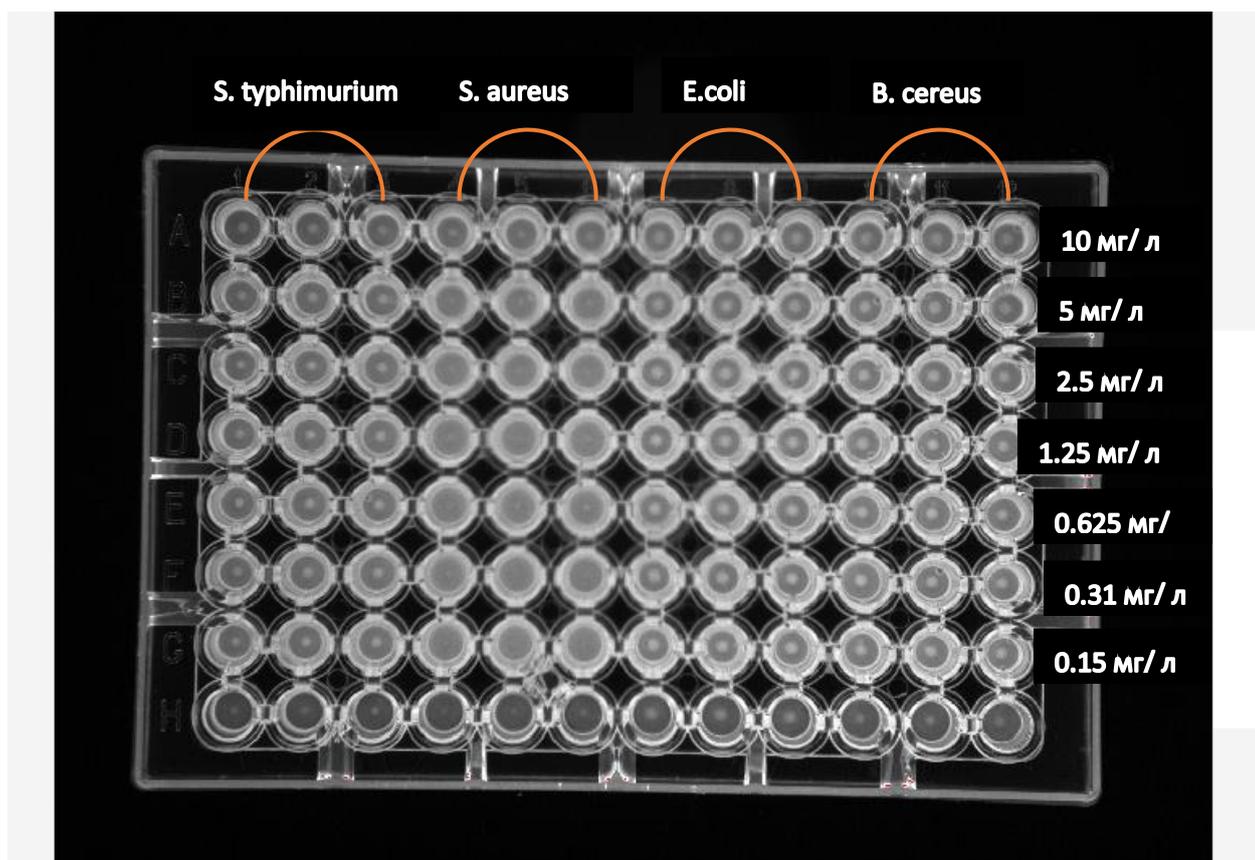


Рисунок 16– Антимикробная активность пептида 4.2

Как можно увидеть на рисунке 17, пептид № 6.1 высокоэффективен и ингибирует рост *B. cereus* ATCC 10702 в концентрации 0,625 мг/л. Однако способность ингибировать рост *S. typhimurium* 1626 у пептида 6.1 ниже, чем у пептида 4.2 и ограничена концентрацией 10мг/л. Что же касается *S. aureus* ATCC 6538(209-P), *E. coli* 1027 изученные нами концентрации пептида, под номером 6.1 не вызывают угнетения данного штамма, предположительно, что ингибирование данных штаммов возможно при более высокой концентрации АМП (Таблица 21).

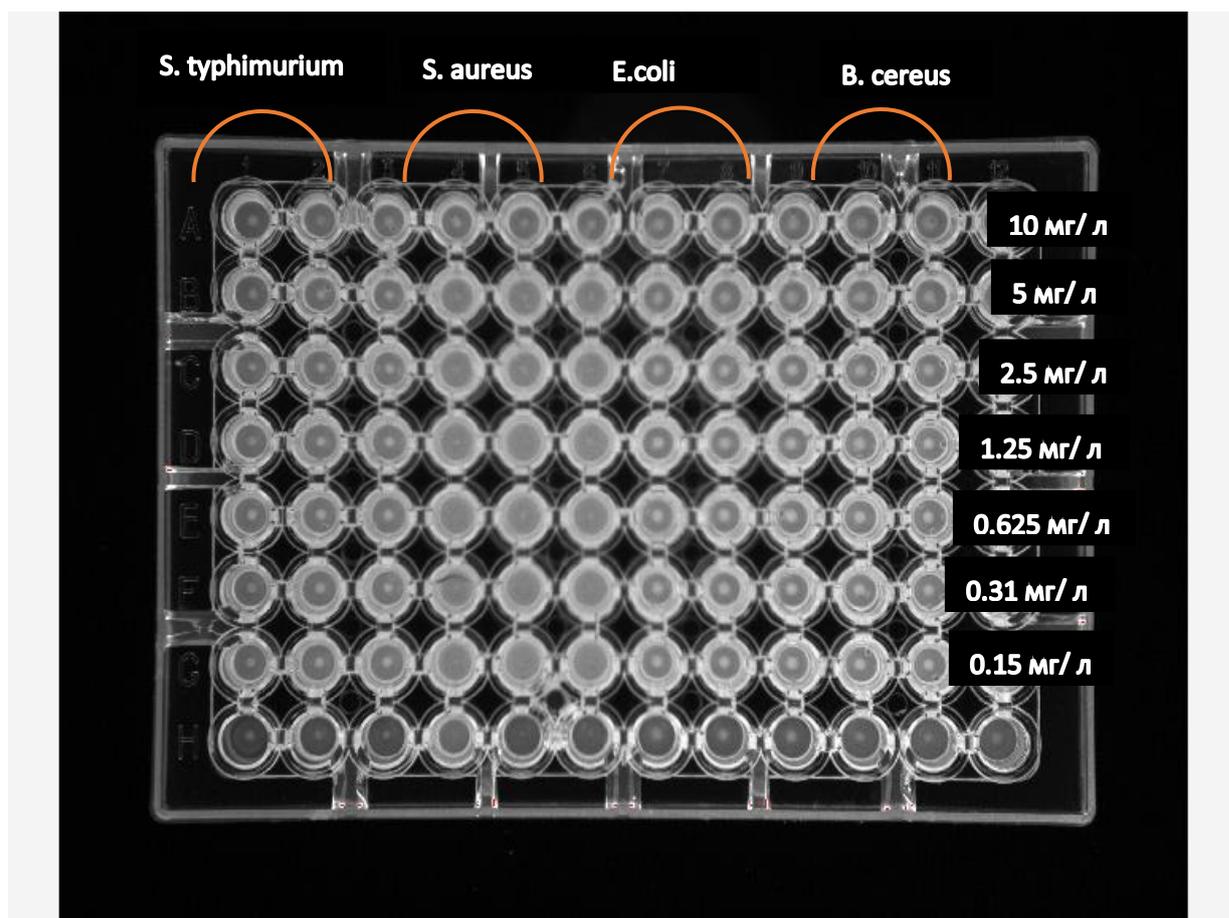


Рисунок 17– Антимикробная активность пептида 6.1

Таблица 21 – Антимикробная активность пептидов 4.1, 4.2, 6.1

Культура бактерии	Пептид № 4.1		Пептид № 4.2		Пептид № 6.1	
	0.625мг/л	10мг/л	0.625мг/л	10мг/л	0.625мг/л	10мг/л
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 1027	-	-	-	+	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 10702	-	-	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i> 1626	-	-	+	+	-	+

Примечание – ‘+’- бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов);

‘-’ – бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

Для подтверждения полученных результатов, нами были сделаны контрольные высевы из лунок с низкой (0.625мг/л) и высокой (10мг/л) концентрацией пептида на чашки Петри со стерильным агаром. Чашки помещали в термостат при t 37 °С на 24 часа, после чего учитывали результат (Рисунок 18-

22). Отсутствие роста бактериальных колоний на чашках свидетельствовало о корректности проведенного эксперимента.



Рисунок 18 – Установление бактерицидной активности пептида 4.2 в концентрации 10мг/л

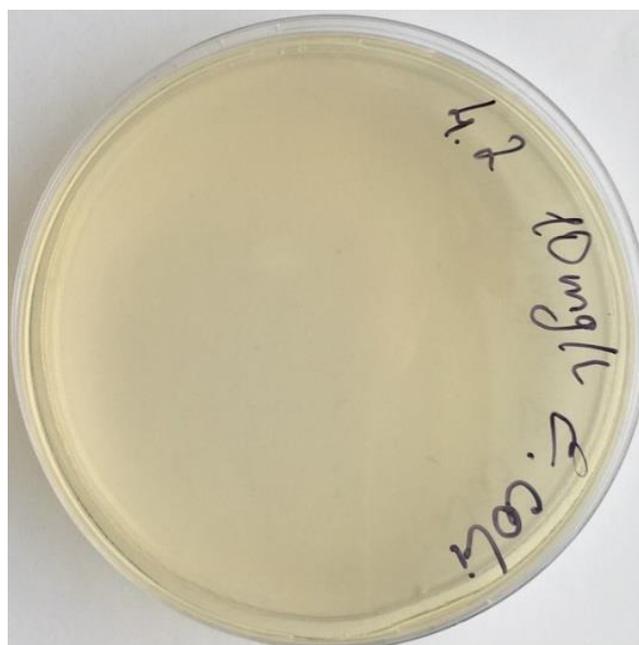


Рисунок 19 – Установление бактерицидной активности пептида 4.2 в концентрации 10мг/л

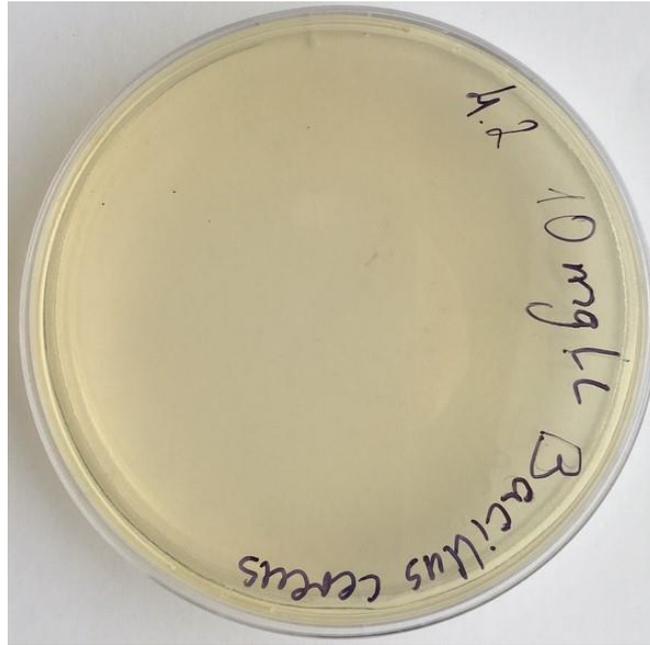


Рисунок 20 – Установление бактерицидной активности пептида 4.2 в концентрации 10мг/л



Рисунок 21– Установление бактерицидной активности пептида 6.1 в концентрации 10мг/л



Рисунок 22– Установление бактерицидной активности пептида 6.1 в концентрации 10мг/л

Таким образом, исследования в данной области являются предпосылками к созданию антибактериальных препаратов и кроме того будет способствовать решению проблемы нарушения микробиоценоза живых организмов, терапии заболеваний, вызываемых антибиотикорезистными штаммами и профилактики заболеваний различной этиологии.

2.3.6. Изучение биотрансформации пептидов в организме белых мышей

Для понимания механизма метаболизма антимикробных пептидов в макроорганизме, нами были проведены эксперименты по биотрансформации антимикробных пептидов в организме белых мышей. В результате проведенного эксперимента, было установлено, что антимикробные пептиды, меченые ФИТЦ через 24 часа после внутрибрюшинного введения, не вызвали флуоресценции в крови, что явилось свидетельством их отсутствия в кровяном русле.

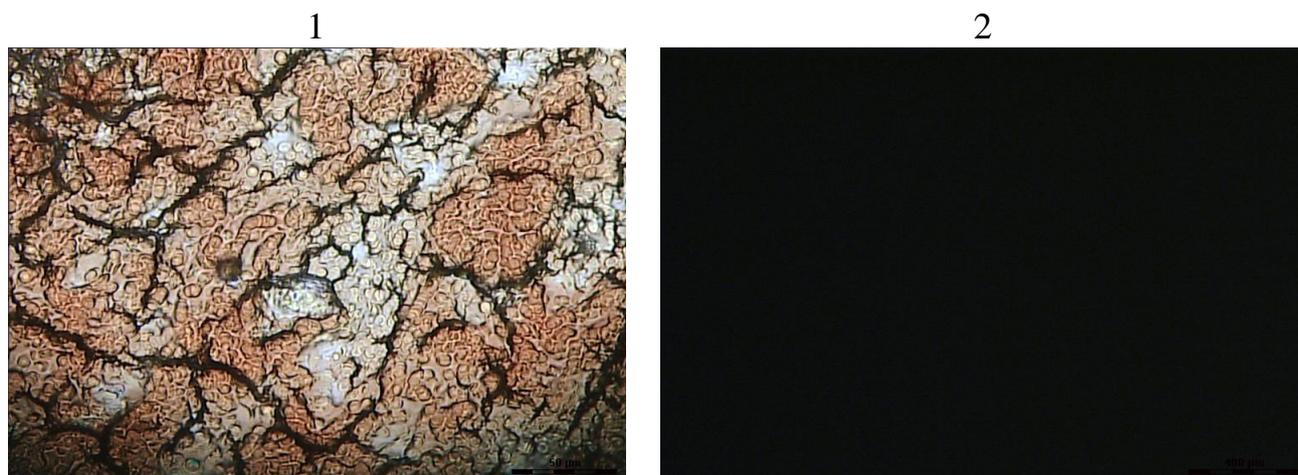


Рисунок 23– Мазок крови мыши, после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), х600

Аналогичные данные были получены при внутримышечном введении АМП, меченых ФИТЦ, и так же через 24 часа отмечали полное выведение препарата из крови.

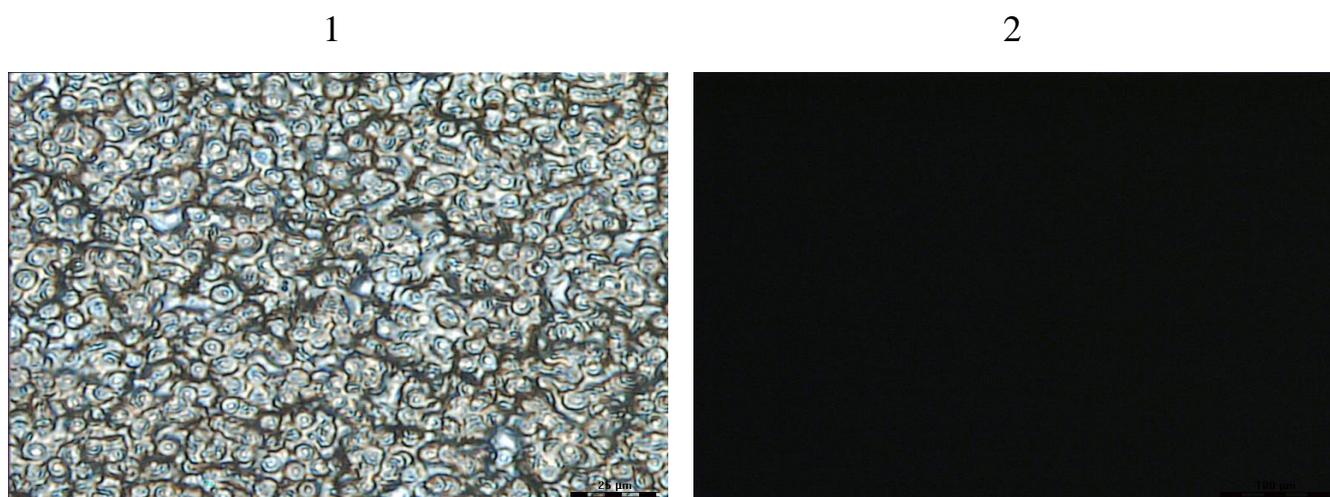
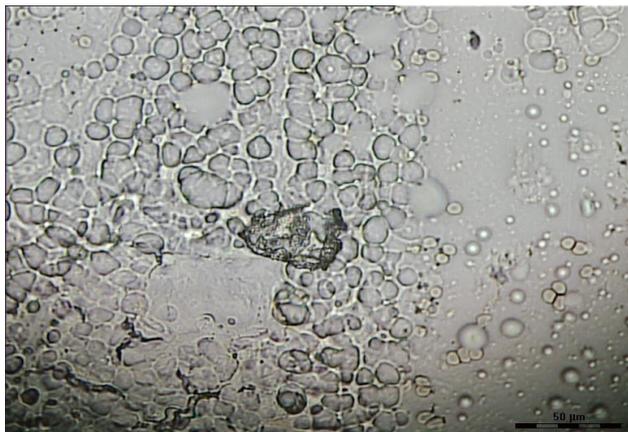


Рисунок 24– Мазок крови мыши после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия без фильтра (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), х630

Флуоресценция не была обнаружена при микроскопии мазка отпечатка из костного мозга после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ, что говорит о полном отсутствии пептидов в мозге.

1



2

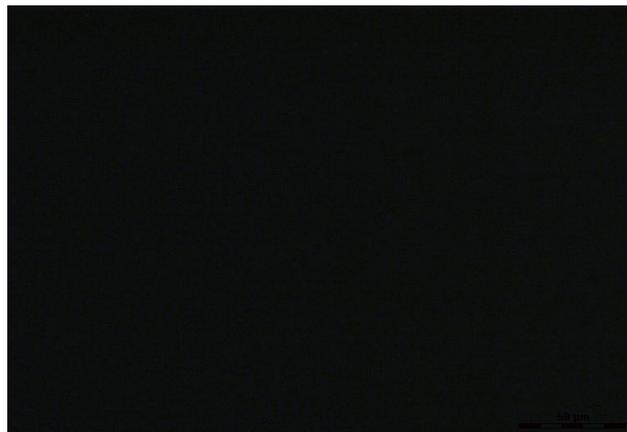
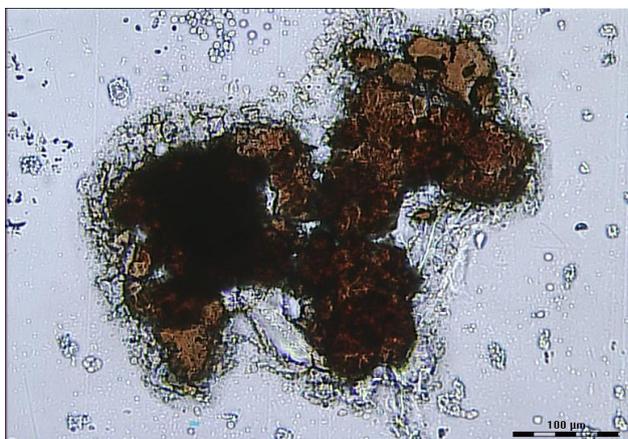


Рисунок 25– Мазок отпечаток костного мозга мыши после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1).

Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), х40

Однако довольно сильная и интенсивная флуоресценция отмечалась через 24 часа после внутримышечного введения, что явилось результатом локализации искомого вещества в клетках костного мозга.

1



2

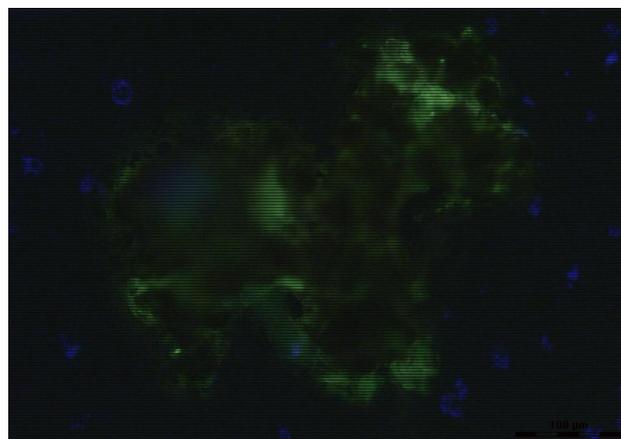


Рисунок 26– Мазок отпечаток костного мозга мыши после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1).

Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), х200

При микроскопии мазка отпечатка из паренхимы печени после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ, через 24 часа, регистрировали довольно интенсивное свечение внутри структурных

образований, что подтверждало на сосредоточение пептидов в паренхиматозных клетках.

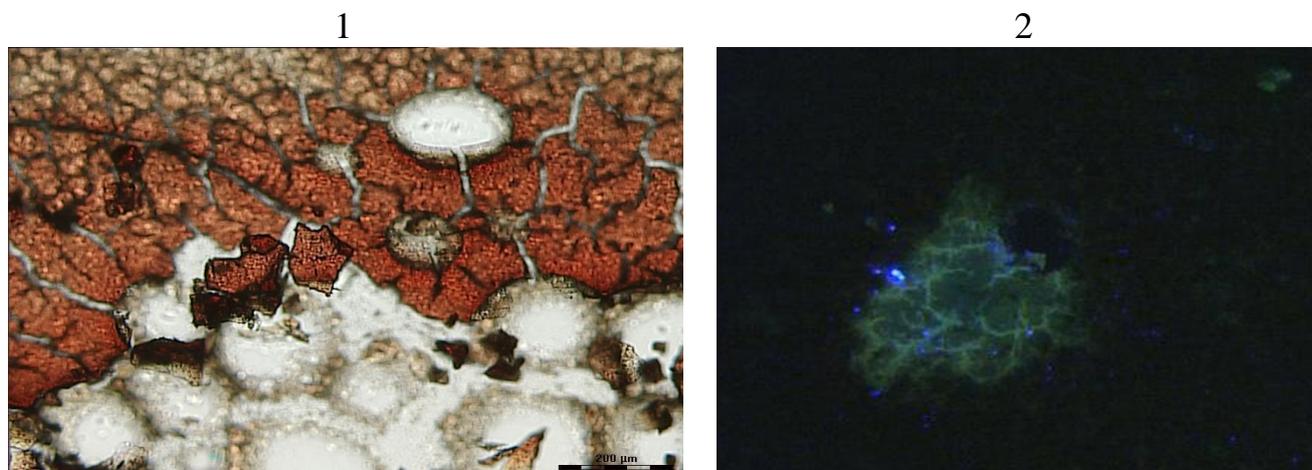


Рисунок 27– Мазок отпечаток паренхимы печени мыши после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1).
Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x100

Следует отметить, что после внутримышечного введения пептиды также локализуются в паренхиме печени и остаются в ней в течение 24 часов с момента введения, сосредотачиваясь внутри структурных образований, имеющих оболочку.

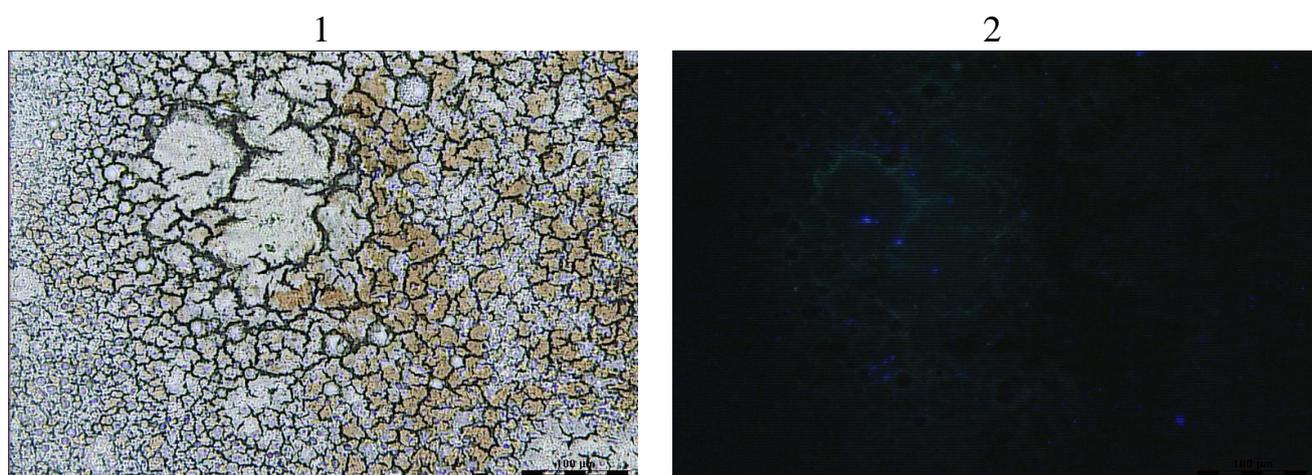


Рисунок 28– Мазок отпечаток паренхимы печени мыши после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1).
Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x200

Отсутствие флуорисценции искомым пептидов в почках регистрировали при микроскопическом исследовании мазка отпечатка паренхимы почки через 24 часа после внутрибрюшинного введения АМП, что свидетельствовало об их отсутствии в данных органах.

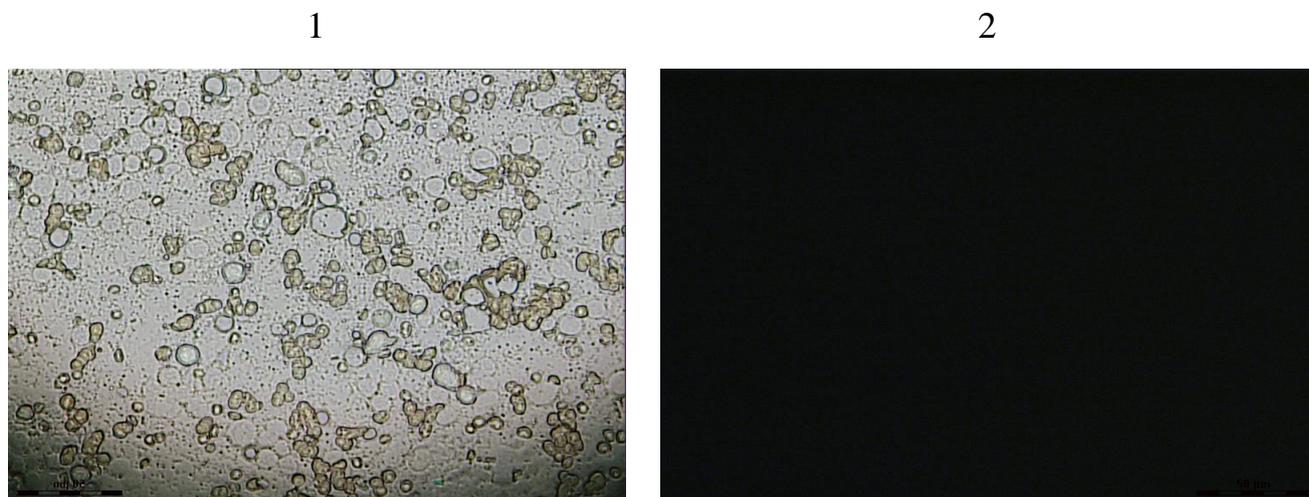


Рисунок 29– Мазок отпечаток паренхимы почки мыши после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1).

Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x400

Аналогичные явления отмечали после внутримышечного введения АМП. Флуоресценцию через сутки не отмечали в мазке отпечатке паренхимы почки.

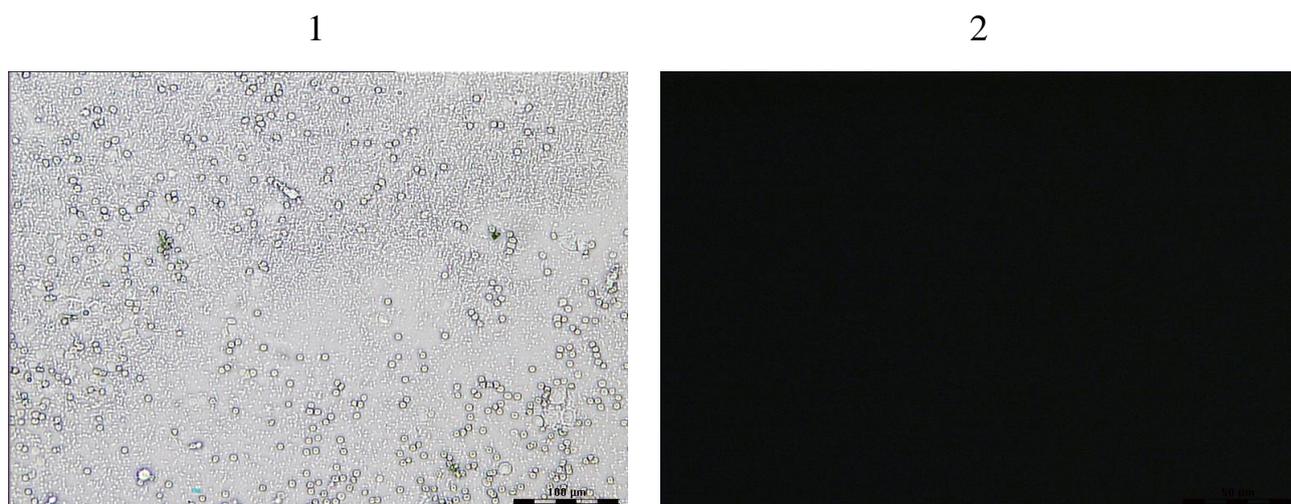


Рисунок 30– Мазок отпечаток паренхимы почки мыши после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1).

Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x200

Полная локализация пептидов в клетках селезёнки в течение 24 часов была подтверждена при микроскопии мазка отпечатка паренхимы селезенки мыши после внутрибрюшинного введения АМП с регистрацией флюоресценции, имеющей строго очерченную форму и границы.

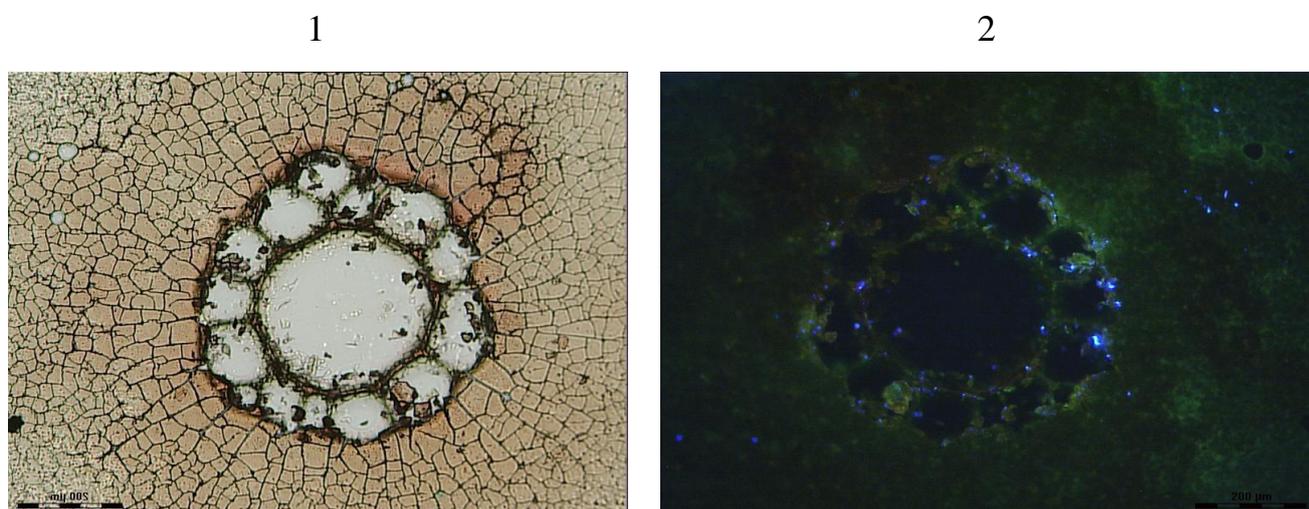


Рисунок 31– Мазок отпечаток паренхимы селезенки мыши после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1), Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x100

При внутримышечном введении АМП, меченых ФИТЦ наблюдали аналогичные результаты.

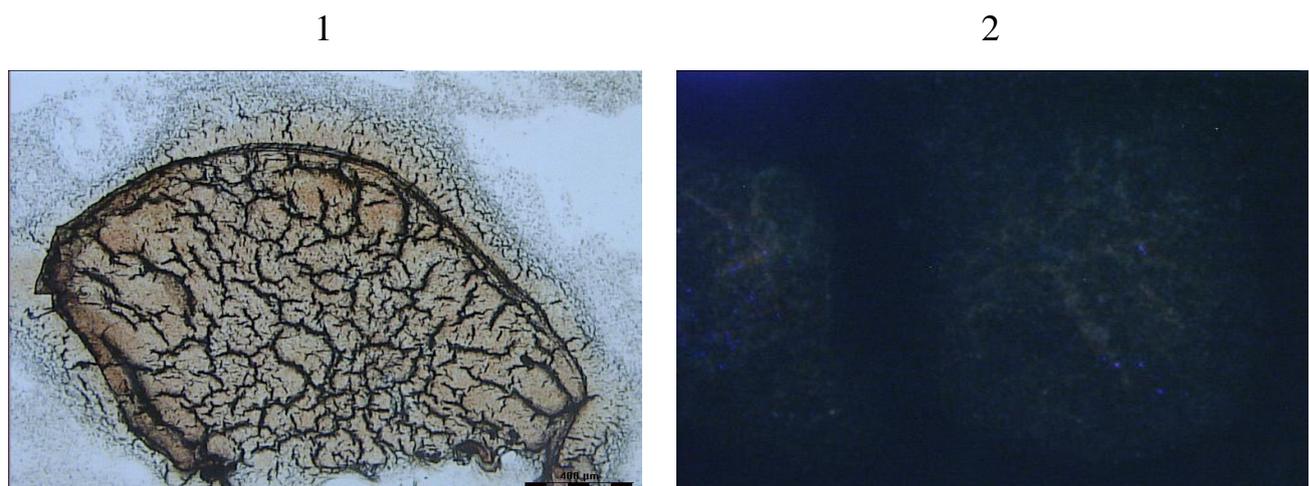


Рисунок 32– Мазок отпечаток паренхимы селезенки мыши после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1), Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x50

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

Таким образом, можно предположить, что АМП обладают тропизмом к органам ретикулоэндотелиальной системы. Могут захватываться иммунокомпетентными клетками при попадании в кровеносное русло, а затем транспортируются в органы иммунной системы, где и метаболизируются.

Заключение

Антимикробные пептиды обладают некоторыми преимуществами перед антибиотиками, они способны осуществлять быстрый киллинг клеток-мишеней и проявлять активность в отношении штаммов, резистентных к другим антибиотикам.

Первоначально антимикробные пептиды животного и растительного происхождения привлекли внимание ученых благодаря своим противомикробным свойствам. В процессе изучения АМП было выявлено, что данные молекулы являются универсальными и эволюционно древними элементами системы врожденного иммунитета. В дальнейшем стало известно, что антимикробные пептиды способны оказывать не только противомикробное, но и иммуномодулирующее действие и кроме того принимают участие в функционировании не только врожденного, но и приобретенного иммунитета (Steinstraesser L. et al., 2012).

Ввиду отсутствия приобретенного иммунитета у беспозвоночных при контакте с патогенами протективный эффект может быть обусловлен только врожденным иммунитетом. Интересным фактом является и то, что беспозвоночные составляют подавляющее число видов животных на Земле (более 98%), кроме того продолжительность жизни некоторых представителей более 100 лет (Silva P. et al., 2000).

Антимикробные пептиды *in vivo* губительно действуют на микроорганизмы не только вследствие прямого действия, но и благодаря опосредованному киллингу через иммуномодулирующие эффекты. Усиленная продукция АМП в очаге воспаления вызывает сосредоточение высоких концентраций в таких очагах, что приводит к гибели микробной клетки. Кроме того, *in vivo* АМП разных классов и различные антимикробные вещества обладают синергетическим действием противомикробным действием (Rosen T. et al., 2011). Согласно некоторым исследованиям, развитие резистентности у микроорганизмов к антимикробным пептидам *in vitro* маловероятно (Machado V. et al., 2020).

Резистентность АМП к противомикробным препаратам является сложным явлением, связанным с развитием собственных и/или приобретенных факторов, способных инактивировать соединение или модифицировать цель, сводя на нет действие конкретных препаратов. Недавнее исследование *E. coli* сравнило бактериальную мутацию, вызванную лечением антибиотиками с использованием катионных АМП, включая *Hyalophora cecropia* Сес А (Rodríguez-Rojas A. et al., 2014). В отличие от антибиотиков, ни один из проанализированных АМП не увеличил частоту мутаций *E. coli*. Авторы связали это феномен неспособности этих АМП активировать пути бактериального стресса, которые способствуют мутагенезу ДНК (Rodríguez-Rojas A. et al., 2014).

Длительное воздействие низких уровней антимикробного соединения является важной движущей силой возникновения устойчивости к противомикробным препаратам. Многообещающие данные показали, что после длительного лечения гибридный САМ-пептид в сублетальных концентрациях существенно не изменял МПК пептидов. Последующее лечение САМ оставалось эффективным, как против лабораторного, так и против мультиантибиотикорезистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, в то время как аналогичное серийное воздействие сублетальных доз гентамицина или LL-37 увеличивало их эффективные МПК на тех же бактериальных штаммах (Geitani R. et al., 2019; Machado V. et al., 2020). Эти исследования предоставляют важные данные о том, что лечение с Сес и Сес-аналогами пептидов трудно индуцируют устойчивость к противомикробным препаратам.

Следовательно, принимая во внимание разнообразие насекомых и их продолжительность жизни можно утверждать об эффективности их системы защиты.

Высокая антибактериальная активность по отношению к разным группам микроорганизмов, в том числе к антибиотикорезистентным штаммам, низкая вероятность селекции устойчивых к АМП штаммов, делают антимикробные пептиды перспективными лекарственными агентами для конструирования новых эффективных противомикробных препаратов (Chernysh S. et al., 2015).

Проведенные нами исследования позволили разработать оригинальную методику выделения пептидов из биомассы личинок насекомых, состоящую из гомогенизации; экстракции; центрифугирования; высаливания сульфатом аммония; растворения; высаливания сульфатом аммония и отработать экспериментальную методику разделения белковых фракций в ходе проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии. Подобраны условия хроматографирования: 80 мм при скорости потока 1 мл/мин и длине волны 280 нм, на колонке BioSep SEC S-2000 300x7, время хроматографирования 60 мин, объем вводимой пробы 20 мкл и температуре 25 °С.

В результате изучения антимикробной активности макрометодом было установлено, что пептиды № 2.3 и 2.6, выделенные из биомассы личинок *G. mellonella* ингибируют рост штамма *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), пептид № 2.6 – *S. typhimurium* 1626. Пептиды № 2.3 и 2.6 обладают активностью по отношению к штамму *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, № 2.6 – *B. cereus* ATCC 10702. Антимикробная активность пептидов № 2.1; 2.2; 2.4; 2.5 и 2.7 не была выявлена. При изучении антимикробной активности пептидов 3.1-3.7, выделенных из биомассы личинок *G. mellonella*, было выявлено, что антимикробной активностью в отношении штамма *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) обладают пептиды № 3.4 и 3.6. Пептиды № 3.2 и 3.6 ингибируют рост штамма *S. typhimurium* 1626, пептиды № 3.3 и 3.6 – *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653. В отношении штамма *B. cereus* ATCC 10702 антимикробную активность проявляют пептиды № 3.2, 3.6 и 3.7. При исследовании антимикробной активности белковой фракции № 3, выделенной из *G. mellonella*, была установлена антимикробную активность в концентрации 0,18 мг/л по отношению к *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P). Белковая фракция № 6 имела антимикробную активность в концентрации 0,111 мг/л по отношению к *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *E. coli* 1027, *B. cereus* ATCC 10702, *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653. Изучение антимикробной активности белковой фракции 2, выделенной из биомассы личинок *M. domestica* показало ее антимикробную активность по отношению *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *C.*

albicans РКПГУ–401/NCTC–885-653, *B. cereus* ATCC 10702.

Изучение антимикробной активности диффузным методом позволило выявить антимикробную активность пептидов, полученных из биомассы личинок *G. mellonella*. Нами было установлено, что наиболее эффективно действовал пептид 1.2 на грамотрицательные микроорганизмы, а наиболее эффективными концентрациями по отношению к грамположительным явились – 0,65 мг/л для *S. aureus* ATCC 6538(209-P) и 2.5мг/л для *B. cereus* ATCC 10702, где наблюдалась максимальная задержка роста бактерий. Для *S. typhimurium* 1626 при концентрации пептида 1.2 - 1.25 мг/л результаты антимикробной активности были сопоставимы с некоторыми бета-лактамами антибиотиками на микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*. Таким образом, пептид 1.2 обладал антимикробной активностью в большей степени к штаммам *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702.

При изучении антимикробной активности микрометодом было выявлено, что пептид 4.2 обладает высокой противомикробной активностью по отношению к *B. cereus* ATCC 10702, *S. typhimurium* 1626 в концентрации 0.625 мг/л, и сравнительно высокой по отношению к *E. coli* 1027 в концентрации 10 мг/л и не вызывает гибели *S. aureus* ATCC 6538(209-P). Пептид № 6.1 ингибирует рост *B. cereus* ATCC 10702 в концентрации 0,625 мг/л. Однако способность подавлять рост *S. typhimurium* 1626 у пептида 6.1 ниже, чем у пептида 4.2 и ограничена концентрацией 10мг/л. Что же касается *S. aureus* ATCC 6538(209-P), *E. coli* 1027 изученные нами концентрации пептида, под номером 6.1 не вызывают угнетения данного штамма, предположительно, что ингибирование данных штаммов возможно при более высокой концентрации АМП.

По результатам изучения биотрансформации антимикробных пептидов *G. mellonella* в органах и тканях белых мышей через 24 часа после внутрибрюшинного и внутримышечного введения пептидов, меченых ФИТЦ, флуоресценции в крови не отмечали, что явилось свидетельством их отсутствия в кровяном русле. При микроскопическом исследовании мазка отпечатка паренхимы почки через 24 часа отмечали отсутствие флуорисценции искомым

пептидов в после обоих видов введения, что свидетельствовало об их отсутствии в данных органах. Полная локализация пептидов в клетках селезёнки в течение 24 часов была подтверждена при микроскопии мазка отпечатка паренхимы селезенки после внутрибрюшинного и внутримышечного введения АМП с регистрацией флуоресценции, имеющей строго очерченную форму и границы. Кроме этого, отмечали довольно интенсивное свечение внутри структурных образований при микроскопии мазка отпечатка из после внутрибрюшинного введения АМП, меченных ФИТЦ, что подтверждало сосредоточение пептидов в паренхиматозных клетках данного органа. Следует отметить, что после внутримышечного введения пептиды также локализуются в паренхиме печени, сосредотачиваясь внутри структурных образований, имеющих оболочку, и остаются в ней в течение 24 часов с момента введения. Флуоресценция не была обнаружена при микроскопии мазка отпечатка из костного мозга после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ, что говорит об отсутствии пептидов в мозге. Однако довольно сильная и интенсивная флуоресценция отмечалась через 24 часа после внутримышечного введения, что явилось результатом локализации искомого вещества в клетках костного мозга. Таким образом, нами было выявлено, что через сутки независимо от способа после введения АМП, меченых ФИТЦ, белым неллинейным мышам происходит их накопление, в основном, в печени и селезенке. Кроме того, отмечали интенсивное свечение при внутримышечном введении в костном мозге.

Согласно полученным нами данным можно предположить, что пептиды обладают тропизмом к органам ретикулоэндотелиальной системы. При попадании в кровь захватываются иммунокомпетентными клетками и транспортируются в органы иммунной системы, где и происходит их метаболизация.

Следовательно, полученные нами данные по антимикробной активности и метаболизации пептидов, выделенных из организма насекомых, могут стать отправной точкой для дальнейших исследований и основой для конструирования антимикробных препаратов на их основе.

Многие исследователи утверждают, что исследования, связанные с

открытиями АМП более эффективных в лечении инфекций, вызванных микроорганизмами, также относятся к веществам, продуцируемым насекомыми. Причиной этого, является эволюционный успех, который позволяет насекомым занимать различные среды обитания. Важную часть этого успеха можно отнести к эффективности их иммунитета. Кроме того, существует более 30 миллионов видов насекомых, то есть огромный источник ресурсов для поиска новых веществ для дальнейшего применения в медицине, пищевой промышленности и косметологии в качестве заменителей и / или для использования в сочетании с антибиотиками (Ganz T. et al., 2003; Wang G. et al., 2004; Peters V. et al., 2010; Clausen M-L. et al., 2016; Mylonakis E. et al., 2016).

Антимикробные пептиды не оказывают неблагоприятного воздействия на эукариотические клетки и могут использоваться для лечения человека и животных, а также в кормлении животных. Поиск новых альтернативных антибиотикам препаратов в животноводстве, прежде всего, связан с растущей проблемой устойчивости к антибиотикам (Powers J., et al., 2006).

Отдельные исследования показывают, что развитие резистентности к АМП у изначально чувствительных к ним бактериальных штаммов *in vitro* маловероятно. Тем не менее, эти работы пока немногочисленны и этот вопрос требует более глубокого и всестороннего рассмотрения.

Научно-исследовательская работа по выделению наиболее перспективных АМП может стать предпосылкой к разработке высокоэффективных антимикробных препаратов, и кроме этого будет способствовать решению проблемы нарушения микробиоценозов живых организмов, будет способствовать терапии заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами, и может использоваться для профилактики заболеваний различной этиологии.

Выводы

1. Разработана методика выделения водорастворимых пептидов из личинок *G. mellonella* и *M. domestica*, состоящая из следующих стадий: гомогенизации; экстракции; центрифугирования; высаливания сульфатом аммония; растворения; высаливания сульфатом аммония.
2. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии экспериментально подобраны оптимальные условия для разделения водорастворимых пептидов: 80 мм при скорости потока 1 мл/мин и длине волны 280 нм, на колонке BioSep SEC S-2000 300x7, время хроматографирования 60 мин, объем вводимой пробы 20 мкл и температуре 25 °С.
3. Выявлены антимикробные пептиды, выделенные из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica* оказывающие ингибирующее действие на *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. Наиболее высокой антимикробной активностью обладали пептиды 3 и 6, выделенные из *G. mellonella*, пептид 3 ингибировал рост микроорганизмов *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653, *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), *E. coli* 1027, *B. cereus* ATCC 10702, *C. albicans* РКПГУ–401/NCTC–885-653.
4. В результате исследования было установлено, что через сутки независимо от способа после введения АМП, меченых ФИТЦ, белым нелинейным мышам происходит их накопление, в основном, в печени и селезенке. Кроме того, отмечали интенсивное свечение при внутримышечном введении в костном мозге.

Практические предложения

1. Для получения антимикробных пептидов из биомассы насекомых рекомендуется использовать разработанную нами оригинальную технологию, включающую в себя следующие стадии: гомогенизацию; экстракцию; центрифугирование; высаливание сульфатом аммония; растворение; высаливание сульфатом аммония.
2. Для разделения пептидов методом ВЭЖХ показано использование колонки BioSep S2000 300x2120 мм на длине волны 280 нм, объем петли 1575 мкл, элюентом был 0,1 М фосфатный буферный солевой раствор. Аналитические определения проводили в следующих условиях: скорость потока - 1,0 мл/мин, объем вводимой пробы - 20 мкл, температура колонки 25 °С. Время анализа для одной пробы 60 мин, поток 1 мл/мин.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Настоящее исследование по выделению наиболее перспективных АМП может стать предпосылкой к разработке высокоэффективных антимикробных препаратов, которые могут быть использованы в качестве терапии при лечении заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами, и кроме этого, будет способствовать решению проблемы нарушения микробиоценозов живых организмов.

Список литературы

1. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. – Введ. 2004-03-04. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
2. ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар. Методические указания. – Введ. - Министерство здравоохранения Российской Федерации
3. Пат. 2261866 Российская Федерация, МПК7 С 07 К 14/435, А 61 Р 31/04. Пептиды ареницины, выделенные из морского кольчатого червя *Arenicola marina*, обладающий антимикробным действием / Т.В. Овчинникова, Г.М. Алешина, С.В. Баландин, М.Л. Маркелов, А.Д. Краснодембская, В.Н. Кокряков ; Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Государственное учреждение «НИИ экспериментальной медицины РАМН». – № 2004103808/13 ; заявл. 10.02.04 ; опубл. 10.10.05, Бюл. № 28.
4. Пат. 2611173 Российская Федерация, МПК6 С 07 К 14/435, С 12 N 15/12, А 61 К 38/17, А 61 Р 31/00. Варианты антимикробного пептида и кодирующие его полинуклеотиды / Х-Х. К. Хогенхауг, П.Х. Мюгинд, Т. Крусе, Д.Р. Сегура, Д. Сандванг, С. Неве; Адениум Биотек АпС. – № 2012148781 ; заявл. 10.06.11 ; опубл. 21.02.17, Бюл. № 6.
5. Пат. 2552157 Российская Федерация, МПК7 С 12 Р 21/00, С 07 К 2/00, С 07 К 1/20, А 61 К 38/00, А 61 Р 31/00. Способ получения комплекса антимикробных пептидов насекомого / А.Ю. Яковлев, С.И. Черныш, Н.А. Гордя; ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет». – № 2013157808/10; заявл. 26.12.13; опубл. 10.06.15, Бюл. № 16.
6. Пат. 2316595 Российская Федерация, МПК7 С 12 Р 21/00, С 12 N 1/21, С 12 R 1/19. Способ получения антимикробного пептида ареницина / С.В. Баландин, В.Н. Кокряков, Т.В. Овчинникова ; Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – № 2006121111/13; заявл. 16.06.06 ; опубл. 10.02.08, Бюл. № 4.

7. Пат. №103442. Садок для разведения насекомых / Бугаева Л. Н., Игнатьева Т. Н., Новиков Ю. П., Кашутина Е. В.–20.04.2011. Пат. РФ № 2038086. Способ получения биологически активного продукта из личинок большой восковой моли / Спиридонов Н.А., Рачков А.К., Мухин С.А., Кондрашова М.Н.–26.03.1991, Бюл. № 18.
8. Пат. № 843898. Садок для насекомых / Логачев А.Д.–07.07.1981
9. Пат. 2456345 Российская Федерация, МПК6 С 12 N 15/05.
10. Пат. РФ № 2038086. Способ получения биологически активного продукта из личинок большой восковой моли / Спиридонов Н.А., Рачков А.К., Мухин С.А., Кондрашова М.Н.–26.03.1991, Бюл. № 18.
11. Болатчиев, А.Д. Антимикробные пептиды – будущее антимикробной терапии / А.Д. Болатчиев // Неделя науки 2015: Материалы всероссийского молодежного форума с международным участием. – Ставрополь, 2015. – С. 39 - 40.
12. Буряк, А.К. Изучение пептидного состава антибактериально активных фракции методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии / А.К. Буряк, О.С. Срибная, П.П. Пурыгин // Биомедицинская химия. – 2010. – Т.56, №3. – С. 387 - 396.
13. Жаркова М. С., антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения / М. С. Жаркова Д. С. Орлов, В. Н. Кокряков, О. В. Шамова –Вестник СПбГУ. – Сер. 3. –2014. – Вып.1 с. 98–114.
14. Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля ; пер. с нем. А.П. Тарасова. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
15. Коновалова, Т.В. Лабораторное содержание и разведение большой восковой огневки *G. mellonella* L. / Т.В. Коновалова // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2009. – №4. – С. 46-48.
16. Коновалова, Т.В. Методические рекомендации по лабораторному содержанию и разведению большой восковой огневки *G. mellonella* L. / Т.В. Коновалова // Современные средства и методы обеспечения ветеринарного

благополучия по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел. – Москва, 2011. – С. 298 - 302.

17. Костина, Д.А. Влияние биологически активных пептидных компонентов гемолимфы личинок *G. mellonella* на рост и на ферментативную активность *E. coli* / Д.А. Костина и др. // Известия Самарского научного центра РАН. – 2013. – Т.15, №1. – С. 567 - 574.

18. Костина, Д.А. Действие биологически активных компонентов гемолимфы личинок *G. mellonella* на активность щелочной фосфатазы / Д.А. Костина, Н.А. Кленова, Е.Г. Литвинова // Вестник СамГУ. – 2013. – № 6 (107). – С. 182 - 186.

19. Нечаева, О.В. Антибиотики: учебное пособие для студентов лечебного, педиатрического, медико-профилактического и стоматологического факультетов / О.В. Нечаева, И.Г. Швиденко, Г.М. Шуб. – Саратов: СГМУ, 2009. – 65 с.

20. Осокина, А.С. Приспособление для содержания и разведения большой восковой моли (*G. mellonella* L.) / А.В. Гушин, Л.М. Колбина, А.С. Осокина // Биомика.– 2016. – Т.8, №2. – С. 84–87.

21. Пантелеев, П. В. Строение и биологические функции β -спилечных антимикробных пептидов / П. В Пантелеев, И. А. Болосов, С. В Баландин и др. // Actanaturae/ Т. 7 № 1 (24) – 2015. – С. 39–50.

22. Пурыгин, П.П. Выделение антибактериальных компонентов из гемолимфы личинок *G. mellonella* / П.П. Пурыгин, О.С. Срибная, Н.А. Кленова, Д.Н. Худякова, Е.Г. Литвинова, М.Н. Кондрашова, А.А. Овсепян // Вестник СамГУ. – 2007. – №9/1 (59). – С. 270–285.

23. Пурыгин, П.П. Обнаружение и выделение антибактериальных пептидов из экстрактов личинок *G. mellonella* / П.П. Пурыгин, Н.А. Кленова, Е.Г. Литвинова и др. // Вестник СамГУ, Ест. науч. серия. –2006. –Т. 6/1(46). – С. 201–211.

24. Рекомбинантная плазмидная ДНК pE-Trx-Lc-def, штамм *Escherichia coli* для экспрессии антимикробного пептида дефенсина чечевицы *Lens culinaris* и

способ получения указанного пептида / С.В. Баландин, Е.И. Финкина, Т.В. Овчинникова; Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – № 2010154169/10; заявл. 30.12.10 ; опубл. 20.07.12, Бюл. № 20.

25. Севастьянов Б.Г. Технология круглогодичного вывода личинок восковой моли / Б.Г. Севастьянов // Сборник 10. Материалы международной и практической конференции по апитерапии. Апитерапия сегодня. – Рязань. – 2002. – С. 241–245.

26. Сизенцов, А.Н. Антибиотики и химиотерапевтические препараты: учебник / А.Н. Сизенцов, И.А. Мисетов, И.Ф. Каримов. – Оренбург: ОГУ, 2012. – С. 489.

27. Сипайлова, О.Ю. Антимикробные низкомолекулярные пептиды: факторы неспецифической защиты организма животных / О.Ю. Сипайлова, Д.В. Нестеров // Вестник ОГУ. – 2013. – № 12 (161). – С. 169 – 171.

28. Совгир Н.В. Особенности экспрессии гибридных генов, созданных на основе последовательностей ДНК гена антимикробного пептида эскулентина лягушки и гена антивирусного белка бычьего альфа-интерферона / Н.В. Совгир, М.И. Потапович, В.А. Прокулевич - Труды БГУ– 2013, том 8, часть 1, – С. 207–214

29. Сычева, М.В. Биологические эффекты антимикробных веществ животного и бактериального происхождения: дис. д-р биол. наук : 06.02.02 : защищена 22.04.16 / Сычева Мария Викторовна. – Башкирский ГАУ. – Уфа, 2016. – С. 274.

30. Чугреев, М.К. Биологические особенности большой восковой огнёвки *G. mellonella* L. / М.К. Чугреев, Л.С. Дроздова, Н.А. Кудрявцева // Актуальные вопросы развития науки: Сб. тр. – Уфа, 2014. – С.92 – 94.

31. Report to the Secretary General of the Nations: No Time to Wait–Securing the Future from Drug-Resistant Infections; Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance (IACG): New York, NY, USA, –2019.

32. Abbas, A. K. Basic immunology: functions and disorders of the immune system/ A. K. Abbas, A. H Lichtman //3rd ed. Philadelphia: Elsevier. –2009. – P. 312.
33. Abdel-Rahman, MA. Venom of *Scorpio maurus palmatus* / MA. Abdel-Rahman, PN. Strong, M. Tawfik, K.Miller // *Toxicon*. – 2016. - Vol.117 – P.30-36
34. Aerts, A.M. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *C. albicans* / A.M. Aerts // *J Mol Microbiol Biotechnol*. – 2007. – Vol. 13 (4). – P. 243 - 247.
35. Ahmad, A. Identification and design of antimicrobial peptides for therapeutic applications. / A. Ahmad, E. Ahmad, G. Rabbani et al.// *Curr Protein Pept Sci*.- 2012.- P.23.
36. Anaya-Lypez, J.L. Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides / J.L. Anaya-Lypez, J.E. Lypez-Meza, A. Ochoa-Zarzosa // *Crit. Rev. Microbiol*. – 2013. – Vol. 39 (2). – P. 180 - 195.
37. Andrä, J. Significance of the cyclic structure and of arginine residues for the antibacterial activity of arenicin-1 and its interaction with phospholipid and lipopolysaccharide model membranes / J. Andrä. et al. // *Biol. Chem*. – 2009. – Vol. 390 (4). – P. 337 - 349.
38. Andrä, J. Structure and mode of action of the antimicrobial peptide arenicin / Andrä, J. et al. // *Biochem. J*. – 2008. – Vol. 410 (1). – P. 113 – 122.
39. Arnett, E. Defensins enable macrophages to inhibit the intracellular proliferation of *Listeria monocytogenes*: defensins inhibit *Listeria* multiplication in macrophages / E. Arnett // *Cell. Microbiol*. – 2011. – Vol. 13 (4). – P. 635 - 651.
40. Ashby, M. Cationic antimicrobial peptides as potential new therapeutic agents in neonates and children: A review / M. Ashby, A. Petkova, K. Hilpert // *Current Opinion in Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 27 (3). – P. 258 – 267.
41. Ashfad Nohad Kadhum Al-Temenu, M. Effect of artificial diets on some parameters of greater wax moth, *G. mellonella* L. under optimum conditions / M. Ashfad, J. Agric, A. Sohail // *Res*. – 2005. –Vol. 43(3) – P.223–228.

42. Ashfad Nohad Kadhum Al-Temenu, M. Effect of artificial diets on some parameters of greater wax moth, *G. mellonella* L. under optimum conditions / M. Ashfad Nohad Kadhum Al-Temenu, *J. Agric. // Res.* – 2005.– Vol. 43(3) – P.223-228.
43. Meneguetti, B.T., Antimicrobial peptides from fruits and their potential use as biotechnological tools-a review and outlook/ B.T. Meneguetti, L.D. Machado, K.G.N. Oshiro et al. // *Front. Microbiol.*– 2017. – Vol. 7 –P. 27-30.
44. Barbeta, B.L. Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae / B.L. Barbeta // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2008. – Vol. 105 (4). – P. 1221 - 1225.
45. Bédard, F. Recent progress in the chemical synthesis of class II and S-glycosylated bacteriocins / E.Biron // *Front. Microbiol.* – 2018. –Vol.9 – P.1048.
46. Bevins, C. L., Antimicrobial peptides as effector molecules of mammalian host defense / C. L. Bevins // *Contrib. Microbiol.* –2003. –Vol. 10. –P. 106–148.
47. Brady, D. Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications / D.Brady, A. Grapputo, O.Romoli , F.Sandrelli // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – P. 1–22.
48. Chen, C.-W., Metal nanobullets for multidrug resistant bacteria and biofilms / C.-W. Chen, C.-Y. Hsu, S.-M. Lai et al. // *Adv. Drug Deliv.* –2014.– Vol. 78– P. 88-104.
49. Cao, H. Identification of a novel proline-rich antimicrobial peptide from *Brassica napus*/ H. Cao, T. Ke, R. Liu et al. // *PLoS One* –2015. –Vol.10 –P.10-14.
50. Carmona-Ribeiro, A. M. Novel Formulations for Antimicrobial Peptides / A. M Carmona-Ribeiro, L. D. Melo Carrasco // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol.15 – P. 23-26.
51. Carvalho, Ade O. Plant defensins-prospects for the biological functions and biotechnological properties / Ade O. Carvalho, V.M. Gomes // *Peptides.* – 2009. – Vol. 30 (5). – P. 1007 - 1020.
52. Chen, J.Y. A fish antimicrobial peptide, tilapia hepcidin TH2-3, shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells / J.Y. Chen, W.J Lin, T.L. Lin // *Peptides.* – 2009. – Vol. 30 (9). – P. 1636 – 1642.

53. Cherkasov, A. Use of artificial intelligence in the design of small peptide antibiotics effective against a broad spectrum of highly antibiotic-resistant superbugs / A. Cherkasov // *ACS Chem. Biol.* – 2009. – Vol. 4 (1). – P. 65 – 74.
54. Chernysh, S. Insect antimicrobial peptide complexes prevent resistance development in bacteria / S. Chernysh, N. Gordya, T. Suborova // *PLoS One*– Vol.10 – 2015. – P. 37 – 51.
55. Chouabe, C. New mode of action for a knott in protein bioinsecticide: pea albumin 1 subunit b (PA1b) is the first peptidic inhibitor of V-ATPase / C. Chouabe // *J Biol Chem.* – 2011. – Vol. 286 (42). – P. 36291 - 36296.
56. Clausen, M-L. Antimicrobial Peptides, Infections and the Skin Barrier / M-L. Clausen, T. Agner // *Curr Probl Dermatol.* –2016. – Vol.49 – P.38–46.
57. Daneshmand, F. Investigation of the antimicrobial activities of Snakin-Z, a new cationic peptide derived from *Zizyphus jujuba* fruits / F. Daneshmand, H. Zare-Zardini, L. Ebrahimi // *Nat. Prod. Res.* – 2013. – Vol. 27 (24). – P. 2292 - 2296.
58. Davis, R.W. Antimicrobial peptide interactions with silica bead supported bilayers and *E. coli*: buforin II, magainin II, and arenicin / R.W. Davis // *J. Pept. Sci.* – 2009. – Vol. 15 (8). – P. 511 - 522.
59. Diamond G., Beckloff N., Weinberg A., Kisich K. O. The roles of antimicrobial peptides in innate host Defense // *Curr. Pharm. Des.* –2009. – Vol. 15– P. 2377–2392.
60. Diamond, G. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense / G. Diamond // *Curr. Pharm. Des.* – 2009. – Vol. 15– P. 2377 - 2392.
61. Duchardt, F. A cell-penetrating peptide derived from human lactoferrin with conformation-dependent uptake efficiency / F. Duchardt // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 36099 - 36108.
62. English, B.K., The use and abuse of antibiotics and the development of antibiotic resistance/ B.K English, A.H. Gaur A. Finn et al. // *Hot Topics in Infection and Immunity in Children VI*, Springer New York, New York, –2010. – P. 73-82.
63. Farrokhi, N. Plant peptides and peptidomics / N. Farrokhi, J.P. Whitelegge, J.A. Brusslan // *Plant Biotechnol J.* – 2008. – Vol. 6 – P. 105 – 134.

64. Fjell, C.D. Designing antimicrobial peptides: form follows function / C.D. Fjell // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2011. – Vol. 11 (1). – P. 37 – 51.
65. Frank A. E., Dietz A. Improved culture techniques for mass rearing *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) // *Ent. News Ann. of the Entomol. Soc. of America.* – 1990. – Vol. 101 – P. 123-127.
66. Ganz ,T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity / T. Ganz // *Nat Rev Immunol* –2003. – Vol. 3– P. 20.
67. Garbacz, K. Activity of antimicrobial peptides, alone or combined with conventional antibiotics, against *S. aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients / W. Kamysz, L. Piechowicz // *Virulence.* – 2017. –Vol.8– P. 94–100.
68. Garcia, A.E. Isolation, synthesis, and antimicrobial activities of naturally occurring theta-defensin isoforms from baboon leukocytes / A.E. Garcia // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76 (12). – P. 5883 - 5891.
69. Geitani, R. Cationic antimicrobial peptides: Alternatives and/or adjuvants to antibiotics active against methicillin-resistant *S. aureus* and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* / C.A. Moubareck, L. Touqui, D.K. Sarkis // *BMC Microbiol.* –2019. –Vol.19–P. 54.
70. Giuliani, A., *Antimicrobial peptides: methods and protocols* / A. Giuliani, A. C. C. Rinaldi // *Series: methods in molecular biology*, New York: Springer Humana Press. –2010. – Vol. 618 –P. 424.
71. Godreuil, S. Aedesin: structure and antimicrobial activity against multidrug resistant bacterial strains./ S. Godreuil, N. Leban, A. Padilla et al. // *PLoS One* 2014; 9:e105441-e105441. Gong, D. Gallin: an antimicrobial peptide member of a new avian defensin family, the ovodefensins, has been subject to recent gene duplication / D. Gong et al. // *BMC Immunol.* – 2010. – Vol. 12. – P. 11 - 12.
72. Gordon Y. J., Romanowski E. G., McDermott A. M. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs // *Curr. Eye Res.* –2005. –Vol. 30– P. 505–515.
73. Gracy, J. *KNOTTIN: the knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007.* / J. Gracy // *Nucleic Acids Res.* – 2008. –Vol. 36 – D314-9.

74. Grassi, L. Combination strategies to enhance the efficacy of antimicrobial peptides against bacterial biofilms / G.Maisetta, S. Esin, G. Batoni // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8– P.2409.
75. Gruber, C.W. Distribution and evolution of circular miniproteins in flowering plants / C.W. Gruber // *Plant Cell.* – 2008. – Vol. 20 (9) – P. 2471 - 2483.
76. Guo, G. Identification and characterization of a novel antimicrobial protein from the housefly *M. domestica*/ G.Guo, R. Tao, Y. Li et al. // *Peptides* –2017.– Vol. 37–P. 123–150.
77. Hammami, R. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides / R. Hammami // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol. 37 (Database issue): D963-8.
78. Harrison, PL. Characterisation of three alpha-helical antimicrobial peptides from the venom of *Scorpio maurus palmatus*/ PL. Harrison, MA. Abdel-Rahman, PN. Strong, MM. Tawfik, K. Miller // *Toxicon.* –2016.–Vol. 117– P.30–36.
79. Haydak M. Is wax is necessary constituent of the diet of the wax moth larvae // *Ann. of the Entomol. Soc. Of America.* – 1936. – Vol. 29 – P. 581-589.
80. Haydak M. Is wax is necessary constituent of the diet of the wax moth larvae/ M. Haydak et al. // *Ann. of the Entomol. Soc. Of America.* – 1936. – Vol. 29 – P. 581-589.
81. Henriques, S.T. Decoding the membrane activity of the cyclotide kalata B1: the importance of phosphatidylethanolamine phospholipids and lipid organization on hemolytic and anti-HIV activities / S.T. Henriques // *J Biol Chem.* – 2011. – Vol. 286 (27). – P. 24231 - 24241.
82. Hocquellet, A. Importance of the disulfide bridges in the antibacterial activity of human hepcidin / A. Hocquellet, C. Ie Senechal, B. Garbay // *Peptides.* – 2012. – Vol. 36 (2). – P. 303 - 307.
83. Hocquellet, A. Structure–activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2 / A. Hocquellet et al. // *Peptides.* – 2010. – Vol. 31 (1). – P. 58 - 66.

84. Hooven, T.A. Retrocyclin inhibits *Gardnerella vaginalis* biofilm formation and toxin activity / T.A. Hooven et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2012. – Vol. 67 (12). – P. 2870 - 2872.
85. Imamura, T. Acquired resistance to the rice blast in transgenic rice accumulating the antimicrobial peptide thanatin / T. Imamura et al. // *Transgenic Res.* – 2010. – Vol. 19 (3). – P. 415 - 424.
86. Jain, A. Marine antimicrobial peptide tachyplesin as an efficient nanocarrier for macromolecule delivery in plant and mammalian cells / A. Jain, B.K. Yadav, A.Chugh // *FEBS J.* – 2015. – Vol. 282 (4). – P. 732 - 745.
87. Jayaraj, J. Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens / J. Jayaraj, Z.K. Punja // *Plant Cell Rep.* – 2007. – Vol. 26 (9). – P. 1539 - 1546.
88. Khandelia, H. The impact of peptides on lipid membranes / H. Khandelia, J.H. Ipsen, O.G. Mouritsen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1778 (7 - 8). – P. 1528 - 1536.
89. Khandelia, H. The impact of peptides on lipid membranes / H. Khandelia, J.H. Ipsen, O.G. Mouritsen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1778 (7 - 8). – P. 1528 - 1536.
90. Koch, A. The antimicrobial peptide thanatin reduces fungal infections in *Arabidopsis*: thanatin reduces fungal infection in plants / A. Koch et al. // *J. Phytopathol.* – 2012. – Vol. 160 (10). – P. 606 - 610.
91. Kokryakov, VN. Biology of antibiotics of animal origin. / SPb .: Science //–1999. – P.162 .
92. Koszalka, P. Antitumor activity of antimicrobial peptides against U937 histiocytic cell line / P. Koszalka // *Acta Biochim.* – 2011. – Vol. 58 (1). – P. 111 - 117.
93. Kudryashova, E. Retrocyclins neutralize bacterial toxins by potentiating their unfolding / E. Kudryashova // *Biochem J.* – 2015. – Vol. 467 (2). – P. 311 - 320.
94. Kvansakul, M. Crystal Structure of the Plant Defensin NsD7 bound to Phosphatidic Acid / FT. Lay, CG. Adda, PK. Veneer et al. // *Proc Natl Acad Sci.* – 2016. –Vol. –113:11202-7.

95. Löfgren, S.E. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals / S.E. Löfgren // *Exp. Parasitol.* – 2008. – Vol. 118 (2). – P. 197 - 202.
96. Lai Y., Gallo R. L. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense // *Trends Immunol.* – 2009. – Vol. 30– P. 131–141.
97. Lee, E. Anti-inflammatory activities of cecropin a and its mechanism of action/ E. Lee, A. Shin, Y. Kim // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* –2015. – Vol. 88– P. 31–44.
98. Lee, O.S. Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confers disease resistance against phytopathogenic fungi in tomato, *Lycopersicon esculentum* / O.S Lee // *Phytochemistry.* – 2003. – Vol. 62 (7). – P. 1073 - 1079.
99. Lehrer, R.I. Theta-Defensins: cyclic peptides with endless potential / R.I. Lehrer, A.M. Cole, M.E. Selsted // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287 (32). – P. 27014 - 27019.
100. Li, J. Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides / J. Li // *FASEB J.* – 2007. – Vol. 21 (10). – P. 2466 –2473.
101. Li, S.S. Cys/Gly-rich proteins with a putative single chitin-binding domain from oat (*Avena sativa*) seeds / S.S. Li, P. Claeson // *Phytochemistry.* – 2003. – Vol. 63 (3). – P. 249 - 255.
102. Lipkin, A. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds / A. Lipkin et al. // *Phytochemistry.* – 2005. – Vol. 66 (20). – P. 2426 - 2431.
103. Liu, X. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by Cecropin D in vitro / X. Liu, C. Guo, Y. Huang, X. Zhang, Y. Chen // *Infect. Genet. Evol.*– 2015. –Vol.34- P. 7–16.
104. Lobo, D.S. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle / D.S. Lobo // *Biochemistry.* – 2007. – Vol. 46 (4). – P. 987 - 996.

105. Lowry, O.H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr et al. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. No1. P. 265-275.
106. Machado, V. Technological Potential of Antimicrobial Peptides / V. Machado, J. Gelinski, C. M. Baratto, E. M. Borges, A.Vânia Vicente, M. F. Mariana // *Indian journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2020. – P.1–23.
107. Maisetta, G. Antimicrobial activity of human hepcidin 20 and 25 against clinically relevant bacterial strains: effect of copper and acidic pH / G. Maisetta et al. // *Peptides.* – 2010. – Vol. 31 (11). – P. 1995 - 2002.
108. Maltseva, A.L. Expression pattern of arenicins, the antimicrobial peptides of polychaete *Arenicola marina* / A.L. Maltseva // *Front. Physiol.* – 2014. – Vol. 19 (5). – P. 497 - 502.
109. Mansour, S.C. Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections / S.C. Mansour, C. de la Fuente-Núñez, R.E. Hancock // *J. Pept. Sci.* – 2015. – Vol. 21 (5). – P. 323 – 329.
110. Maróti, G. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals/ G.Maróti, A.Kereszt, E. Kondorosi et al. // *Res. Microbiol.* –2011. – Vol. 162, iss. 4. –P. 363–374.
111. Marston, N. Comparison of nine diets for rearing *G. mellonella*/ N Marston., B. Campbell // *Ann. of the Entomol. Soc. of America.* – 1973. – Vol. 66. no 1.– P.132-136.
112. Mechnikov II Lectures on the comparative pathology of inflammation./ SPb.: Publication of K. L. Rikker,. –P.604.
113. Meunier, O. From the discovery of antibiotics to emerging highly drug-resistant bacteria / O. Meunier // *Soins.* – 2015. – Vol. 797. – P. 14 - 20.
114. Miao, X.Y. Production of transgenic mice carrying the Thanatin gene by intratesticular injection / X.Y. Miao, X. Zhang // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – Vol. 415 (3). – P. 429 - 433.
115. Moore, A.J. Antimicrobial activity of cecropins / A.J Moore, W.D Beazley, M.C Bibby, D.A Devine // *Antimicrob. Chemother.* –1996.–Vol.37– P.1077–1089.

116. Mylonakis, E. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides / E. Mylonakis, L. Podsiadlowski, M. Muhammed et al. // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* –2016.– Vol.371:20150290.
117. Nádía, S. Parachin and Octavio L. Franco. New edge of antibiotic development: antimicrobial peptides and corresponding resistance/ S. Nádía // *Frontiers in Microbiology* –2014. –P. 1–145.
118. Naknukool, S. Structural and physicochemical characteristics of novel basic proteins isolated from duck egg white / S. Naknukool et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2008. – Vol. 72 (8). – P. 2082 - 2091.
119. Nguyen, L.T. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action / L.T. Nguyen, E.F. Haney, H.J. Vogel // *Trends Biotechnol.* – 2011. – Vol. 29 (9). – P. 464 - 472.
120. Nicole, L. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides / L. Nicole // –2013. –Vol.70 – P. 3545–3570.
121. Odintsova, T.I. A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif / T.I Odintsova // *FEBS J.* – 2009. – Vol. 276 (15). – P. 4266 - 4275.
122. Ojo, O.O. Tigerinin-1R: a potent, non-toxic insulin-releasing peptide isolated from the skin of the Asian frog, *Hoplobatrachus rugulosus* / O.O. Ojo // *Diabetes Obes. Metab.* – 2011. – Vol. 13 (12). – P. 1114 - 1122.
123. Ovchinnikova, T.V. Molecular insight into mechanism of antimicrobial action of the β -hairpin peptide arenicin: specific oligomerization in detergent micelles / T.V. Ovchinnikova // *Biopolymers.* – 2008. – Vol. 89 (5). – P. 455 - 464.
124. Ovchinnikova, T.V. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina* / T.V. Ovchinnikova // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 577 (1 - 2). – P. 209 - 214.
125. Panteleev, P.V. The structure and biological functions of β -hairpin antimicrobial peptides / P.V. Panteleev, I.A., Bolosov S.V., Balandin T.V. Ovchinnikova // *Acta Naturae* – 2015.– Vol. 1 (24). – P. 39-50.

126. Peters, B. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs / ME. Shirliff, MA.Jabra-Rizk // PLoS Patho. – 2010. – Vol.6– P.33-37
127. Powers, J.P. The Antimicrobial peptide polyphemusin localizes to the cytoplasm of Escherichia coli following treatment / J.P. Powers, M. Morgan, L. Goosney et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – Vol. 50 (4). – P. 1522 - 1524.
128. Qu, Z. Isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the Chinese oak silk moth, *Antheraea pernyi* / Z. Qu, H.Steiner, A. Engström, H. Bennich et al. // Insect immunity. Eur. J. Biochem. – 1982.–Vol.127– P. 219–224.
129. Rahnamaeian, M. Antimicrobial peptides. Modes of mechanism, modulation of defense responses / M. Rahnamaeian // Plant Signal Behav. – 2011. – Vol. 6 (9). – P. 1325 - 1332.
130. Rai, A. One-step synthesis of high-density peptide-conjugated gold nanoparticles with antimicrobial efficacy in a systemic infection model / A. Rai, S.Pinto, T.R. Velho et al.// Biomaterials – 2016.– Vol. 85 – P.99–110.
131. Rivillas-Acevedo, L.A. Isolation and biochemical characterization of an antifungal peptide from *Amaranthus hypochondriacus* seeds / L.A. Rivillas-Acevedo, M. Soriano-Garcia // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55 (25). – P. 10156 - 10161.
132. Rodríguez-Rojas, A. Antimicrobials, stress and mutagenesis / A. Rodríguez-Rojas, O. Makarova, J.Rol // PLoS Pathog. –2014.–Vol.10 – P. 12 -14.
133. Rosen, T. Antibiotic resistance: an editorial review with recommendations / T. Rosen // J Drugs Dermatol. –2011.– Vol.10– P. 724-733.
134. Rothan, H.A. Inhibition of dengue NS2B-NS3 protease and viral replication in Vero cells by recombinant retrocyclin-1 / H.A. Rothan, H. Han, T. Ramasamy et al. // BMC Infect. Dis. – 2012. – Vol. 12 (1). – P. 311 - 314.
135. Rothan, H.A. Protegrin-1 inhibits dengue NS2B-NS3 serine protease and viral replication in MK2 cells / H.A. Rothan et al. // J. Biomed. Biotechnol. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1 - 6.
136. Sang, Y. Porcine host defense peptides: expanding repertoire and functions / Y. Sang, F. Blecha // Dev. Comp. Immunol. – 2009. – Vol. 33 (3). – P. 334 - 343.

137. Schaal, J.B. Rhesus macaque theta-defensins suppress inflammatory cytokines and enhance survival in mouse models of bacteremic sepsis / J.B. Schaal et al. // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7 (12). – P. 51330 – 51337.

138. Schagger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // *Anal. Biochem.* 1987. – Vol. 166. – P. 368-379.

139. Shenkarev, Z.O. Molecular mechanism of action of β -hairpin antimicrobial peptide arenicin: Oligomeric structure in dodecylphosphocholine micelles and pore formation in planar lipid bilayers / Z.O. Shenkarev, S. Balandin, K. Trunov et al. // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50 (28). – P. 6255 - 6265.

140. Shestakov, A. et al. Synthetic analogues of bovine batenecin dodecapeptide reduce herpes simplex virus type 2 infectivity in mice / A. Shestakov, H. Jenssen, R. Hancock et al. // *Antiviral Res.* – 2013. – Vol. 100 (2). – P. 455 - 459.

141. Silva, P.I. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family / P.I. Silva, S. Daffre, P. Bulet // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275 (43). – P. 33464 - 33470.

142. Song, Y. Purification, characterization and cloning of two novel tigerinin-like peptides from skin secretions of *Fejervarya cancrivora* / Y. Song, Y. Lu, L. Wang et al. // *Peptides*. – 2009. – Vol. 30 (7). – P. 1228 - 1232.

143. Stegemann, C. De novo sequencing of two new cyclic θ -defensins from baboon (*Papio hamadryas*) leukocytes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // C. Stegemann, E. Tsvetkova, G. Aleshina et al. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2010. – Vol. 24 (5). – P. 599 - 604.

144. Stegemann, C. Isolation, purification and de novo sequencing of TBD-1, the first beta-defensin from leukocytes of reptiles / C. Stegemann, A. Kolobov, Y. Leonova et al. // *Proteomics*. – 2009. – Vol. 9 (5). – P. 1364 - 1373.

145. Steinstraesser, L. Genotoxic and cytotoxic activity of host defense peptides against human soft tissue sarcoma in an in vitro model / L. Steinstraesser, J. Hauk, S. Al-Benna et al. // *Drug Chem. Toxicol.* – 2012. – Vol. 35 (1). – P. 96 - 103.
146. Steinstraesser, L. Host defense peptides and their antimicrobial immunomodulatory duality / L. Steinstraesser, U. Kraneburg, F. Jacobsen et al. // *Immunobiology.* –2011. –Vol. 216, iss. 3. –P. 322–323.
147. Steinstraesser, L. Host defense peptides and their antimicrobialimmunomodulatory duality / L. Steinstraesser et al. // *Immunobiology.* – 2011. – Vol. 216 (3). – P. 322 – 323.
148. Tacconelli, E. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics / E. Tacconelli, N. Magrini, G. Kahlmeter et al. // *World Health Organization.* – 2017. – Vol. 27.
149. Tavanti, A. Fungicidal activity of the human peptide hepcidin 20 alone or in combination with other antifungals against *Candida glabrata* isolates / A. Tavanti, G. Maisetta, Gaetano Del Gaudio et al. // *Peptides.* – 2011. – Vol. 32 (12). – P. 2484 - 2487.
150. Tonk, M. The medical potential of antimicrobial peptides from insects / M. Tonk, A. Vilcinskas.// *Curr. Top. Med. Chem.* – 2017– Vol. 17– P. 554–575.
151. Tosi, M. F. Innate immune responses to infection / M. F Tosi, J. Allergy // *Clin. Immunol.* – 2005.–Vol. 116, N 2. – P. 241–249.
152. Wang, G. Antimicrobial Peptides in 2014. / G. Wang, B. Mishra, K. Lau et al. // *Pharmaceuticals* –2015. – Vol.8 –P. 123–150.
153. Wang, G., Antimicrobial peptides: discovery, design, and novel therapeutic strategies / G.Wang, B. Mishra, K. Lau et al. // *Advances in molecular and cellular microbiology.* CAB International. – 2010. – Vol. 18 –P. 230
154. Wang, J. A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties / J. Wang, K. Ma, M. Ruan et al. // *Peer J* – 2018.– Vol. 6– e5369.
155. Wang, Z. The Antimicrobial Peptide Database, *Nucleic Acids Research* / Z. Wang, G.Wang// *APD.* – 2004. – Vol.32. –. P. 32-34

156. Wei, X.-B. Novel hybrid peptide cecropin A (1–8)-LL37 (17–30) with potential antibacterial activity / R.-J. Wu, D.-Y. Si, X.-D. Liao et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol.17. – P. 983.
157. Wieczorek, M. Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity / M. Wieczorek, H. Jenssen, J. Kindrachuk et al. // *Chem. Biol.* – 2010. – Vol. 17 (9). – P. 970 - 980.
158. Wiesner J. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system / J. Wiesner, A. Vilcinskas // *Virulence.* – 2010. – Vol. 1 (5). – P. 440 - 464.
159. Wimley, W.C. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions / W.C. Wimley, K. Hristova // *J. Membr. Biol.* – 2011. – Vol. 239 (1 - 2). – P. 27 - 34.
160. Wimley, W.C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model / W.C. Wimley // *ACS Chem. Biol.* – 2010. – Vol. 5 (10). – P. 905 - 917.
161. Wu, G. The activity of antimicrobial peptide S-thanatin is independent on multidrug-resistant spectrum of bacteria / G. Wu, X. Li, X. Fan et al. // *Peptides.* – 2011. – Vol. 32 (6). – P. 1139 - 1145.
162. Wu, Q. Insect antimicrobial peptides, a mini review / Q.Wu, J. Patořcka, K. Kuřca // *Toxins.* – 2018. – Vol.10. – P. 461.
163. Wu, T. Expression of antimicrobial peptides thanatin (S) in transgenic *Arabidopsis* enhanced resistance to phytopathogenic fungi and bacteria / T. Wu, D. Tang, W. Chen et al. // *Gene.* – 2013. – Vol. 527 (1). – P. 235 - 242.
164. Yi, H.-Y. Insect antimicrobial peptides and their applications / H.-Y. Yi, M. Chowdhury, Y.-D Huang, X.-Q Y // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 98– P. 5807–5822.
165. Zhou, M. Identification of precursor cDNAs encoding five structural classes of antimicrobial peptides from pickerel frog (*Rana palustris*) skin secretion by single step “shotgun” cloning / M. Zhou, L.Wang, D. Owens et al. // *Peptides.* – 2007. – Vol.28 – P.1605–1610.

Приложения

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2714128

Композиция антимикробных пептидов, полученных из личинок *Musca domestica*, и способ ее получения

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова" (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2018142602

Приоритет изобретения 04 декабря 2018 г.

Дата государственной регистрации в

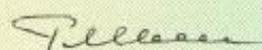
Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 12 февраля 2020 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 04 декабря 2038 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

 *Г.И. Ивлиев*





CERTIFICATE OF
ACHIEVEMENT
EUROPE/AFRICA UNDERGRADUATE WINNER

Alltech® young scientist

This is to certify that

Eugeni Remizov

placed First in the Europe/Africa Undergraduate Competition
in the Alltech Young Scientist Program 2017 – 2018

Mark Lyons, Ph.D.





ДИПЛОМ

I степени

награждается
аспирант

ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ
Ремизов Евгений Кириллович

*за победу в номинации «Биологические науки»
на II этапе Всероссийского конкурса
на лучшую научную работу
среди студентов, аспирантов и молодых ученых
высших учебных заведений
Министерства сельского хозяйства
по Приволжскому федеральному округу*

И.о. ректора Вятской ГСХА,
профессор
26 апреля 2018 г.



В.Т. Мохнаткин

г. Киров



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА

ДИПЛОМ

награждается

Ремизов

Евгений Кириллович

Научный руководитель - Ларионова О.С.

за II место

в конкурсе научно-инновационных работ среди
студентов, аспирантов и молодых ученых университета,
направление «Биологические науки»
в номинации «Наука аспирантов и молодых ученых»

Ректор



Н.И. Кузнецов

Саратов 2018