

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И Вавилова»

*На правах рукописи*

**Ремизов Евгений Кириллович**

**Антимикробная активность пептидов, выделенных из насекомых, и перспектива их использования в качестве противомикробных препаратов**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

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

Саратов – 2023

## Оглавление

Введение	4
1. Обзор литературы	11
1.1. Антимикробные пептиды и их характеристика	11
1.2. Механизм действия антимикробных пептидов	14
1.3. Перспективы использования антимикробных пептидов в профилактике и терапии болезней сельскохозяйственных животных	19
1.4. Современный взгляд на актуальные патогены и потенциал использования антимикробных пептидов при инфекционных болезнях животных	31
2. Собственные исследования	38
2.1. Объекты исследования	38
2.2. Методы исследования	40
2.2.1. Методика выделения водорастворимых пептидов из личинок <i>Galleria mellonella</i> , <i>Musca domestica</i> и <i>Hermetia illucens</i>	40
2.2.2. Методика разделения водорастворимых пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	41
2.2.3. Определение содержания белка, молекулярной массы и аминокислотного состава выделенных пептидов	42
2.2.4. Методика определения антимикробной активности	43
2.2.5. Изучение острой токсичности белковых фракций АМП	44
2.2.6. Методика определения локализации пептидов в тканях и органах белых мышей	44
2.2.7. Статистический анализ	45
2.3. Результаты исследований и их обсуждение	47

2.3.1.	Выделение белковых фракций из личинок <i>G. mellonella</i> , <i>M. domestica</i> , <i>H. illucens</i> и изучение их физико-химических свойств	47
2.3.2.	Изучение чувствительности исследуемых микроорганизмов к антибиотикам диско-диффузионным методом	59
2.3.3.	Определение антимикробной активности белковых фракций макрометодом	62
2.3.4.	Определение антимикробной активности белковых фракций диффузным методом	67
2.3.5.	Определение антимикробной активности белковых фракций микрометодом	68
2.3.6.	Характеристика выделенных антимикробных пептидов	72
2.3.7.	Изучение острой токсичности антимикробных пептидов	73
2.3.8.	Определение локализации пептидов в организме белых мышей	75
	Заключение	82
	Выводы	89
	Практические предложения	90
	Перспективы дальнейшей разработки темы	90
	Список условных обозначений и сокращений	91
	Список литературы	92
	Приложения	114

## Введение

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

Среди них антимикробные пептиды (АМП) являются важной противомикробной альтернативой (Brogden, N. K. et al., 2011; Сычева, М.В., 2016). Пептиды насекомых обладают барьерной функцией и способны защищать макроорганизм от различных патогенных агентов. В процессе эволюции насекомые сформировали огромный потенциал с большим арсеналом пептидов, как результат они являются наиболее перспективным источником для поиска новых агентов, обладающих широким спектром фармакологического действия (Antimicrobial Peptides in 2014..., 2015). Антимикробные пептиды способны оказывать негативное воздействие на бактерии, микроскопические грибы, а

также, согласно последним исследованиям, обладают противоопухолевой активностью. Кроме этого, АМП способны вызывать эффективный киллинг вирусов, обладают потенциально низкой возможностью селекции антибиотикорезистентных штаммов, оказывают сопутствующий спектр противовоспалительных свойств (Diamond, G. et al., 2009).

В этой связи выделение антимикробных пептидов и изучение их антибактериальной активности позволит выявить потенциальную возможность их использования в качестве противомикробных препаратов, но и создаст предпосылки к разработке антибактериальных препаратов нового поколения на их основе.

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

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

**Степень разработанности темы исследования.** Имеющиеся в открытой

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

В частности, подобными исследованиями занимались ранее, в отдельных работах изучалось влияние АМП на *S. typhimurium*, их воздействие на организм животных; влияние АМП, получаемых из кишечника животных на некоторые бактерии. В литературных источниках также имеются доказательства того, что использование насекомых в целях извлечения из них АМП, является приоритетным вектором в работах по поиску противомикробных препаратов (Davis, R., 2009; Antimicrobial activity of human..., 2010; Ashby, M., 2014). Вместе с тем, более поздними исследованиями ученых детально изучался механизм действия антимикробных пептидов в целом, а также перспективы использования АМП в медицинских целях (Identification and characterization of a novel antimicrobial protein..., 2017; Tonk, M., 2017; Technological Potential of..., 2020). В этой связи выбор темы работы был обусловлен актуальностью данных исследований и недостаточностью сведений по получению антимикробных пептидов из насекомых *Galleria mellonella*, *Musca domestica*, *Hermetia illucens*, а также изучение их антимикробного действия на микроорганизмы, являющиеся, в том числе возбудителями зоонозов.

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

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие задачи:

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

3. Изучение острой токсичности антимикробных пептидов.
4. Исследование локализации антимикробных пептидов в организме лабораторных животных.

**Научная новизна.** Разработана оригинальная методика получения водорастворимых пептидов из биомассы личинок. Установлено, что для получения фармацевтической композиции на основе антимикробных пептидов необходимо соблюдение трех основных стадий: высаливания, хроматографического разделения и создания конечной фармацевтической композиции. Доказана антимикробная активность пептидов, выделенных из *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* по отношению к штаммам *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027, в том числе к мультирезистентным. Выявлены пептиды 3 и 6, выделенные из *G. mellonella*, обладающие наиболее высокой антимикробной активностью. Пептид 3 ингибировал рост *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) в концентрации 0,18 мг/л; пептид № 6 проявлял антимикробную активность в концентрации 0,111 мг/л по отношению к *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. Пептид 4.2, выделенный из биомассы личинок *G. mellonella*, обладал высокой антимикробной активностью по отношению к штаммам *B. cereus* ATCC 10702, *S. typhimurium* 1626.

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

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретически обоснован и разработан алгоритм получения экспериментальных серий антимикробных пептидов. Установлено, антимикробное действие полученных антимикробных композиций на вышеуказанные штаммы, в том числе мультирезистентные штаммы *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027, что дополняет имеющиеся сведения о биологических свойствах возбудителей инфекций, вызываемых этими штаммами. Представленные нами данные по локализации антимикробных пептидов в организме лабораторных

мышей при различных способах введения представляют теоретическую значимость для дальнейших исследований. По материалам диссертационной работы получен патент на изобретение: Композиция антимикробных пептидов, полученных из личинок *M. domestica*, и способ ее получения (№ 2018142602 от 04.12.2018). Результаты исследований используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторных занятий с обучающимися факультета ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

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

**Основные положения, выносимые на защиту:**

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

**Работа выполнена** на кафедре микробиологии и биотехнологии



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

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов подтверждена значительным объемом экспериментальных данных с подтверждением их методами математической статистики.

Материалы диссертации были представлены на: Международном конкурсе инноваций «Молодой Учёный Alltech (2018)», где работа стала региональным победителем (Европа-Азия); Международной конференции BIT's 9th Anniversary World DNA Day – 2018 (Китай, Далянь, 2018); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России на II этапе (Киров, 2018); Национальной научно-практической конференции в ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им Н. И. Вавилова (Саратов, 2018); Конкурсе научно-инновационных работ молодых ученых и студентов ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им Н. И. Вавилова, Грант Ректора (Саратов, 2018); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России на III этапе (Оренбург, 2018); XXIII Агропромышленном форуме юга России и выставке «Интерагромаш» «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса», посвященной 90-летию ФГБОУ ВО Донской государственной технической университет (Ростов-на-Дону, 2020).

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

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

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

## 1. Обзор литературы

### 1.1. Антимикробные пептиды и их характеристика

Антимикробные пептиды представляют собой природные антибиотики, которые вырабатываются различными организмами, такими как млекопитающие, членистоногие, растения и бактерии. Эти молекулы представляют собой пептиды, которые в своем составе содержат от 12 до 50 аминокислот, чаще всего они положительно заряжены, и называются антимикробными из-за широкого спектра действия в отношении различных микроорганизмов, таких как грамотрицательные или грамположительные бактерии, паразиты, грибы и некоторые вирусы (An antimicrobial peptide Ar-AMP..., 2005; Acquired resistance to..., 2010; Antimicrobial peptides in domestic animals..., 2021). О наличии данных пептидных веществ у прокариот известно довольно давно, однако у животных и человека, а позднее и у растений они были обнаружены лишь в 80-х годах прошлого столетия. Большинству АМП присущи следующие общие черты: положительный заряд, высокое содержание гидрофобных аминокислотных остатков, амфипатическая структура (пространственное разобщение заряженной и гидрофобной частей), длина менее 60 аминокислотных остатков, широкий спектр антимикробной активности при физиологических условиях (за исключением АМП бактерий) (Строение и биологические функции..., 2015). Эти молекулы синтезируются практически всеми видами живых организмов, от бактерий до млекопитающих и являются защитными молекулярными механизмами врождённого и приобретенного иммунитета организма. Врожденные иммунные системы эволюционировали во всех царствах эукариот для защиты от заражения бактериями, вирусами, грибами и паразитами. Компоненты этих иммунных систем состоят из низкомолекулярных вторичных метаболитов, а также небольших белков и пептидов с широким спектром действия против патогенов. На сегодняшний день известно более 4000 природных антимикробных пептидов, в различных базах данных зарегистрировано около 3000 последовательностей АМП, выделенных из животных и растений (Farrokhi, N. et al., 2008; Gruber, C.W.

2008; Carvalho, A. O. et al., 2009; The antimicrobial peptide thanatin..., 2012; Synthetic analogues of bovine..., 2013; The structure and biological functions..., 2015; Сычева, М.В., 2016; DRAMP 2.0, an updated..., 2019).

Антимикробные пептиды можно классифицировать на основе их последовательности и структуры на следующие группы (Identification and design..., 2012; Aedesin: structure and..., 2010; Characterisation of three alpha-helical..., 2016; Crystal Structure of the Plant..., 2016; Technological Potential of Antimicrobial..., 2020; Peters, B. et al., 2010):

Класс I ( $\alpha$ -спираль) - линейные пептиды, которые принимают настройку, называемую  $\alpha$ -спираль, примеры включают цекропин, магайнин, пексиганан, дермасептин и диптеран.

Класс II ( $\beta$ -лист) - пептиды, которые имеют две или более  $\beta$ -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 дрозозин, лебоцин и морицин, пиррокорин, индолидин и гистатины.

Класс IV ( $\beta$ -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 ( $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -лист) являются более распространенными АМП и более изученными, в качестве примера можно привести цекропин и дефенсин.

Антимикробные пептиды животного и растительного происхождения могут проявлять активность в отношении бактерий, мицелиальных и дрожжевых грибов, простейших, оболочечных вирусов, а также могут оказывать иммуномодулирующее действие (Болатчиев, А.Д., 2015; Jain, A. et al., 2015; The antifungal activity of..., 2007; Venom of *Scorpio maurus*..., 2016).

Они 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, содержащим 50% всех известных видов животных, и представляют собой широкий источник АМП. Причиной этого является эволюционный успех, который позволяет насекомым занимать различные места обитания. Из-за отсутствия приобретенного иммунитета у беспозвоночных при контакте с патогенами защитный эффект может быть обусловлен только врожденным иммунитетом. Антимикробные пептиды играют важную роль в защите насекомого от неблагоприятных факторов среды (Обнаружение и выделение антибактериальных пептидов..., 2006; Выделение антибактериальных компонентов..., 2007).

Антимикробные пептиды выделяют из личинок (24%), из яда (22%), взрослых особей (19%), синтезированных пептидов (18%), куколок (11%), генетически модифицированных объектов (4%) и из питательной среды (2%). АМП у насекомых синтезируются в ответ на внедрение патогена или в зараженной ране тела, преимущественно, в жировом теле и в определенных клетках гемолимфы, затем быстро транспортируются в гемолимфу, где они действуют синергетически против микроорганизмов (Буряк, А.К. и др., 2010). Наиболее часто АМП выделяли из личинок, поскольку именно эта стадия развития насекомого характеризуется содержанием наибольшего объема гемолимфы (Kanost, M.R., 2009).

Кроме того, существует более 30 миллионов видов насекомых, что является огромным источником ресурсов для поиска новых веществ для дальнейшего использования в медицине, пищевой промышленности и косметологии в качестве заменителей и/или для использования в сочетании с антибиотиками (Ganz, T. 2003; Peters, B. et al., 2010; Clausen, M-L. et al., 2016; Diversity, evolution and medical..., 2016). Интерес ученых к этим молекулам обусловлен не только из-за их физиологической роли в иммунитете насекомых, но и за потенциальную альтернативу обычным антибиотикам при лечении инфекционных заболеваний (Insect antimicrobial peptides..., 2014; Wu, Q. et al.,

2018).

Таким образом, АМП обладают многофункциональными свойствами, такими как антибактериальная, противогрибковая и противораковая активность (Hoffmann, J.A et al., 1995; Tosi, M. F. et al., 2005; The activity of antimicrobial..., 2011; Expression of antimicrobial peptides..., 2013). Они могут быть очень разнообразными по последовательности и структуре, но большинство из них заряжены положительно, что позволяет им взаимодействовать с бактериальной оболочкой. Эти пептиды активны в очень низких концентрациях (от микромолярного до наномолярного диапазона), и большинство из них убивают микроорганизм-мишень с помощью механизма, не опосредованного рецепторами, включающего проникновение через мембрану-мишень (From design to screening..., 2013). 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 (Wang, G., 2010; Антимикробные пептиды млекопитающих..., 2014).

## **1.2. Механизм действия антимикробных пептидов**

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

Механизмы их активности 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; Molecular mechanism of action..., 2011).

Уничтожение пептидами патогенных микроорганизмов может проходить очень быстро для некоторых пептидов и до полутора часов 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 с возбудителями ИБ СХЖ на начальной стадии приводит к истончению липидного слоя мембраны клеточной стенки. Взаимодействие антимикробных пептидов с микроорганизмами происходит благодаря их катионным свойствам и электростатическому притяжению к тейхоевой и липотейхоевой кислотам у грамположительных бактерий или воздействию на липополисахариды грамотрицательных бактерий, вызывая нестабильность внешней мембраны, что позволяет им перемещаться через мембрану, нарушая ее целостность и вызывая лизис бактериальной клетки. Механизмы, с помощью которых АМП могут повреждать мембрану патогена, различны. Они могут накапливаться на мембране патогена, создавая поры

«модель бочкообразного стержня», или образовывать поры, выстланные пептидами и липидами, «модель тороидальных пор», или способствовать растворению мембраны в мицеллярные структуры в модели ковра (Antimicrobial peptides: new hope..., 2019).

Основополагающими механизмами мембранолитического действия АМП являются (Diamond G. et al., 2009; Структура и биологические функции..., 2015):

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.

По мнению исследователей, 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 (Identification and characterization of a novel antimicrobial protein from the housefly..., 2017).

Эти механизмы заключаются в накоплении АМП на поверхности мембраны с последующим электростатическим взаимодействием с отрицательно заряженными фосфолипидами патогенных бактерий, рассеивая



электрохимические градиенты для разрушения и высвобождения его внутриклеточного содержимого (Barrel-Stave Model..., 2001). Имеются сведения о дополнительных механизмах нарушения целостности цитоплазматической мембраны бактерий, таких как толщина бислоя, ремоделирование мембраны, адсорбция пептидов на мембране, окисляющих фосфолипиды, индукция оттока малых анионов патогена и модель молекулярной электропорации. Различные модели могут взаимодействовать, вызывая нарушение целостности мембраны, например, есть предположения, что модель ковра была предварительным этапом перед моделью тороидальных пор (Lee, T.H. et al, 2016). Другой механизм действия АМП, при котором они взаимодействуют с цитоплазматической мембраной и накапливаются внутриклеточно, влияя на такие процессы, как транскрипция ДНК, трансляция белка, ферментативная активность, что впоследствии приводит к гибели микроорганизмов (Brogden, K.A., 2005).

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, такими 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 (Identification and characterization of a novel antimicrobial protein from the housefly..., 2017). АМП могут рассеивать электрохимические градиенты через микробные плазматические мембраны в течение нескольких секунд после внедрения (Lobo, D.S. et al., 2007). 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 нарушение 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, в том числе, патогенам, возбудителям ИБ для СХЖ и человека. На следующем этапе происходит прикрепление АМП на

наружной клеточной стенке патогенов, в процессе которого пептиды, находящиеся вблизи микробной поверхности, должны транслоцироваться через полисахариды, прежде чем они могут взаимодействовать с внешней мембраной грамположительных и грамотрицательных бактерий. После этого они уже получают доступ к цитоплазматической мембране и могут взаимодействовать с липидным бислоем. Степень истончения бактериальной мембраны наружной клеточной стенки прямо пропорциональна концентрации пептида.

Высокий интерес практической ветеринарии, здравоохранения и специалистов в области разработки и использования средств профилактики и лечения ИБ СХЖ к АМП обусловлен тем, что данные субстанции обладают широким спектром выраженной противомикробной активности против большинства грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов и даже, вирусов. Значительная часть АМП характеризуется положительным зарядом, относится к катионным АМП и обладает способностью формировать спирали и/или слои при взаимодействии с отрицательно заряженными молекулами мембран и клеточными стенками микроорганизмов (Carmona-Ribeiro, A. M. et al., 2014).

Однако повреждение мембран не является единственным механизмом, с помощью которого АМП вызывают гибель клеток. Они также могут влиять на функции нескольких других клеточных компонентов и действовать как метаболические ингибиторы клеточных процессов, включая биосинтез клеточной стенки, нуклеиновых кислот и белков. В этих случаях гибель клеток может быть результатом множественных ингибирующих эффектов.

### **1.3. Перспективы использования антимикробных пептидов в профилактике и терапии болезней сельскохозяйственных животных**

Антимикробными пептидами называются катионные полипептиды, состоящие менее чем из 100 аминокислот, которые синтезируются рибосомами (Ganz, T., 2003). Некоторые АМП оказывают прямое противомикробное действие, в то время как другие действуют косвенно, модулируя защитные системы

организма. АМП были обнаружены у широкого спектра организмов, от бактерий до человека, однако растения и беспозвоночные в большей степени зависят от выработки данных факторов защиты, поскольку у них отсутствует адаптивный иммунитет (Meister, M. et al., 1997; Fritig, B. et al., 1998).

Ежегодно ученые мира выделяют более 100 АМП, например, из 104 противомикробных пептидов, обнаруженных в 2014 году, 69 получены от животных (Wang, G., 2013; Antimicrobial Peptides in 2014..., 2015). АМП, выделенные из яда австралийских муравьев-прыгунов, продемонстрировали мощный эффект против широкого спектра микроорганизмов, включая метициллинрезистентный золотистый стафилококк и *Candida albicans* (Identification and optimization..., 2005). Катионные пептиды, полученные из муравьев-бродяг, оказывают антибактериальное действие на желудочно-кишечные виды бактерий, такие как *Enterobacter spp.*, *Cronobacter sakazakii*, *Helicobacter pylori* и *Acinetobacter baumannii* (Potent bactericidal effects..., 2014; Anti-helicobacter pylori properties..., 2018; Mechanistic and phenotypic studies..., 2018). АМП, полученные из трансгенных комаров *Ae. aegypti*, проявляли мощную антимикробную активность в отношении синегнойной палочки (Blocking of Plasmodium transmission..., 2010). Пептиды морской бактерии *Bacillus subtilis* проявляли довольно высокую антибактериальную активность отношении *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum acutatum* и *Botrytis cinera*. Другой пептид, сонорензин с широким спектром активности, как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий, также был идентифицирован из морской бактерии *Bacillus sonorensis* MT93 (Sonorensin: an antimicrobial..., 2014). Следует отметить, что муха черная львинка *Hermetia illucens*, на данный момент является наиболее востребованным объектом отряда двукрылых для выделения АМП (Shin, H.S. et al., 2019; Peptides in the hemolymph..., 2020). Выделенные из данного биологического объекта АМП показали высокую антимикробную активность в отношении различных патогенных бактерий, включая метициллинрезистентный золотистый стафилококк (Peptides in the hemolymph..., 2020). Однако

исследования, связанные с АМП черной львинки, до сих пор ограничены характеристикой пептидов и оценкой их антимикробной активности.

В настоящее время использование «классических» антибиотиков для борьбы с инфекционными заболеваниями обусловлено их специфическим действием, скоростью влияния на организм животных и устранением осложнений при лечении вирусных инфекций (Kokryakov, V.N., 1999; Giuliani, A., 2010). 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 (Acquisition of *Clostridium difficile*..., 2011).

Снижение чувствительности микроорганизмов к антимикробным средствам – это эволюционный процесс, который вполне закономерно способствует адаптации патогенов к непрерывному контакту с антибиотиками. 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. В настоящее время по оценкам специалистов лекарственная устойчивость приводит к 700 000 смертей в год во всем мире, и без принятия прямых мер ежегодное число смертей может достичь 10 миллионов к 2050 году. Исследования и разработка новых терапевтических средств были включены в число приоритетных предлагаемых мер по борьбе с глобальным феноменом устойчивости к противомикробным препаратам. Антимикробные пептиды представляют собой один из приоритетных вариантов (Report to the Secretary..., 2019).

Следует отметить, что распространение ИБ, вызванных мультирезистентными штаммами, представляет социальную и экономическую угрозу (Report to the Secretary..., 2019). В данной ситуации основным преимуществом использования АМП является то, что они эффективны против патогенов с множественной лекарственной устойчивостью, и по сравнению с обычными антибиотиками они вызывают гибель патогенов чрезвычайно быстро,

используя множество бактериальных мишеней (Brogden, K.A., 2005; Penetration of antimicrobial peptides..., 2018). Активное применение АМП может стать оптимальным решением для преодоления проблемы растущего числа микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам из-за их неизбирательного применения (Antimicrobial Drug Resistance..., 2012).

Согласно некоторым исследованиям, развитие резистентности у микроорганизмов к антимикробным пептидам *in vitro* маловероятно (Technological Potential of Antimicrobial..., 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. В недавнем исследовании провели сравнение бактериальной мутации *E. coli*, вызванной лечением антибиотиками с использованием катионных АМП, включая *Hyalophora cecropia* Сес А. В отличие от антибиотиков, ни один из проанализированных АМП не увеличил частоту мутаций *E. coli*. Авторы связали этот феномен неспособностью 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 минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) пептидов. Последующее лечение САМ оставалось эффективным, как против лабораторного, так и против мультиантибиотикорезистентных штаммов *P. aeruginosa*, в то время как аналогичное серийное воздействие сублетальных доз гентамицина или LL-37 увеличивало их эффективные МИК на тех же бактериальных штаммах (Cationic antimicrobial peptides..., 2019; Technological Potential of Antimicrobial..., 2020). Эти исследования предоставляют важные данные о том, что лечение с Сес и Сес-аналогами пептидов трудно индуцирует устойчивость к противомикробным препаратам. Другими исследователями было

показано, что пептид, выделенный из лягушки *Pseudis paradoxa*, проявляет мощную антибактериальную активность и оказывает значительное ингибирующее действие на образование биопленок мультирезистентными штаммами *E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Кроме этого, в экспериментах *in vivo* у ран, инфицированных синегнойной палочкой с множественной лекарственной устойчивостью, процесс регенерации проходил значительно быстрее при лечении АМП, чем необработанных ран или ран, обработанных ципрофлоксацином. Более того, АМП способствовали пролиферации инфицированной раны, уменьшая воспаление за счет подавления интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли альфа (Pse-T2, an antimicrobial peptide..., 2018).

В отличие от классических антибиотиков АМП имеют низкую вероятность развития антибиотикорезистентности, поскольку они всегда влияют на бактерии с помощью неспецифических механизмов действия (Baltzer, S.A. et al., 2011). Это представлено в недавних исследованиях в модельных экспериментах *in vitro*, подтверждающих, что развитие резистентности у микроорганизмов к антимикробным пептидам маловероятно (Technological Potential of Antimicrobial..., 2020). Вместе с тем АМП обладают противомикробной активностью по отношению к широкому спектру бактерий, в том числе, против бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, а также грибов и вирусов, вызывая их быстрый киллинг, кроме этого обладают противовоспалительными свойствами. Антимикробные пептиды могут быть использованы при конструировании противомикробных препаратов и стать перспективными аналогами классическим антибиотикам (Antimicrobial peptides from fruits..., 2017).

Полученные данные по возможному использованию АМП будут способствовать решению проблем нарушения микробиоценозов живых организмов, что в свою очередь позволит осуществлять терапию заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами.

Следует отметить, что микробиота кишечного тракта обеспечивает иммунитет макроорганизма, в кишечнике происходит ряд важных процессов,

таких как синтез витаминов и расщепление отдельных питательных компонентов. Немаловажная роль в надлежащем балансе сосуществования организма хозяина и микроба принадлежит кишечному барьеру (Saulnier, D.M. et al., 2009). Эпителиальные клетки кишечника распознают микроорганизмы с помощью различных рецепторов (Saulnier, D.M. et al, 2009). Активация этих рецепторов способствует секреции компонентов слизистого барьера, таких как иммуноглобулин А, гликопротеины муцина и антимикробные пептиды (Li'evin-Le Moal, V. et al., 2006). Эпителиальные клетки кишечника могут секретировать кателицидины, дефензины, рибонуклеазы, которые оказывают антимикробное действие на патогенные микроорганизмы и поддерживают эпителиальный слизистый барьер, обеспечивая благоприятный гомеостаз в кишечнике. Помимо этого, результаты исследований свидетельствуют о том, что АМП могут оказывать положительное влияние на микробиоценоз кишечника, стимулируя размножение полезных микроорганизмов, таких как лактобациллы и бифидобактерии (Li'evin-Le Moal, V. et al., 2006; Effects of dietary supplementation with an expressed..., 2009; Effects of dietary supplementation with antimicrobial peptide-P5..., 2013). Данный факт можно частично объяснить тем, что кишечная микрофлора способна противостоять действию антимикробных пептидов. В некоторых исследованиях сообщалось, что основные группы резидентной микрофлоры кишечника, такие как бактероиды, устойчивы к АМП, вероятно это связано с выработкой дефосфорилированного липида А, поскольку штаммы, которые не продуцируют эту молекулу, более чувствительны к действию АМП.

Отмечено позитивное влияние пищевых добавок с антимикробными пептидами на ферментативную функцию рубца и микроорганизмы рубца у коз, было выявлено, что они модифицируют микрофлору рубца, кроме этого увеличивают активность ксиланазы, пектиназы и липазы в рубце, а также концентрацию уксусной кислоты, пропионовой кислоты и общего количества летучих жирных кислот. Эти изменения способствовали приросту массы тела у коз (Effects of antibacterial peptides on rumen..., 2019).

При использовании антимикробных пептидов в качестве пищевых добавок



для поросят было доказано их влияние на усвоение питательных веществ и морфологию кишечника (Use of recombinant porcine beta-defensin..., 2016). Авторы показали, что добавление в рацион поросят рекомбинантного свиного  $\beta$ -дефензина-2 способствовало среднесуточному приросту массы тела, среднесуточному потреблению корма и увеличению высоты ворсинок кишечника в двенадцатиперстной и тощей кишках, а также снизило частоту диареи после отъема (Sang, Y. et al., 2009; Use of recombinant porcine beta-defensin..., 2016). Аналогичные результаты были получены у поросят с использованием кекропина AD, лактоферрина и антимикробного пептида-A3, P5 (синтетического) показали, что добавки с этими пептидами индуцировали показатели роста у поросят-отъемышей и цыплят бройлеров (Effects of dietary supplementation with an expressed..., 2009; Effects of dietary supplementation with an antimicrobial peptide-P5 on growth performance, nutrient retention..., 2013; Effects of dietary supplementation with antimicrobial peptide-P5 on growth performance, apparent..., 2013).

В настоящее время, опираясь на знания об иммуномодулирующих механизмах АМП, возрастает интерес к использованию их в качестве адъювантов для вакцин. Так, например, учеными рассматривалась ДНК-вакцина, кодирующая  $\beta$ -дефензин-2 и антигены *Mycobacterium tuberculosis* у мышей. Результаты исследований показали, что животные, которым сначала вводили БЦЖ, а затем АМП показали значительно более высокую выживаемость и меньшее повреждение тканей, чем мыши, вакцинированные только БЦЖ (Prime-boost BCG vaccination..., 2013). Согласно другим исследователям было показано, что добавление коротких пептидов дефензинов к неоптимальной дозе ДНК-вакцины против гепатита В, существенно повысило эффективность вакцины. При этом клеточный иммунный ответ был значительно выше в присутствии короткого пептидного адъюванта у мышей и хорьков (Pentamers not found in..., 2012).

Данные исследования показывают, что антимикробные пептиды могут быть использованы для усовершенствования схем вакцинации и будут способствовать активации иммунного ответа у животных.

Кроме этого, доказан синергетический эффект использования комбинации

АМП и обычных антибиотиков, поскольку АМП способствуют разрушению клеточной стенки бактерий, что позволяет антибиотикам проникать в цитоплазму бактерий и взаимодействовать с их соответствующими мишенями (Antimicrobial peptides: interaction..., 2018). Исследователями доказано, что АМП разных классов и различные антимикробные вещества обладают синергетическим противомикробным действием *in vivo* (Wang, G., 2010; Rosen, T., 2011). Инновационный подход заключается в использовании АМП в качестве адъювантов в комбинации с обычными антибиотиками (Combination strategies to enhance..., 2017). Одновременное лечение АМП и антибиотиками обеспечивает синергическое противомикробное действие, которое способно повысить эффективность терапии и снизить дозу, в свою очередь, минимизируя возможную токсичность побочного действия. Исследования, выполненные *in vitro* на Сес-аналоге пептида, таких как гибриды САМ или Сес-LL37, демонстрировали различные степени синергетической активности в зависимости от типа антибиотиков и видов бактерий (Fjell, C.D. et al., 2011; Lee, E. et al., 2015; Novel hybrid peptide..., 2016; Activity of antimicrobial peptides..., 2017; Cationic antimicrobial peptides..., 2019). Другими исследователями было показано, что кекропин, выделенный из трансгенных комаров *Ae. aegypti*, хорошо действует синергически с противомикробными препаратами, в частности с тетрациклином, против различных штаммов *P. aeruginosa* (Synergistic efficacy of..., et al., 2017).

Немаловажное значение имеет способность АМП запускать специфические врожденные иммунные реакции и оказывать селективные иммуномодулирующие эффекты. Антимикробные пептиды *in vivo* губительно действуют на микроорганизмы не только вследствие прямого действия, но и благодаря опосредованному киллингу через иммуномодулирующие эффекты (Сипайлова, О.Ю. и др., 2013; Mansour, S.C. et al., 2015). Было доказано, что помимо антимикробного действия, АМП играют важную роль в модуляции некоторых иммунных процессов, таких как активация иммунных клеток, заживление ран, ангиогенез, провоспалительная и противовоспалительная активности (Therapeutic potential of host..., 2012; Structural studies of a peptide..., 2010; Kumar, P. et al., 2018).

Усиленная продукция АМП в очаге воспаления вызывает сосредоточение высоких концентраций, что приводит к гибели микробной клетки. Их иммуномодулирующий эффект зависит от нескольких факторов, включая природу данного пептида, продуцирующую клетку и стимул, который вызывает их экспрессию.

Принимая во внимание антимикробные и иммунологические свойства, АМП представляют интерес, как новые противомикробные средства для лечения ИБ у различных видов СХЖ. Они могут быть использованы в качестве иммуномодулирующих средств, поскольку эти молекулы способны взаимодействовать с макроорганизмом без цитотоксических или цитолитических эффектов. АМП могут индуцировать выработку цитокинов и хемокинов, участвующих в воспалительном процессе, ускорять ангиогенез и заживление ран, а также модулировать апоптоз в многоклеточных организмах (Human neutrophil defensins..., 2000; Host defense peptides and their antimicrobial immunomodulatory..., 2011). В связи с этим, среди других процессов, АМП регулируют механизмы, такие как нейтрализация эндотоксинов, активация незрелых дендритных клеток, индукция цитокинов, заживление ран и являются проангиогенными факторами (Host defense peptides in wound..., 2008; Human defensins activate monocyte..., 2009). Кроме этого, АМП играют важную роль в модуляции нескольких иммунных процессов, таких как дифференцировка и созревание дендритных клеток и макрофагов, взаимодействуют с Т- и В-лимфоцитами, следовательно могут способствовать неспецифической профилактике ИБ СХЖ (Abbas, A. K. et al., 2009; Effects of pig antibacterial peptides..., 2009; Human defensins activate monocyte..., 2009). Например, дефензины, обычно встречающиеся в растениях, грибах, клетках насекомых и млекопитающих, представляют собой небольшие катионные пептиды из 45-54 аминокислотных остатков с сохраненной сигнатурой цистеинов, которые могут образовывать от трех до четырех дисульфидных мостиков. Было показано, что они обладают иммуномодулирующей активностью, которую можно использовать в качестве вакцинных адъювантов или при лечении пациентов с подавленным иммунитетом. Следовательно, лучшее понимание

функций и механизма действия таких молекул будет способствовать разработке препаратов для противомикробной и иммуномодулирующей терапии (Silva, P.M. et al., 2014).

Исследователи отмечают, что противомикробные, противоопухолевые, противовирусные, антипротозойные и фунгицидные эффекты способны вызывать катионные АМП, 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 способствуют увеличению титра антител после вакцинации, при этом их можно использовать совместно с веществами, которые ингибируют неферментативный фибринолиз в дефензинах, при разработке препаратов для борьбы с кровотечением при инфекционных заболеваниях и других патологических состояниях макроорганизма СХЖ (Garcia, A.E., 2008; Ojo, O.O. et al., 2011; Lehrer, R.I. et al., 2012; Maltseva, A.L., 2014).

Отдельные АМП, в частности цекропины, являются перспективными антибактериальными терапевтическими препаратами в виду их низкой токсичности по отношению к клеткам животных, человека и других млекопитающих, а также наличия противовоспалительной активности. Однако имеются некоторые сложности, связанные с относительно небольшими (чаще всего до 50 кДа) размерами данных биомолекул, что в некоторой степени затрудняет использование пептидов в качестве препаратов для эффективной терапии ИБ. Пути решения заключаются в применении нанотехнологий при конструировании препаратов на основе АМП (A novel cecropin..., 2018; Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides..., 2019).

В недавнем исследовании было продемонстрировано, что сопряжение САМ пептида с наночастицами золота усиливает противомикробную активность и стабильность САМ *in vitro* и *in vivo* на модели мышей с экспериментальным сепсисом (One-step synthesis of high-density..., 2016). Эти обнадеживающие результаты открывают новые перспективы для использования цекропинов, и

АМП в целом, в качестве терапевтических средств для лечения ИБ СХЖ.

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.

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).

Исследования АМП беспозвоночных, особенно у насекомых, все еще являются развивающейся областью. Одними из первых данные вещества были обнаружены у шелкопряда, *Hyalofora cecropia* Linnaeus (чешуекрылые: Saturniidae) и плодовой мушки, *Drosophila* Fallen (Diptera: Drosophilidae) (Sequence and specificity of..., 1981; Kylsten, P. et al., 1990). С тех пор многочисленные исследования в данной области проводятся на различных видах насекомых, таких как муравьи, пчелы, тараканы и мухи, с многообещающими результатами (Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide..., 2012; De novo transcriptome analysis..., 2016).

Потенциал антимикробного действия АМП наиболее изучен у следующих отрядов насекомых: перепончатокрылые (50%), двукрылые (17%), жесткокрылые (13%), чешуекрылые (10%), полукрылые (5%), Blattodea (3%) и Odonata (2%) (Antimicrobial peptides isolated from..., 2022). Осы, относящиеся к отряду перепончатокрылых, являются наиболее изученным объектом, на данный момент

в общей сложности изучено 18 видов ос. АМП были выделены преимущественно из яда ос (Two families of antimicrobial..., 2006; Antimicrobial peptides from the venom..., 2013). На сегодняшний момент наиболее изученным родом мух является *Drosophila*, который продемонстрировал высокий потенциал в качестве кандидата на разработку новых антибактериальных средств, которые могут быть использованы в качестве антибиотика. Что касается отряда двукрылых, то изучение АМП началось с выделения данных антимикробных веществ от мясной мухи *Sarcophaga peregrina Johnston* и мясной мухи *Phormia terranova Robineau-Desvoidy* (Insect immunity: isolation from..., 1989; Determination of the disulfide..., 1990).

Эти исследования послужили основой и являлись обоснованием выбора биологических объектов, а именно *Galleria mellonella*, *Musca domestica*, *Hermetia illucens*, для выделения АМП в данной диссертационной работе.

По результатам исследований *in vitro* можно заключить, что использование антимикробных пептидов имеет многообещающую перспективу для применения этих многофункциональных молекул в ветеринарии, в том числе для лечения заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными микроорганизмами. Наряду с этим следует отметить, что в ветеринарной медицине для обоснования эффективности применения антимикробных пептидов необходимо проводить больше исследований *in vivo*, которые могут быть сопоставлены с результатами получаемыми *in vitro* (Structure–activity relationship..., 2010, Hocquellet, A., 2012; Inhibition of porcine reproductive..., 2015).

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 (Gordon, Y. J. et al., 2005; Natural roles of antimicrobial... 2011; Chernysh, N. et al., 2015).

Таким образом, потенциал антимикробных пептидов и их использование для разработки средств, пригодных для лекарственной профилактики и/или

терапии ИБ СХЖ, очевиден. Актуальность создания экспериментальных препаратов на основе АМП, как принципиально нового класса антибиотиков, обусловлена возможностью их использования в терапии мультиантибиотикорезистентных штаммов возбудителей ИБ СХЖ без развития АМП-ассоциированной резистентности, как это наблюдается в последние десятилетия в результате применения большинства классических антибиотиков (Li, S.S. et al., 2003).

#### **1.4. Современный взгляд на актуальные патогены и потенциал использования антимикробных пептидов при инфекционных болезнях животных**

Современные тенденции производства животноводческой продукции, связанные с интенсификацией производства, способствуют увеличению роли пищевых патогенов и убиквитарных микроорганизмов в инфицировании продуктов питания. С другой стороны, увеличение народонаселения, спроса и роста производства пищевой продукции, обуславливают угрозу глобальной продовольственной безопасности и стимулируют к поиску механизмов преодоления данной проблемы.

Наиболее распространенными заболеваниями данной группы являются сальмонеллез, колибактериоз, а также микроорганизмы *B. cereus* и *S. aureus*, которые оказывают значительное влияние на инфицирование пищевой продукции (Prevalence of antimicrobial resistance..., 2021, Examination of *Escherichia coli*..., 2002, A systematic review and..., 2023, Occurrence and characterization of..., 2023).

Сальмонеллез - зооноз пищевого происхождения, вызывающий желудочно-кишечные заболевания, и представляющий опасность селекцией штаммов с генами лекарственной устойчивости. *Salmonella spp.* признаны основными зоонозными патогенами, имеющими экономическое значение для животных и человека; инфекция, вызываемая этими бактериями, является одним из наиболее часто регистрируемых заболеваний пищевого происхождения во всем мире. Хотя снижение заболеваемости *S. typhi* последовало за улучшением гигиены и

санитарии, за последние два десятилетия произошло несколько международных эпидемий сальмонеллезной инфекции. Эти вспышки были зарегистрированы среди людей вслед за заболеваниями животных на фермах интенсивного животноводства (домашняя птица, крупный рогатый скот, свиньи) (Prevalence of antimicrobial resistance..., 2021).

Ибрагим и др., сообщили о высокой распространенности мультирезистентных штаммов *Salmonella spp.* и *E. coli* из-за чрезмерного использования противомикробных средств в период откорма бройлеров на фермах восточного побережья Малайзии (Prevalence of antimicrobial resistance..., 2021). Другие ученые выявили, что производство органического мяса цыплят было связано с большим риском заражения сальмонеллой, чем при традиционном методе (Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella*..., et al., 2020).

Кроме того, в последние годы значительно увеличилось число штаммов возбудителей сальмонеллеза, устойчивых к нескольким антибиотикам. Рост устойчивости к противомикробным средствам постепенно сокращает количество вариантов противомикробных препаратов, доступных для лечения инфекций, что ставит под угрозу здоровье человека и животных, а также жизнеспособность продуктивного стада (World Organisation for Animal Health. OIE annual report, 2020).

Штаммы *E. coli* в основном колонизируют пищеварительный тракт, как животных, так и людей, где в качестве комменсала они являются частью естественного микробиома и способствуют поддержанию гомеостаза макроорганизма. Это условно-патогенный вид бактерий, который становится патогенным при нарушенной иммунной системе хозяина (Examination of *Escherichia coli*..., 2002). В то же время, существуют группы условно-патогенных штаммов, которые приобрели в процессе эволюции признаки вирулентности и способны при определенных обстоятельствах инфицировать животных. Штаммы *E. coli* являются частью нормальной флоры, а, иногда, при определенных обстоятельствах, вызывают широкий спектр инфекций. Большинство штаммов возбудителей ИБ СХЖ обладают множественной лекарственной устойчивостью к



разным группам антибиотических препаратов, зачастую обуславливая отсутствие эффективности противомикробной терапии. Из-за растущего числа данных микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, и отсутствия эффективных методов борьбы с распространением бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, АМП рассматриваются в качестве одной из основных многообещающих альтернатив традиционным средствам антибактериальной терапии (Костина, Д.А., 2013).

Другим важным патогеном пищевого происхождения считаются представители *S. aureus* (Prevalence and characterization..., 2019). Стафилококки выделяют от млекопитающих во всем мире, они колонизируют носовую полость людей, кожу, слизистые оболочки и могут быть частью транзитной микрофлоры кишечного тракта. Стафилококки могут длительное время сохранять жизнеспособность в окружающей среде в этой связи возможна непрякая передача возбудителя в организм животных и человека. Золотистый стафилококк относится к полигостальным возбудителям ИБ, поскольку является патогеном нескольких хозяев, может вызывать инфекции у СХЖ (диких, домашних животных), а также внутрибольничные инфекции у людей (Risk and outcome of..., 2004). Культура *S. aureus* является универсальным видом, о чем свидетельствуют молекулярные исследования, с помощью которых выявлены клоны, в изобилии встречающиеся как у людей, так и у животных-хозяев (The evolutionary genomics of host..., 2020). Проведенные исследования продемонстрировали определенную взаимосвязь появления таких клональных линий стафилококков с частой сменой хозяина в разные периоды времени года. Однако ключевой вопрос, который еще не полностью решен, заключается в том, существуют ли какие-либо дополнительные бактериоспецифические факторы, влияющие на передачу и патогенность штаммов *S. aureus* для различных хозяев - людей и животных, особенно домашнего скота и животных-компаньонов, живущих в непосредственной близости от людей, и степень, в которой известные и новые факторы приводят к межвидовому переключению. Недавние данные вновь выявили влияние человеческой деятельности, включая разведение животных и использование

антибиотиков у людей и животных, на многовидовую эволюцию и экологию *S. aureus*. Другие геномные исследования также показали различную распространенность генов, ассоциированных с вирулентностью, у разных хозяев, что связано с переключением хозяина и событиями адаптации у *S. aureus* (Prophage-encoded immune..., 2022). На сегодняшний день не существует одобренной вакцины против инфекций, вызванных *S. aureus* (Immunoinformatics analysis and evaluation..., 2021).

Стафилококки устойчивы к действию бета-лактамовых антибиотиков, что чаще всего обусловлено пенициллиназой, кодируемой плазмидой (бета-лактамазой). Толерантность является менее распространенной формой резистентности к пенициллину и, как полагают, обусловлена недостаточностью аутолитических ферментов клеточной стенки. Кроме того, устойчивость к другим противомикробным препаратам также распространена среди стафилококков.

Золотистый стафилококк и кишечная палочка обладают различными механизмами резистентности, которые делают их устойчивыми к многочисленным противомикробным препаратам. Это вызывает затруднения при лечении заболеваний, вызванных такими микроорганизмами, и создает предпосылки к поиску альтернативных противомикробных препаратов. Такими примерами являются метициллинрезистентный золотистый стафилококк и кишечная палочка, проявляющая устойчивость к  $\beta$ -лактамам или карбапенему расширенного спектра действия (Rodvold, K.A. et al, 2014; Antimicrobial Susceptibility Trends Among..., 2022). Основными этиологическими агентами инфекций кровеносного русла являются золотистый стафилококк, кишечная палочка, виды *Klebsiella*, *Streptococcus pneumoniae* и сальмонелла (Patterns of bacteraemia..., 2017).

Штаммы *B. cereus* – это убиквитарные спорообразующие микроорганизмы, способные часто контаминировать продукцию животноводства и являющиеся возбудителями пищевых токсикоинфекций у людей. Благодаря обильному присутствию этой бактерии в естественной среде и ее способности образовывать эндоспоры, она может выживать в суровых условиях окружающей среды, что

приводит к выносливости в широком диапазоне температур и рН; кроме того, способность бактериальных клеток прикрепляться к поверхностям из нержавеющей стали, образуя биопленки, делает их более неуязвимыми (A systematic review..., 2023). Все эти факторы помогают им выживать, а также размножаться в окружающей среде. Устойчивые споры этих бактерий защищают их от пищевой обработки, такой как сушка, пастеризация и т.д. В период с 1990 по 2020 гг. в результате проведенных исследований было выявлено, что распространенность *B. cereus* в мире составила 23,746 %. Наиболее часто представители *B. cereus* обнаруживались в восьми группах продуктов питания, среди которых лидировали злаки и бобовые - 41,49 % и 44,9 %, соответственно, овощи - 37,28 % и молочные продукты - 36,39 % (Rahnama, H. et al., 2023). *B. cereus* был причастен к 1-22% вспышек пищевых токсикоинфекций в Европе, Японии и Северной Америке (*Bacillus cereus* food poisoning..., 2002). Кроме того, *B. cereus* был признан вторым и третьим по степени опасности патогеном пищевого происхождения во Франции и Китае, соответственно (*Bacillus cereus*-Induced food-borne..., 2016; Мао, Х., et al., 2010). При исследовании молока и молочных продуктов в Египте было выявлено, что 90 % изолятов *B. cereus* имели множественную антибиотикорезистентность, в 96,69% случаев к ампициллину, в 96,69% - амоксициллину, в 95,04% - оксациллину и в 90,08% - стрептомицину (Occurrence and characterization of toxigenic..., 2023). В Тайланде 97 % изолятов *B. cereus*, выделенных из различных пищевых продуктов, обладали устойчивостью к пенициллину и ампициллину (Sornchuer, P. et al., 2021). Принимая во внимание, выявление антибиотикорезистентных штаммов *B. cereus*, наличие спор и высокую контаминацию пищевых продуктов создает необходимость для разработки мер борьбы с данным патогеном.

Отдельные исследования подтверждают, что активное использование АМП различного происхождения в секторе животноводства способствовало снижению количества патогенных бактерий, таких как *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Clostridium spp.* и *Staphylococcus spp.* в разных отделах кишечного тракта поросят-отъемышей (Effects of dietary supplementation with an expressed..., 2009; Effects of dietary

supplementation with antimicrobial peptide-P5..., 2013). Эти данные открывают огромные перспективы для использования АМП в сфере животноводства, в том числе с профилактической целью, учитывая, что указанные возбудители ИБ СХЖ часто вызывают тяжелое течение заболеваний вплоть до фатального исхода (Occurrence of *Salmonella*..., 2010; Acquisition of *Clostridium*..., 2011). Другие исследователи сообщили о выделении и характеристике нового богатого глицином АМП, выделенного из личинок *Drosophila virilis*. Пептид SK84 проявлял антибактериальную активность в отношении тестируемых грамположительных бактерий *B. subtilis*, *Bacillus thuringiensis* и *S. aureus*, но не оказывал действия на грамотрицательные бактерии *P. aeruginosa*, *E. coli* и грибы *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*. SK84 оказывал специфическое ингибирующее действие на пролиферацию нескольких линий раковых клеток (лейкоз человека ТНР-1, рак печени HepG2 и молочной железы раковые клетки MCF-7), но не проявлял гемолитической активности (Lu, J. et al., 2010).

Исследователями из Китая была продемонстрирована возможность использования АМП, выделенных из *M. domestica*, предварительно инфицированных смесью бактерий *S. aureus* и *E. coli*. Обработка Md-АМП отдельно или в комбинации с низином и этилендиаминтетрауксусной кислотой эффективно подавляла рост бактерий в охлажденной свинине при хранении в холодильной камере при 4°C, и продлевала срок годности в 2 раза (Antimicrobial peptides from the edible..., 2019).

Биологические свойства АМП в сочетании с современными достижениями в области биотехнологии способствуют возрастающему интересу к АМП насекомых в виду их высокого потенциала в борьбе с современными биомедицинскими вызовами.

Таким образом, вышеприведенные исследования подтверждают антимикробную активность АМП по отношению к возбудителям ряда пищевых инфекций и возможность их использования для разработки противомикробных препаратов. Вместе с тем, остается не достаточно изученным факт антимикробной активности пептидов по отношению к нескольким инфекционным

агентам, являющимся возбудителями пищевых инфекций, в том числе зоонозов, что представляет значительный интерес. Данное обстоятельство обусловлено широким распространением этих инфекций, антибиотикорезистентностью штаммов и необходимостью их контроля. Кроме этого, получение пептидов из различных насекомых, обладающих широким спектром защитных механизмов, представляет значительный потенциал и дальнейшую перспективу их сочетанного использования (Овчинникова, Т.В. и др., 2005; Баландин, С.В. и др., 2008; Яковлев, А.Ю. и др., 2015; Хогенхауг, Х-Х. К. и др., 2017).

В целом обзор данных литературы подчеркивает актуальность темы данной работы с перспективами разработки совершенно новых молекул для широкого применения в области ветеринарии и здравоохранения с высоким терапевтическим потенциалом и широким спектром сопутствующих эффектов.

## 2. Собственные исследования

### 2.1. Объекты исследования

Антимикробные пептиды получали из следующих биологических объектов: *Galleria mellonella*, *Musca domestica*, *Hermetia illucens*.

*Galleria mellonella* - большая восковая моль, огневка пчелиная *G. mellonella* – вредитель медоносных пчел из семейства огневки настоящей, отряда чешуекрылые. 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 (Коновалова, Т.В., 2009; Чугреев, М.К. и др., 2014).

*Musca domestica* - муха домашняя, принадлежит к отряду двукрылых, из всех видов семейства *Muscidae* они наиболее многочисленны. Окрас тела имаго чаще всего серый, бурый или черный, длина 6-8 мм. Тело и ноги покрыты многочисленными волосками и щетинками. Крылья прозрачные, перепончатые с поперечными и продольными жилками.

*Hermetia illucens* – чёрная львинка (отряд двукрылые), имаго в длину от 15 до 20 мм, имеют слабовыраженный, лижущий ротовой аппарат, предназначенный только для питья. Мухи черные с дымчато-черными крыльями, плотные, покрытые мембранами. Голова имаго короткая и широкая, глаза широко разведены, у обоих полов насекомого. Усики представляют собой удлинённые жгутики в два раза длиннее головы с длинным концевым сегментом (Sheppard, et al., 2002; Paola, et al., 2013).

Для проведения исследований были использованы следующие микроорганизмы: *S. aureus* ATCC 6538 (209-P); *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. Выбор данных микроорганизмов был обусловлен, тем, что эти биологические агенты являются наиболее частыми причинами пищевых

токсикоинфекций, в том числе зоонозов.

Бактерии *S. typhimurium* 1626 – подвижные, грамотрицательные короткие палочки с закругленными концами, спор и капсул не образуют. На агаре Хоттингера образуют нежные, круглые, гладкие, полупрозрачные колонии; на бульоне Хоттингера вызывают равномерное помутнение бульона. Ферментирует до кислоты и газа глюкозу, маннит, мальтозу, арабинозу, глицерин. Не ферментирует лактозу, сахарозу. Образует сероводород, индол.

Культуры *E. coli* 1027 - это факультативно-анаэробные бактерии, которые встречаются в кишечном тракте почти всех теплокровных животных и человека. Грамотрицательные прямые палочки, часто располагающиеся попарно. На плотных средах отмечали полупрозрачные, круглые и выпуклые колонии; на жидких - равномерное помутнение. Температурный оптимум роста 37 °С, рН 7,2.

Бактерии *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) – грамположительные кокки, которые располагаются, как правило, группами или в виде гроздей винограда, неподвижны, спор и капсул не образуют. На плотной питательной среде образуют круглые, выпуклые, зернистые, пигментированные колонии с ровными краями, на кровяном агаре дают значительную зону гемолиза, при росте на желточно-солевом агаре образуют мутные, круглые колонии, ровные пигментированные колонии с четкой зоной лецитиназы; в бульоне вызывают равномерное помутнение с последующим выпадением рыхлого хлопьевидного осадка. Факультативные анаэробы, каталазоположительны, оксидазоотрицательны, неподвижны.

Культуры *B. cereus* ATCC 10702 - грамположительные, палочковидные и спорообразующие бактерии, обладают подвижностью. На МПА образуют большие колонии с неровными краями. На жидких средах вызывают помутнение бульона, дают белый хлопьевидный осадок и нежную пленку на поверхности. Температурный оптимум 30 °С, рН 7-9,5.

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Методика выделения водорастворимых пептидов из личинок

#### *G. mellonella*, *M. domestica* и *H. illucens*

Выделение водорастворимых пептидов из биомассы личинок *G. mellonella*, *M. domestica* и *H. illucens* проводили отдельно для каждого вида насекомых методом холодной экстракции, взяв за основу нижеприведенный метод, который был модифицирован под объекты настоящего диссертационного исследования для выделения пептидов, обладающих определенными свойствами, в том числе растворимостью в воде, что является необходимым условием для дальнейшего применения в качестве антибактериального средства (Швайцер М. и др., 2009).

Методика включала следующие этапы, которые также проводили отдельно для биомассы каждого вида насекомых:

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

Для получения искомым пептидов использовали биомассу личинок *G. mellonella* после 24 суток культивирования (до окукливания) и 40 суток (на стадии окукливания); *H. illucens* - 15 суток культивирования; *M. domestica* - 5 суток культивирования. Из биомассы каждого вида личинок насекомых отдельно подготавливали навеску массой 3 г, которую растирали в ступке со стерильным кварцевым песком (марки ОВС-0-20В ГОСТ 22551-2019) 5 г в течение 1-2 часов до однородной массы. Далее в процессе гомогенизации добавляли по 0,5 мл раствора 0,25% азида натрия, 20 мл раствора фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и перемешивали в течение 2 ч. Полученную смесь центрифугировали в 50 мл пробирке (Центрифужная пробирка винтовая крышка, ПП, 50 мл, Китай).



Каждый образец 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). Надосадок маслянистой консистенции (около 1 см) декантировали, а осадок удаляли.

В надосадок добавляли по 5 мл ФСБ, перемешивали и повторно центрифугировали в течение 30 мин при температуре 5 °С со скоростью 4200 об/мин. Надосадок отделяли, как описано выше.

Для проведения стадии высаливания рассчитывали массу сульфата аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  по формуле 76,4 г на 100 мл (Николаев, А.Я., 2004). Для этого готовили 100% раствор реагента путем добавления 76 г сухого вещества (сульфат аммония ГОСТ 9097-82, Россия) на 100 мл раствора, для этого к раствору на магнитной мешалке добавляли пятую часть расчетного количества сульфата аммония и после его полного растворения центрифугировали при температуре -5 °С со скоростью 4200 об/мин на протяжении 30 мин, осадок собирали в пробирки объемом 15 мл (центрифужная пробирка винтовая крышка, ПП, 15 мл, Китай), а с надосадком производили аналогичную манипуляцию, всего пять раз до достижения концентрации сульфата аммония в растворе расчетного. Таким образом, получали пять осадков пептидов выделенных при концентрации сульфата аммония от заданного (20% - образец -1, 40% образец - 2, 60% образец - 3, 80% образец - 4, 100% образец – 5). Полученные образцы (n = 1-5) хранили при температуре - 20 °С для последующих манипуляций.

### **2.2.2. Методика разделения водорастворимых пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Полученные образцы были проанализированы и разделены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с подбором оптимальных растворителей и условий для проведения хроматографирования. Предварительно, до хроматографического разделения в образцы добавляли

небольшое количество раствора ФСБ для растворения осадка, и только потом раствор вводили в инжектор хроматографа (Стайер Аквилон, Россия).

Колонкой для проведения ВЭЖХ была выбрана следующая модель: BioSep S2000 300x2120 мм (Phenomenex, USA). Разделение проводилось при длине волны 280 нм, при объеме петли 1575 мкл, элюентом служил 0,1 М ФСБ. Анализ осуществляли в следующих условиях: температура колонки 25 °С, объем вводимой пробы - 20 мкл, скорость потока - 1,0 мл/мин, время анализа 60 мин.

### **2.2.3. Определение содержания белка, молекулярной массы и аминокислотного состава выделенных пептидов**

Содержание белка в анализируемых образцах водорастворимых пептидов определяли по методу Лоури с применением реактива Фолина (Protein measurement with..., 1951). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин (БСА). Для каждой серии вновь приготовленного реактива Фолина строили новый калибровочный график.

Концентрацию белка анализируемых фракций определяли колориметрическим методом по Лоури на спектрофотометрическом оборудовании UV-1280 фирмы «Shimadzu» (Япония) при длине волны 450 нм. Молекулярную массу выделенных пептидов определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-Na) с использованием камеры Helicon (Россия) и блока питания PowerPac Basic (BIO-RAD, США) в соответствии с рекомендациями с незначительными модификациями (Schagger, H. et al., 1987).

Определение протеиногенных аминокислот в белковых фракциях проводили с помощью системы «КАПЕЛЬ® 105М» согласно методике (Майорова, Н.А., 2009).

#### 2.2.4. Методика определения антимикробной активности

Для определения чувствительности к антибиотикам изучаемых штаммов использовали индикаторные диски для определения чувствительности микроорганизмов к лекарственным препаратам производства ООО «Нита-Фарм» (Россия) (Методические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2021).

Антибактериальную активность выделенных пептидов определяли согласно методике МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания» (МУК 4.2.1890-04, 2004). Изучение антибактериальной активности проводили макро- и микрометодом. При использовании микрометода в лунки планшетов вносили 0,2 мл инокулюмов указанных ниже штаммов микроорганизмов в концентрации  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл, после чего к ним добавляли испытуемые пептиды в следующих концентрациях: 0,15; 0,31; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 мг/л. Эксперименты выполняли в трех повторностях. Культивирование проводили при температуре 37 °С в течение 24 ч с последующим учетом полученных результатов.

Кроме этого использовали методику ОФС.1.2.4.0010.15 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар» (ОФС.1.2.4.0010.15 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар»).

В исследованиях использовали следующие культуры микроорганизмов из музея кафедры микробиологии и биотехнологии ФГБОУ ВО Вавиловский университет: для изучения антибактериальной активности пептидов 3.1-3.6 д/о (до окукливания), 3.1.-3.6 с/о (стадия окукливания), 1.2, 2.1-2.7, 3.1-3.6, 4.1, 4.2, 6.1, выделенных из *G. mellonella*; пептидов 1-6, выделенных из *M. domestica*; пептидов 1-7, выделенных из *Hermetia illucens* использовали следующие штаммы: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P), *Salmonella typhimurium* 1626, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов; *B. cereus* ATCC 10702, любезно предоставленный ФГБУ "Государственный научно-исследовательский институт

генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт»; *E. coli* 1027, полученный из Городской санитарно-эпидемиологической станции г. Саратова.

### **2.2.5. Изучение острой токсичности белковых фракций АМП**

Изучение общетоксического действия АМП на биомоделях (белых мышах) проводили в соответствии с «Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» (Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, М., 2005). Для этого поочередно готовили навески всех изучаемых фракций АМП массой 5 г, помещали в аналитическую колбу объемом 50 мл и доводили до метки физиологическим раствором, таким образом, получали 10 % растворы. Затем полученные растворы вводили белым беспородным мышам в соответствующих объемах внутрибрюшинно и внутривентриально. Для внутривентриального введения использовали желудочный зонд. До внутривентриального введения животные оставались голодными 3-4 часа, и после введения испытуемого раствора АМП корм отсутствовал 1-2 часа.

### **2.2.6. Методика определения локализации 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 Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения ФГБУН ФИЦ «Саратовский научный центр Российской академии наук», (г. Саратов).

АМП конъюгировали с флуорисцеин изотиоцианатом (ФИТЦ) по следующей методике (Иммунологические методы. Под ред. Фримеля Г., 1987). 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 ФИТЦ,

чтобы достичь оптимального соотношения красителя и белка. К раствору АМП медленно, по каплям, при постоянном помешивании добавляли раствор свежеприготовленного ФИТЦ. С этой целью 1 мг ФИТЦ растворяли в 2 мл 0,1 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Процесс конъюгирования проводили в течение 18 ч при температуре 4°C в темноте, затем избыток красителя удаляли гель-фильтрацией на колонке ПД-10 (Cytiva, США), уравновешенной ФСБ. Раствор, который содержал меченые АМП и свободный краситель, аккуратно наносили на колонку, которую промывали ФСБ. Меченые АМП двигались через сефадекс быстрее, чем свободный краситель, и при прохождении через колонку были визуализированы в виде окрашенной полосы. Для изучения локализации пептидов в тканях и органах белых мышей использовали белых нелинейных мышей ( $n = 10$ ), массой 20 г. Первой группе мышей ( $n = 5$ ) АМП, меченые ФИТЦ, вводили внутримышечно в верхнюю треть бедра в дозе 100 мкл, вторую группу мышей ( $n = 5$ ) обрабатывали внутрибрюшинно в дозе 100 мкл. Через 24 ч после начала эксперимента проводили эвтаназию животных обеих групп согласно Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes, 1986). Мазки-отпечатки готовили постмортально из образцов почки, печени, селезенки, костного мозга и крови каждого животного. Микроскопирование мазков-отпечатков проводили на флуоресцентном микроскопе «Leica DMI 3000B» (Германия). Анализ и поиск поля зрения изображения достигался при помощи видеокамеры Leica DFC420C (Германия), а также программного обеспечения Leica Application Suite (<https://www.leica-microsystems.com/products/microscope-software/p/leica-application-suite/>, Германия).

### 2.2.7. Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили с вычислением средней арифметической абсолютных и относительных величин ( $M$ ), средней ошибки средней арифметической ( $m$ ), коэффициента достоверности различия

средних ( $t$ ) общепринятыми методами (Ашмарин, И.П. и др., 1962). Уровень значимости ( $P$ ) для различия между средними значениями вычисляли при помощи критерия  $t_p$  Стьюдента – Фишера. Для построения графиков, диаграмм и выполнения сканограмм использованы программы «Excel» и «Photoshop», реализованные на персональном компьютере с процессором «Intel Core i5-7400». Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## 2.3. Результаты исследований и их обсуждение

### 2.3.1. Выделение белковых фракций из личинок *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* и изучение их физико-химических свойств

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

Таким образом, методика, разработанная нами и включающая в себя гомогенизацию, экстракцию, последующее центрифугирование, многократное высаливание, повторное растворение, позволила максимально полноценно извлекать водорастворимые пептиды из биомассы насекомых.

Для дальнейшей оптимизации получения максимального количества белковой концентрации, проводили разделение белковых фракций методом ВЭЖХ, результаты данных экспериментов представлены ниже: для *G. mellonella* в таблицах 1-6 и на рисунках 1-7, *M. domestica* в таблице 7 на рисунке 8, и *H. illucens* в таблице 8 и на рисунке 9.

На первом этапе проводили разделение биомассы личинок *G. mellonella* на двух стадиях выращивания: до окукливания (Рисунок 1, Таблица 1) и на стадии окуливания (Рисунок 2, Таблица 2).

Как видно из рисунка 1, в первом случае на хроматограмме визуализировалось 7 пиков различной площади, из которых преобладали

пики № 3-5 со средним временем удерживания (37 – 43 мин) (Таблица 1).

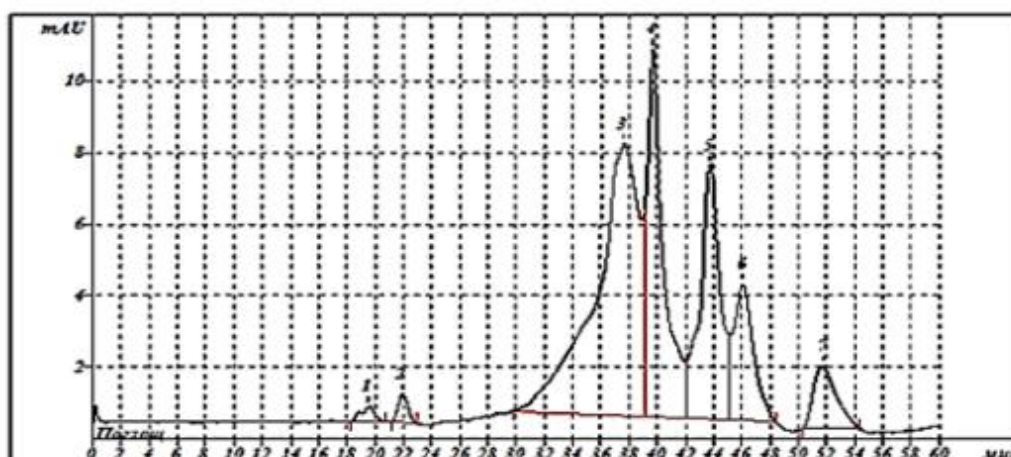


Рисунок 1 – Хроматограмма белковых фракций, выделенных из биомассы личинки *G. mellonella* на стадии до окукливания

Однако увеличение времени удерживания до 46-51 минут хотя и приводило к явному уменьшению площади и величины пиков (№ 6-7) без значительного влияния на объем полученных фракций относительно образцов № 4-5 (примерно 3,0 - 4,0 мл), позволило получить максимальную концентрацию белка – примерно на 30% больше по сравнению с доминирующими пиками № 3-4 (Таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика белковых фракций, полученных из биомассы личинок *G. mellonella* на стадии до окукливания методом ВЭЖХ

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Площадь пика, mAU · сек	Хроматографический выход, %	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общая масса белка, мг
1	19,56	29,35	0,77	1	52,56±0,43	52,56
2	21,88	38,19	1,04	0,8	73,49±0,36	58,792
3	37,72	1644,01	43,21	9	11,26±0,21	101,34
4	39,75	823,04	21,63	3	35,6±0,18	106,8
5	43,80	706,78	18,55	3	39,23±0,26	117,69
6	46,07	367,15	9,65	3	41,27±0,79	123,81
7	51,72	196,87	5,15	3,9	35,64±0,87	138,996
	Всего	3805,37	100,00	23,7		699,988



Фракции № 1-2 объемами до 1,0 мл, содержащие наибольшее количество белка (мг/мл), в целом по суммарному выходу почти в 2,8 раза уступали образцу № 7 – по площади пиков в 6,7 и 5,2 раза, соответственно, хотя время удержания при этом было увеличено в среднем в 2,5 раза. Применение метода ВЭЖХ для выделения пептидов из личинок того же насекомого, *G. mellonella* на стадии окукливания также позволило нам выделить 7 отдельных фракций с различной площадью пиков. Как и в предыдущем случае, наибольшей площадью отличались пики № 3-5 (Рисунок 2). При этом пик № 2 по высоте явно не уступал доминирующему пику № 4, а пики № 6-7 по данному параметру оказались сравнимы с пиком № 1. Объем полученных фракций и белковая концентрация содержащихся в них пептидов также варьировали. Максимальный объем (13 мл) регистрировался для пика № 3, лидирующего по площади и хроматографическому выходу (Таблица 2), но отличающегося от остальных шести фракций наиболее низким содержанием белка в единице объема (мг/мл). Напротив, в образцах 4 и 5 при объеме 3 мл отмечали высокую концентрацию белка в 4,6 и 5 раз больше, чем в образце 3. Площадь пика № 1 была в 2 раза меньше, чем у пиков 6 и 7 соответственно вместе с тем, концентрация белка (мг/мл) варьировала незначительно.

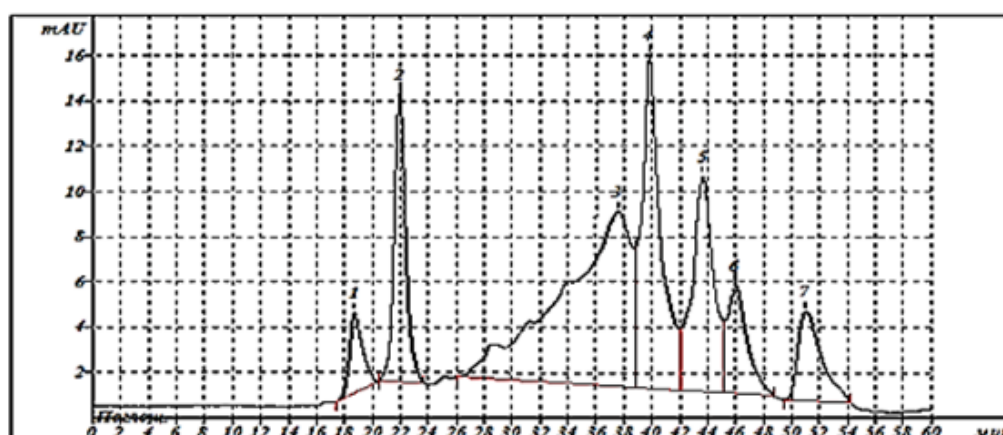


Рисунок 2 – Хроматограмма белковых фракций, выделенных из биомассы личинки *G. mellonella* на стадии окукливания

В целом, аналогично первому эксперименту (Рисунок 1, Таблица 1), и в этом случае увеличение времени удержания в 2,7 раза (с 18 до 51 мин) также позволило в 2 раза увеличить суммарное количество полученных пептидов.

Таблица 2 – Сравнительная характеристика белковых фракций, полученных из биомассы личинок *G. mellonella* на стадии окукливания методом ВЭЖХ

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Площадь пика, mAU · сек	Хроматографический выход, %	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общая концентрация белка, мг
1	18,75	227,45	3,27	2	25,35±0,31	50,7
2	21,94	742,31	10,66	4	14,83±0,12	59,32
3	37,63	2669,49	38,33	13	7,83±0,21	101,79
4	39,84	1373,62	19,73	3	35,9±0,39	107,7
5	43,69	1020,41	14,65	3	39,37±0,37	118,11
6	46,00	472,71	6,79	4,5	27,64±0,11	124,38
7	51,06	457,75	6,57	4	34,51±0,09	138,04
	Всего	6963,74	100,00	33,5		700,04

Таким образом, нами не обнаружено принципиальных различий в количестве полученных образцов пептидов при использовании биомассы личинок *G. mellonella* на стадии до окукливания или на стадии окукливания. Общее содержание белка в обоих случаях фактически оказалось одинаковым - около 700 мг. Поскольку подготовка биомассы личинок данного насекомого до окукливания занимает меньше времени (меньше 25 дней), очевидно, что с экономической точки зрения (если считать материальные затраты), то оптимальным для получения препаративного количества пептидов следует считать первый эксперимент. В этой связи дальнейшие исследования мы проводили, используя биомассу личинок на стадии до окуливания для всех видов исследуемых насекомых (*G. mellonella*, *M. domestica* и *H. illucens*).

При хроматографии белковой фракции № 2, выделенной из биомассы личинок *G. mellonella*, нами обнаружена ее относительно высокая гетерогенность – на хроматограмме четко прослеживалось 7 отдельных

пиков (Рисунок 3), соответствующих 7 фракциям объемом 1-6 мл с концентрацией белка примерно 1-45 мг/мл (Таблица 3).

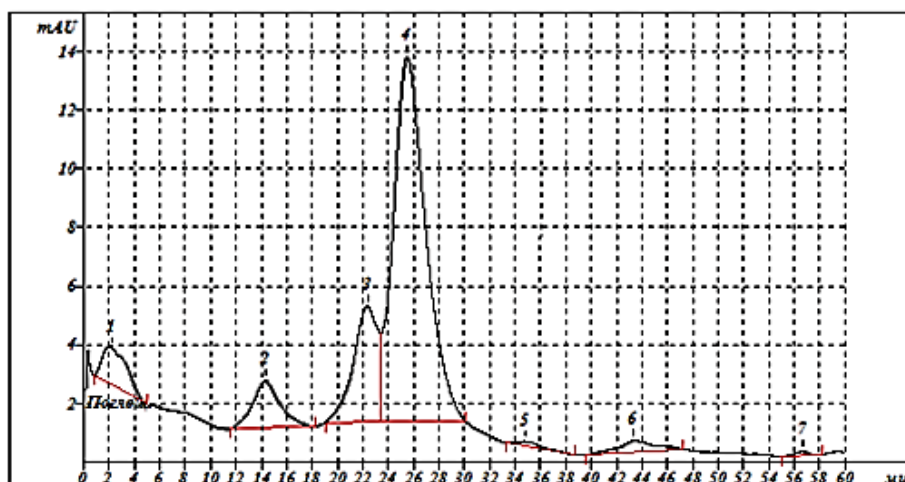


Рисунок 3 – Хроматограмма белковой фракции 2, выделенной из биомассы личинок *G. mellonella*

Таблица 3 – Сравнительная характеристика белковых фракций № 2, полученных из биомассы личинок *G. mellonella* методом ВЭЖХ

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Площадь пика, мАУ · сек	Хроматографический выход, %	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общая концентрация белка, мг
2.1	2,15	170,32	5,24	3	6,98±0,19	20,94
2.2	14,27	240,26	7,38	4	7,39±0,21	29,56
2.3	22,35	524,57	16,12	4	16,12±0,11	64,48
2.4	25,52	2212,25	68,00	6	45,33±0,14	271,98
2.5	34,87	21,03	0,65	1	2,59±0,09	2,59
2.6	43,46	74,91	2,30	2	4,61±0,08	9,22
2.7	56,65	10,11	0,31	1	1,24±0,05	1,24
	Всего	3253,44	100,00	21		400,01

Однако в отличие от первоначального эксперимента (Рисунок 1, Таблица 1), именно во фракции 2.4 с наибольшей площадью пика определялось содержание белка, максимальное по сравнению с другими элюентами (Таблица 3). Можно отметить фракцию 2.3 с концентрацией белка 16,12 мг/мл и площадью пика в 4,2 раза меньше фракции 2.4. Остальные пики были незначительными по площади и с концентрацией белка 1.24-7.39.

При этом не было отмечено четкой корреляции количества белка в отдельной пробе и времени удерживания.

Не менее гетерогенной по составу оказалась и фракция № 3, в результате хроматографии которой нами также было обнаружено относительно большое количество пиков (Рисунок 4).

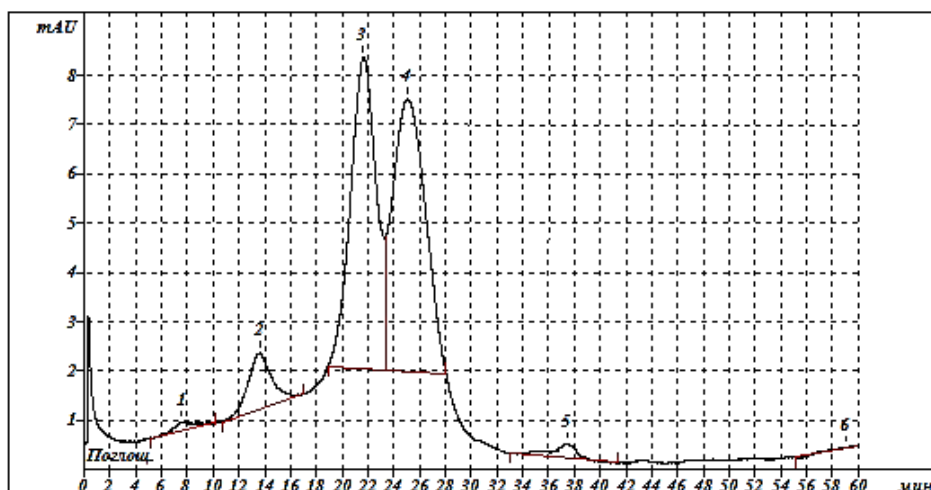


Рисунок 4 – Хроматограмма белковой фракции 3, выделенной из биомассы личинок *G. mellonella*

Таблица 4 – Сравнительная характеристика белковых фракций, полученных из биомассы личинок *G. mellonella* методом ВЭЖХ

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Площадь пика, mAU · сек	Хроматографический выход, %	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общая концентрация белка, мг
3.1	7,63	18,10	0,88	2	2,65±0,09	5,3
3.2	13,58	139,46	6,81	4	10,22±0,11	40,88
3.3	21,67	879,51	42,95	5	51,54±0,12	257,7
3.4	25,06	971,21	47,43	3	94,86±0,21	284,58
3.5	37,43	39,11	1,91	2	5,73±0,08	11,46
3.6	59,00	0,28	0,01	2	0,04±0,03	0,08
	Всего	2047,67	100,00	18		600,0

Наибольшую площадь пика отмечали у образцов 3.3 и 3.4 при объеме образца 5 и 3 мл, при этом концентрация белка также была максимальной по

сравнению с остальными фракциями. Фракция 3.2 по площади пика и концентрации белка значительно превышала остальные, однако, значительно уступала фракциям 3.3 и 3.4 по этим показателям.

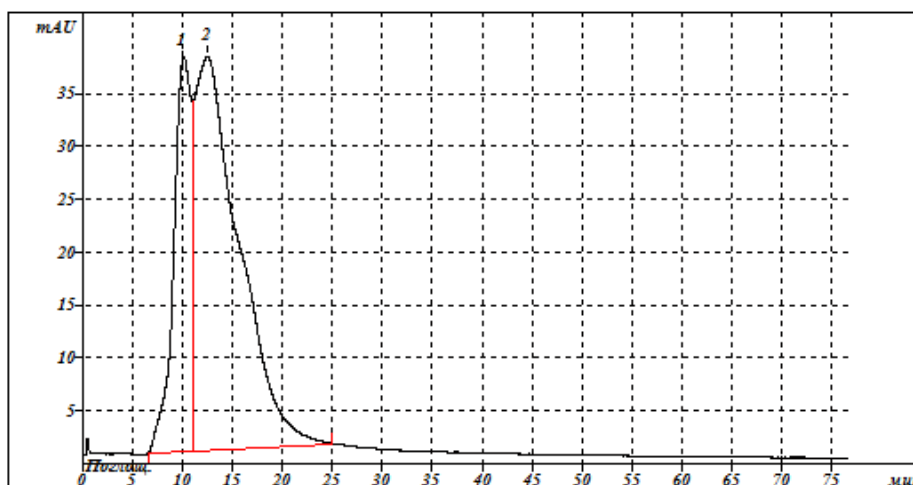


Рисунок 5 – Хроматограмма белковой фракции 4, выделенной из биомассы личинок *G. mellonella*

При хроматографии белковой фракции 4 площадь пика образца 4.2 была в 2,5 раза больше площади пика 4.1 при объеме пробы, также превышающем почти в 3 раза, однако концентрация белка образца 4.2 была незначительно ниже (Таблица 5).

Таблица 5 – Сравнительная характеристика белковых фракций, полученных из биомассы личинок *G. mellonella* методом ВЭЖХ

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Площадь пика, mAU · сек	Хроматографический выход, %	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общая концентрация белка, мг
4.1	9,93	4624,66	28,98	5	23,19±0,89	115,95
4.2	12,48	11332,36	71,02	14	20,29±1,11	284,06
	Всего	15957,02	100,00	19		400,01

При хроматографировании белковой фракции 6 была выделена только одна фракция 6.1 в объеме 15 мл, с концентрацией белка 26±1,11 мг/мл и

общим содержанием белка 390,0 мг/мл (Рисунок 6), что указывало на высокую гомогенность данного пептида.

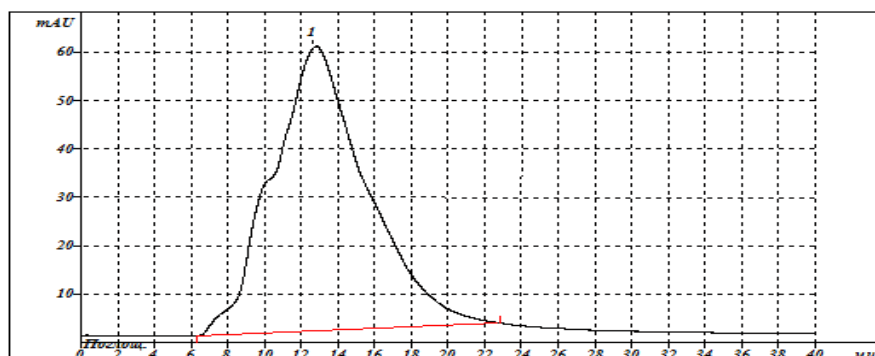


Рисунок 6 – Хроматограмма белковой фракции 6.1, выделенной из биомассы личинок *G. mellonella*

При изучении образцов пептидов, полученных при хроматографировании белковой фракции № 1 при времени удерживания 10-15 мин, максимальная площадь пика была отмечена у образца 1.4, вместе с тем данный образец отличала минимальная концентрация белка. Пик 1.2 характеризовался незначительно меньшей площадью по сравнению с 1.4, вместе с тем концентрация белка была в данном образце почти в 3 раза больше.

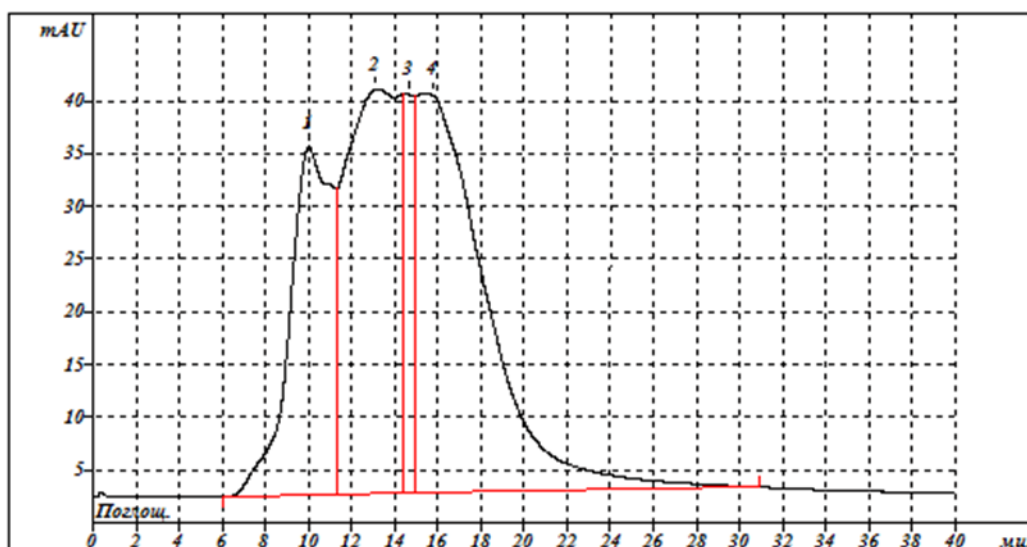


Рисунок 7 – Хроматограмма белковой фракции 1, выделенной из биомассы личинок *G. mellonella*

Таблица 6 – Сравнительная характеристика белковых фракций, полученных из биомассы личинок *G. mellonella* методом ВЭЖХ

№ п/п	tR – время удерживания, мин	Площадь пика, mAU · сек	Хромато-графический выход, %	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общее содержание белка, мг
1.1	10,02	4478,78	21,47	5	0,33±0,09	1,65
1.2	13,19	6643,15	31,84	3	0,83±0,05	2,49
1.3	14,68	1285,46	6,16	0,5	0,94±0,1	0,47
1.4	15,78	8454,91	40,53	11	0,28±0,08	3,08
	Всего	20863,30	100,00	19,5		7,69

Таким образом, для дальнейшего исследования антимикробной активности нами были выбраны фракции, выделенные из биомассы личинок *G.mellonella* № 1-7 на стадии до окукливания (д/о), обозначенные условно 1 д/о, 2 д/о, 3 д/о, 4 д/о, 5 д/о, 6 д/о, 7 д/о; № 1-7 на стадии окукливания (с/о), обозначенные условно 1 с/о, 2 с/о, 3 с/о, 4 с/о, 5 с/о, 6 с/о, 7 с/о; № 2.1-2.7; № 3.1-3.6; № 4.1, 4.2; № 6.1; № 1.1-1.4 с различным содержанием белка (Таблица 1-6, Рисунок 1-7).

Экстракция водорастворимых пептидов из личинок *M. domestica* осуществлялась по вышеописанному протоколу методом ВЭЖХ с применением ФСБ в качестве элюента.

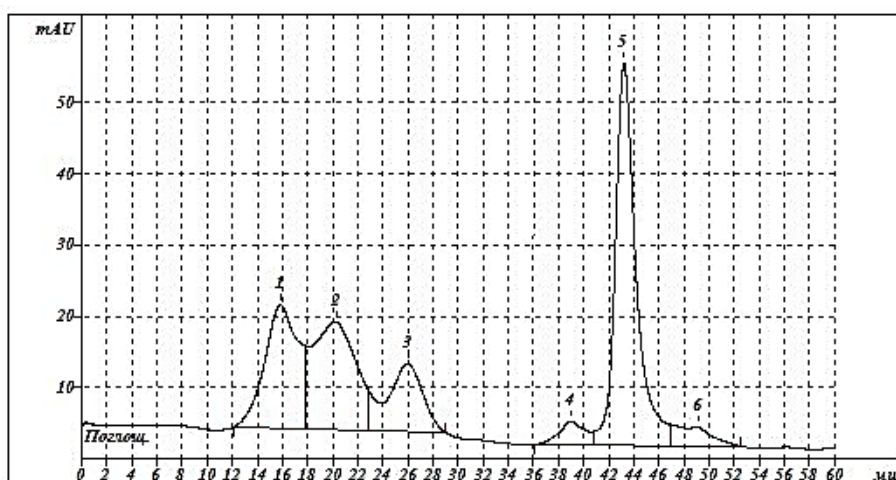


Рисунок 8 – Хроматограмма пептидов, выделенных из личинок *M. domestica*

По результатам эксперимента нами были получены 6 фракций пептидов объемом 4-6 мл и концентрацией белка 3-38 мг/мл (Рисунок 8, Таблица 7). В этом случае не наблюдалось выраженной корреляции между увеличением времени удерживания и получением повышенного содержания белка в образцах фракций из биомассы личинок *M. domestica* (Таблица 7), как это было нами обнаружено при фракционировании биомассы из личинок *G. mellonella* как до, так и на стадии окукливания (Таблица 1, 2). Общее количество полученного белка варьировало независимо от продолжительности времени фракционирования. Однако наблюдалась определенная закономерность между площадью индивидуальных пиков и общим содержанием белка в пробах. Так, общее содержание белка оказалось наибольшим в образце № 5, площадь соответствующего пика которого на хроматограмме также превышала аналогичные показатели, зарегистрированные для остальных 5 фракций (Рисунок 8, Таблица 7).

Таблица 7 – Сравнительная характеристика белковых фракций, полученных из биомассы личинок *M. domestica* методом ВЭЖХ

№ п/п	tR - время удерживания, мин	Площадь пика, mAU*сек	Хроматографический выход, %	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общее содержание белка в пробе, мг
1	2	3	4	5	6	7
1	15,85	3239,77	20,33	6	20,33±0,45	121,98
2	20,20	3574,26	22,43	4	33,65±0,65	134,6
3	25,98	1892,03	11,87	4	17,81±0,78	71,24
1	2	3	4	5	6	7
4	38,96	476,09	2,99	5	3,59±0,91	17,95
5	43,23	6188,91	38,84	6	38,84±0,31	233,04
6	49,02	563,49	3,54	5	4,24±0,15	21,2
	Всего	15934,55	100	30		600,01

Пептиды, полученные при времени удерживания 15-20,2 минут характеризовались сопоставимой по значению площадью пиков, однако по содержанию белка образец № 2 превосходил образец № 1 в 1,66 раза. Общее содержание белка во всех пробах было на уровне 600 мг, что соответствовало



аналогичному показателю белковых фракций 3.1-3.6, полученных из биомассы личинок *G. melonella*.

Таким образом, для дальнейшего исследования антимикробной активности нами были выбраны фракции № 1-6, выделенные из биомассы личинок *M. domestica* с различным содержанием белка (Рисунок 8, Таблица 7).

Фракционирование биомассы личинок *H. illucens* также позволило выявить на хроматограмме 7 отдельных пиков (Рисунок 9).

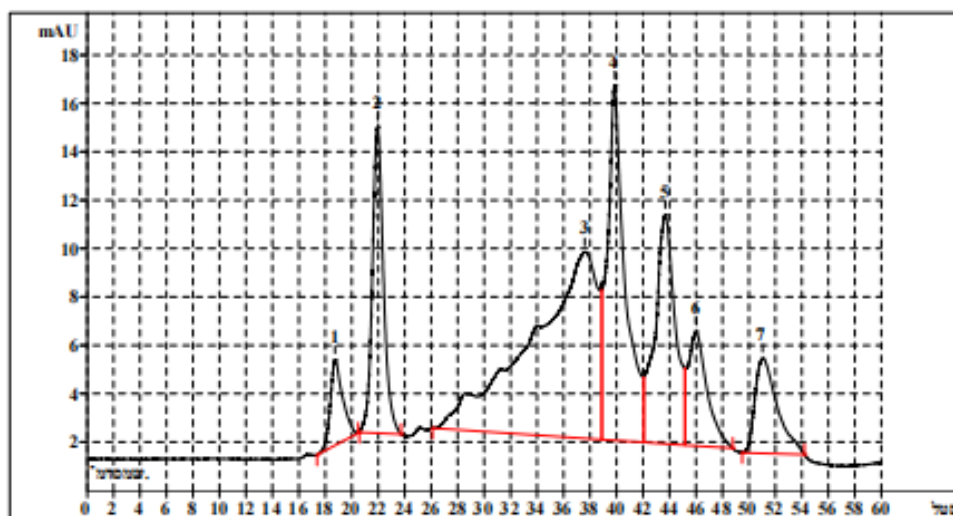


Рисунок 9 – Хроматограмма пептидов, выделенных из биомассы личинок *H. illucens*

Максимальная площадь была зарегистрирована у пика №3 при максимальном объеме образца в 3 – 6 раз превышающем таковое в остальных фракциях, однако концентрация белка была на относительно среднем уровне. У образца № 4 при площади пика в 2 раза меньшей по сравнению с пиком № 3 регистрировали максимальную концентрацию белка почти в 2 раза большую по сравнению с образцом № 3.

Однако общее количество пептидов, изолированных из личинок *H. illucens* (Таблица 8), оказалось почти в 2 раза меньше по сравнению с таковым, полученным из биомассы личинок *M. domestica* (Таблица 7).

Для дальнейшего исследования антимикробной активности нами были выбраны фракции № 1-7, выделенные из биомассы личинок *H. illucens* с различным содержанием белка (Рисунок 9, Таблица 8).

Таблица 8 – Сравнительная характеристика белковых фракций, полученных из биомассы личинок *H. illucens* методом ВЭЖХ

№ п/п	tR - время удерживания, мин	Площадь пика, mAU*сек	Хроматографический выход, %	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общее содержание белка в пробе, мг
1	18,75	227,45	3,27	2	4,16±0,12	8,32
2	21,94	742,31	10,66	3,5	14,89±0,53	52,115
3	37,63	2669,49	38,34	13	9,06±0,09	117,78
4	39,84	1373,62	19,73	3	17,28±0,68	51,84
5	43,69	1020,41	14,65	3	11,13±0,49	33,39
6	46,00	472,71	6,79	4	5,55±0,42	22,2
7	51,06	457,75	6,57	4,5	4,61±0,14	20,745
	Всего	15934,55	100	33		306,39

После разделения пептидов, полученных из биомассы личинок *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* проводили диализ на протяжении 24 часов против 0,9% раствора хлорида натрия. Методом электрофореза в денатурирующих условиях по методу (Laemmli, U.K., 1970) было установлено, что м.м. выделенных пептидов находилась в диапазоне 3,4-6 кДа. Как известно, АМП представляют собой композиции из 12-15 аминокислотных последовательностей преимущественно основных аминокислот (аргинина, лизина и гистидина) (Hancock, R.E.W. et al., 1999). Полученные вышеуказанными авторами данные согласовались с нашими исследованиями, поскольку аналогичные аминокислоты были обнаружены в белковых фракциях, выделенных из *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens*.

Таким образом, нами приготовлены экспериментальные серии пептидов (n = 47) из биомассы личинок трех видов насекомых: *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens*. При сравнительном анализе общее содержание белка было получено из биомассы личинок *G. mellonella* (699,988 мг и 700,04

мг) на стадии до окукливания и на стадии окукливания, соответственно; 2.1-2.7 – 400,1 мг; 3.1-3.6 – 600,0 мг; 4.1-4.2 400,1 мг; 6.1- 390,0 мг; 1.1-1.4 – 7,69 мг. Из биомассы личинок *M. domestica* 1-6 удалось выделить 600,01 мг. Количество пептидов, выделенных из биомассы *H. illucens* 1-7, составило 306,39 мг.

### **2.3.2. Изучение чувствительности исследуемых микроорганизмов к антибиотикам диско-диффузионным методом**

Для изучения антимикробной активности изолированных пептидов в рамках задачи подбора штаммов для последующих исследований, предварительно определяли чувствительность к антибиотикам (АБ) панели микроорганизмов – возбудителей пищевых ИБ СХЖ и человека. С этой целью нами были отобраны типовые штаммы *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *B. cereus* ATCC 10702 и *E. coli* 1027.

Как видно из таблицы 9, *S. typhimurium* 1626 оказался устойчив к действию 8 АБ: канамицину, кларитромицину, тилмикозину, амоксициллину, амоксиклаву, колистину, флорфениколу, фузидину, принадлежащим к следующим группам: аминогликозиды, макролиды, пеницилины, полипептиды, фениколы, стероиды; умеренно-устойчив еще к 3 антибиотическим препаратам (рокситромицину, цефомандолу и азлоциллину) и чувствителен к 8 АБ.

Штамм *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) демонстрировал умеренную устойчивость к действию колистина и сохранил чувствительность к остальным 18 использованным нами антибиотикам.

У штамма *B. cereus* ATCC 10702 обнаружена устойчивость к действию 6 антибиотиков (цефтриаксона, азлоциллина, энрофлоксацина, амоксициллина, амоксиклава и колистина), умеренная устойчивость к цемандолу и цефтиофуру с сохранением чувствительности к 11 АБ.

Для бактерий штамма *E. coli* 1027 зарегистрирована устойчивость к действию 6 следующих антибиотиков: нетилмицину, канамицину,

линкомицину, тилмикозину, энрофлоксацину и фузидину; штамм оказался умеренно-устойчив к двум антибиотикам - рокситромицину и амоксиклаву и чувствителен к 11 АБ.

Таблица 9 – Определение чувствительности изучаемых микроорганизмов к АБ диско-диффузионным методом

Антибиотики	Диаметр зон подавления роста у штаммов патогенов ИБ СХЖ, мм			
	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>E. coli</i> 1027
Нетилмицин	18,5±0,5	25,7±0,5	26,4±0,5	0
Рокситромицин	4,9±0,1	25,8±0,7	28,2±0,8	5,9±0,1
Цефамандол	7,2±0,2	29,6±0,7	8,1±0,2	24,7±0,5
Цефтриаксон	29,6±0,6	22,5±0,5	0	30,5±0,7
Канамицин	0	19,6±0,4	23,4±0,5	0
Линкомицин	18,5±0,5	29,2±0,8	19,5±0,5	0
Азлоциллин	8,1±0,2	39,6±0,8	0	21,6±0,5
Кларитромицин	0	28,4±0,7	26,8±0,5	11,9±0,2
Тилмикозин	0	23,3±0,7	21,4±0,5	0
Энрофлоксацин	26,3±0,5	25,8±0,7	0	0
Амоксициллин	0	38,9±1,1	0	18,9±0,4
Окситетрациклин	21,4±0,5	27,1±0,5	25,3±0,7	20,2±0,4
Амоксиклав	0	38,9±0,9	0	7,1±0,1
Колистин	0	5±0,1	0	12,9±0,3
Цефтиофул	22,6±0,5	30,1±0,6	9,1±0,2	24,3±0,5
Флорфеникол	0	25,8±0,5	26,4±0,6	22,6±0,6
Доксициклин	16,9±0,3	28,9±0,5	28,5±0,6	18,7±0,4
Фузидин	0	30,4±0,7	19±0,4	0
Энрофлокс	29,4±0,7	25,8±0,7	24,8±0,7	29,1±0,8

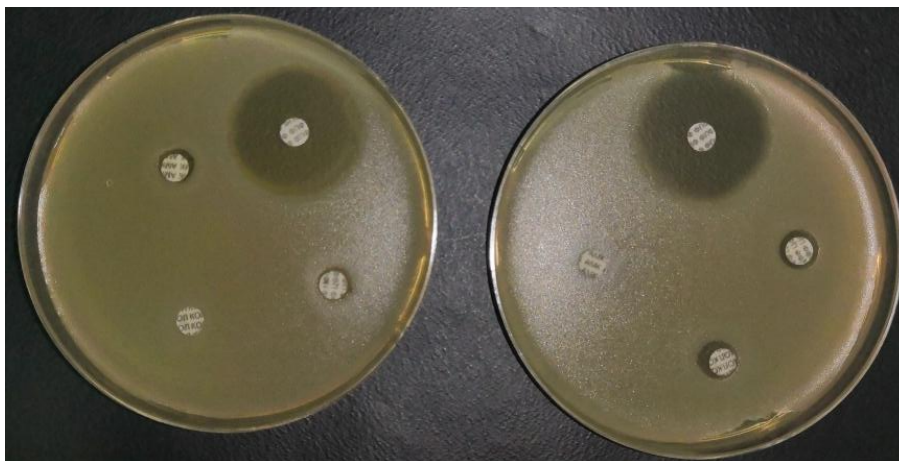


Рисунок 10 – Определение чувствительности и устойчивости к АБ *B. cereus* ATCC 10702 (*B. cereus* ATCC 10702 чувствителен к действию флорфеникола, устойчив к энрофлоксацину, колистину, амоксициллину)

Анализ зон ингибирования позволяет отнести штаммы *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027 к мультирезистентным, поскольку они были нечувствительны к трем и более антимикробным агентам различной природы (Multidrug-resistant, extensively..., 2012).

В результате нам удалось подобрать панель возбудителей ИБ СХЖ, проявляющих как резистентные свойства, так и сохраняющих чувствительность к 19 АБ – нетилмицину, рокситромицину, цефамандолу, цефтриаксону, канамицину, линкомицину, азлоциллину, кларитромицину, тилмикозину, энрофлоксацину, амоксициллину, окситетрациклину, амоксиклаву, колистину, цефтиофуру, флорфениколу, доксициклину, фузидину, энрофлоксу.

При этом штамм *S. typhimurium* 1626 обладал резистентностью к большому количеству АБ из использованной нами панели, хотя сохранил при этом чувствительность к некоторым из них. Полученные нами результаты соотносятся с данными других исследователей о выраженной антибиотикорезистентности штаммов рода *Salmonella* (Cherkasov, A. 2009; Hot Topics in Infection..., 2010; Salmonellosis in Finishing..., 2011; Therapeutic potential of host..., 2012; Meunier, O. 2015).

Таким образом, в результате проведенных исследований нами подобраны микроорганизмы, возбудители пищевых инфекций и некоторых зоонозов, с различным диапазоном чувствительности и устойчивости к различным группам АБ, в том числе мультирезистентные к действию антибиотиков. Исключением стал золотистый стафилококк, который сохранил чувствительность ко всем использованным в настоящем исследовании антибиотикам, кроме колистина.

### **2.3.3. Определение антимикробной активности белковых фракций макрометодом**

Антимикробная активность полученных белковых фракций, выделенных из биомассы личинок *G. mellonella* была изучена по отношению к возбудителям ИБ СХЖ с подтвержденной резистентностью/чувствительностью к АБ, а именно *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. По 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 (Global Priority List..., 2017). Кроме этого, согласно этому списку, *S. aureus* относится к группе с высоким приоритетом селекции антибиотикорезистентности. Следовательно, выбор штаммов *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626 и *E. coli* 1027, принадлежащих к данным группам, для проведения исследований на антибактериальную активность пептидов очевиден. Также нами для указанных целей были использован штамм *B. cereus* ATCC 10702, который наиболее часто детектируется как контаминирующий агент в пищевой продукции и обладает высокой устойчивостью вследствие способности к спорообразованию. Первоначально определяли антимикробную активность пептидов, изолированных из *G. mellonella* на стадиях до и после окукливания (Рисунок 1, 2). Данный эксперимент проводили макрометодом с внесением

каждой из 7 белковых фракций, полученных до окукливания в жидкую питательную среду. Для каждой культуры микроорганизмов и каждой концентрации эксперимент выполняли в трех повторностях. По результатам исследований было выявлено наличие антимикробной активности у двух фракций - № 3 (в концентрации 0,18 мг/л) по отношению к *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) и № 6 (в концентрации 0,111 мг/л) по отношению ко всем оставшимся тестовым микроорганизмам (Таблица 10).

Таблица 10 – Антимикробная активность белковых фракций № 1 – 7, выделенных из биомассы *G. mellonella* на разных стадиях развития

Стадия развития <i>G. mellonella</i>	Фракция белка	Тестовые штаммы микроорганизмов			
		<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>E. coli</i> 1027
До окукливания	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	+	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	6	+	+	+	+
	7	-	-	-	-
	Отрицательный контроль (без пептидов)	-	-	-	-
На стадии окукливания	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	+	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	6	+	+	+	+
	7	-	-	-	-
	Отрицательный контроль (без пептидов)	-	-	-	-

Примечание – Реакцию учитывали по наличию или отсутствию типичного роста тестовых культур бактериальных патогенов: '+'- бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов); '-' – бульон мутный или

есть осадок (рост микроорганизмов).

Аналогичные данные были получены при исследовании антимикробной активности белковых фракций из биомассы личинок *G. mellonella* на стадии окукливания. Поскольку принципиальных отличий в антимикробной активности пептидов в зависимости от стадии развития личинок не было обнаружено (Таблица 10), в дальнейших исследованиях этот факт не учитывали. Все дальнейшие исследования антимикробной активности проводили на стадии развития до окукливания.

Далее этим же методом были проанализированы пептиды, выделенные из биомассы личинок *G. mellonella* № 2.1-2.7 и 3.1-3.6 до окукливания (см. Рисунок 3, 4) с использованием панели тех же тестовых патогенов. Нами было установлено, что пептид № 2.6. ингибирует рост всех тестовых патогенов, а пептид № 2.3 только пролиферацию штамма *S. aureus* ATCC 6538 (209-P). У пептидов № 2.1; 2.2; 2.4; 2.5 и 2.7 антимикробную активность выявить не удалось (Таблица 11).

Таблица 11 – Антимикробная активность белковых фракций № 2.1 - 2.7, изолированных из биомассы *G. mellonella*

Белковые фракции <i>G. mellonella</i>	Тестовые штаммы микроорганизмов			
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>E. coli</i> 1027
2.1	–	–	–	–
2.2	–	–	–	–
2.3	+	–	–	–
2.4	–	–	–	–
2.5	–	–	–	–
2.6	+	+	+	+
2.7	–	–	–	–
Отрицательный контроль (без пептидов)	-	-	-	-

Примечание – Реакцию учитывали по наличию или отсутствию типичного роста тестовых культур бактериальных патогенов: '+'- бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов); '-' – бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

В результате изучения антимикробной активности пептидов 3.1-3.6



было установлено, что антимикробной активностью в отношении штамма *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) обладают пептиды № 3.4 и 3.6. Пептид № 3.6 также ингибировал рост штаммов *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, а пептид № 3.2 только трёх последних тестовых микроорганизмов (Таблица 12).

Таблица 12 – Антимикробная активность белковых фракций № 3.1 - 3.7, изолированных из биомассы *G. mellonella*

Белковые фракции <i>G. mellonella</i>	Тестовые штаммы микроорганизмов			
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>E. coli</i> 1027
3.1	–	–	–	
3.2	–	+	+	+
3.3	–	–	–	
3.4	+	–	–	
3.5	–	–	–	
3.6	+	+	+	–
Отрицательный контроль (без пептидов)	–	–	–	–

Примечание – Реакцию учитывали по наличию или отсутствию типичного роста тестовых культур бактериальных патогенов: ‘+’- 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. Было установлено, что только белковая фракция № 2 обладала антимикробной активностью по отношению ко всем изучаемым патогенным микроорганизмам (Таблица 13).

При исследовании антимикробной активности белковых фракций № 1-7, выделенных из биомассы личинок *H. illucens*, оказалось, что белковая фракция № 4 обладала таковой по отношению к *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *E. coli* 1027. Белковая фракция № 7 демонстрировала бактерицидное действие по отношению ко всем патогенам, кроме *E. coli* 1027 (Таблица 14).

Таблица 13 – Антимикробная активность белковых фракций, выделенных из биомассы личинок *M. domestica*

Фракция белка <i>M. domestica</i>	Тестовые штаммы микроорганизмов			
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>S.</i> <i>typhimurium</i> 1626	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>E. coli</i> 1027
1	-	-	-	-
2	+	+	+	+
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
Отрицательный контроль (без пептидов)	-	-	-	-

Примечание – Реакцию учитывали по наличию или отсутствию типичного роста тестовых культур бактериальных патогенов: '+' - бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов); '-' – бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

Таблица 14 – Антимикробная активность белковых фракций, выделенных из биомассы личинок *H. illucens*

Фракция белка <i>H. illucens</i>	Тестовые штаммы микроорганизмов			
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>S.</i> <i>typhimurium</i> 1626	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>E. coli</i> 1027
1	2	3	4	5
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
1	2	3	4	5
4	+	+	-	+
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	+	+	+	-
Отрицательный контроль (без пептидов)	-	-	-	-

Примечание – Реакцию учитывали по наличию или отсутствию типичного роста тестовых культур бактериальных патогенов: '+' - бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов); '-' – бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

Таким образом, на данном этапе исследований нам удалось выявить антимикробную активность у 9 пептидов, изолированных из биомассы личинок *G. mellonella*, одного пептида *M. domestica* и двух пептидов *H. illucens*, что позволило отнести данные биомолекулы к группе антимикробных пептидов.

#### 2.3.4. Определение антимикробной активности белковых фракций диффузным методом

На данном этапе исследований для определения антимикробной активности использовали метод диффузии препарата в агар.

Антимикробную активность определяли с применением плотных питательных сред, на которых культивировали те же штаммы тестовых патогенных микроорганизмов: *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) и *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027 (Рисунок 11).

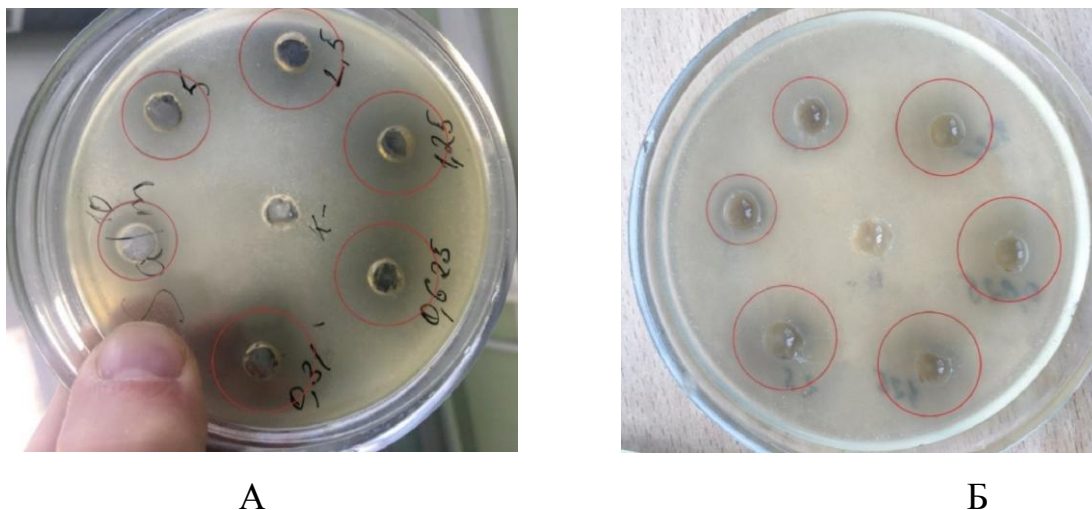


Рисунок 11 – Изучение антимикробной активности пептида 1.2 по отношению к тестовому штамму *S. typhimurium* 1626. А - Концентрации пептида 1.2, 0, 31; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 мг/л (против часовой стрелки, обведены красным), в центре – отрицательный контроль; Б – обратная сторона этой же чашки Петри

В этом эксперименте изучали свойства пептида № 1.2, изолированного из биомассы личинок *G. mellonella*, в 6 разных концентрациях – от 0,31 мг/л

до 10,0 мг/л. Нами установлено, что указанный пептид 1.2 оказался способен ингибировать пролиферацию всех патогенов. При этом указанный пептид полностью подавлял рост бактерий штамма *S. typhimurium* 1626 независимо от использованных концентраций, а применение 0,31 мг/л было достаточно для угнетения роста тестовых микроорганизмов. Максимальная задержка роста штамма *B. cereus* ATCC 10702 наблюдалась в случае использования 2,5 мг/л пептида, для штамма *E. coli* 1027 при концентрации 0,625 мг/л (Таблица 15).

Таблица 15 – Изучение антимикробной активности различных концентраций пептида 1.2, выделенного из биомассы личинок *G. mellonella*

Концентрация пептида, мг/л	Тестовые штаммы возбудителей пищевых ИБ СХЖ			
	<i>S. typhimurium</i> 1626	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>E. coli</i> 1027
10,0	10,0±0,9	-	-	-
5,0	15,0±1,1	-	15,0±1,8	-
2,5	20,0±1,3	-	19,0±1,6	-
1,25	27,0±1,4	11,0±0,8	14,0±0,9	25,0±1,3
0,625	25,0±1,7	12,0±0,9	13,0±1,0	26,0±0,9
0,31	21,0±1,0	10,0±1,2	10,0±1,1	12,0±1,2

Примечание – Антимикробную активность пептида 1.2 оценивали по диаметру зоны задержки роста тестовых микроорганизмов, мм.

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

### 2.3.5. Определение антимикробной активности микрометодом

Для определения антимикробной активности микрометодом были использованы пептиды 4.1, 4.2 и 6.1, выделенные из биомассы личинок восковой моли *G. mellonella*.

В данном эксперименте также использовали культуры тестовых микроорганизмов *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538(209-P), *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. Взвеси бактерий совместно культивировали с 7 различными концентрациями указанных пептидов в лунках 96-лучночных планшетов при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Судя по полученным данным (Таблица 16), пептид № 4.1 не обладал антимикробной активностью ни в одной из использованных концентраций. Два других пептида, № 4.2 и 6.1 – обладали указанным свойством. Оба пептида подавляли рост тестовых микроорганизмов, за исключением штамма *S. aureus* ATCC 6538 (209-P). В ряде случаев при использовании данных пептидов наблюдался дозозависимый эффект. Так, для пептида 6.1 концентрация 10 мг/л была эффективной по отношению к *S. typhimurium* 1626, а пептид 4.2 вызывал бактерицидное действие по отношению к *E. coli* 1027 в этой же концентрации. Пептид № 6.1 также оказался высокоэффективен при ингибировании роста штамма *B. cereus* ATCC 10702 в концентрации 0,625 мг/л. Анализируя полученные результаты можно заключить, что этот пептид 4.2 обладает высокой противомикробной активностью по отношению к штаммам *B. cereus* ATCC 10702, *S. typhimurium* 1626 в минимальной использованной концентрации 0.625 мг/л, и относительно низкой по отношению к *E. coli* 1027, поскольку оказался способен вызывать гибель данного патогена только в концентрации 10 мг/л (Таблица 16).

Для подтверждения полученных результатов, нами были сделаны контрольные высевы из лунок с низкой (0.625 мг/л) и высокой (10 мг/л) концентрациями пептидов 4.2 и 6.1 на твердую питательную среду.

Чашки помещали в термостат при температуре 37 °С на 24 ч, после чего учитывали результат (Рисунок 15, 16). Отсутствие роста бактериальных колоний на чашках свидетельствовало о корректности проведенных выше экспериментов.

Таблица 16 – Антимикробная активность пептидов 4.1, 4.2, 6.1

Культуры	Пептид № 4.1		Пептид № 4.2		Пептид № 6.1	
	0.625м г/л	10 мг/л	0.625м г/л	10 мг/л	0.625м г/л	10 мг/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 – Реакцию учитывали по наличию или отсутствию типичного роста тестовых культур бактериальных патогенов: '+'- бульон прозрачный (нет роста микроорганизмов); '-' – бульон мутный или есть осадок (рост микроорганизмов).

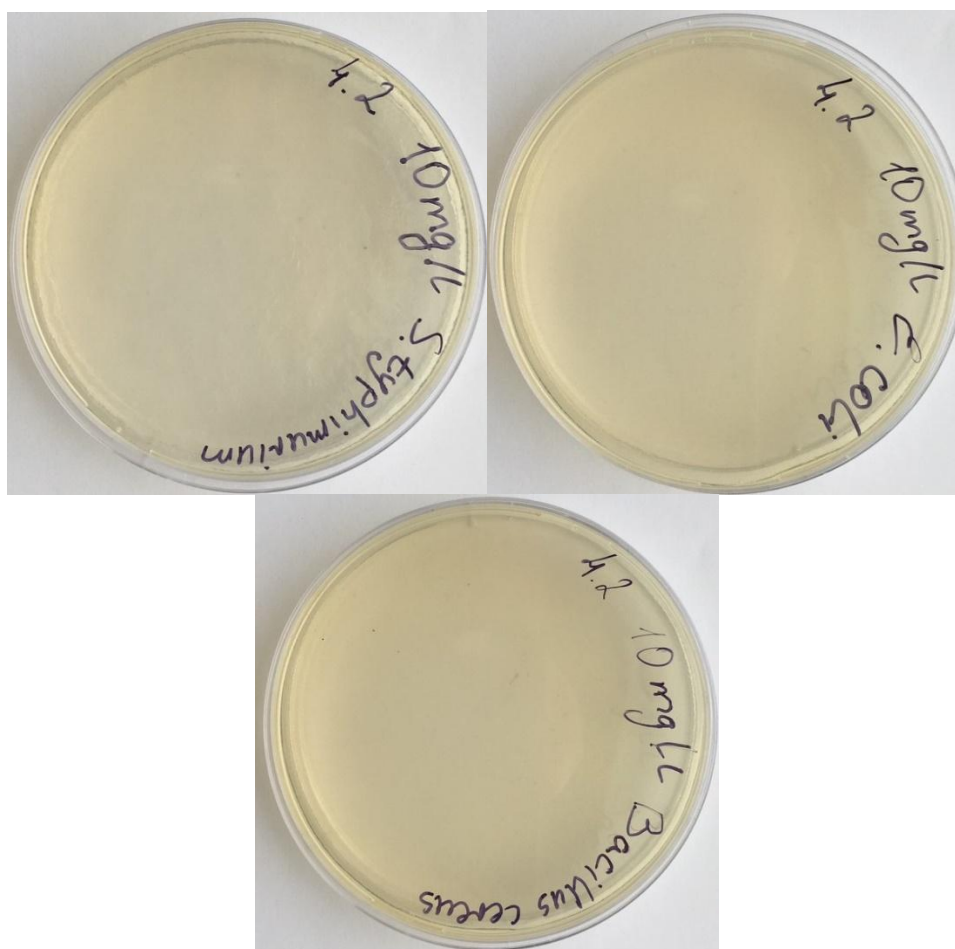


Рисунок 15 – Подтверждение бактерицидной активности пептида 4.2 в концентрации 10 мг/л в отношении *S. typhimurium* 1626, *E. coli* 1027 и *B. cereus* ATCC 10702 – отсутствие бактериального роста

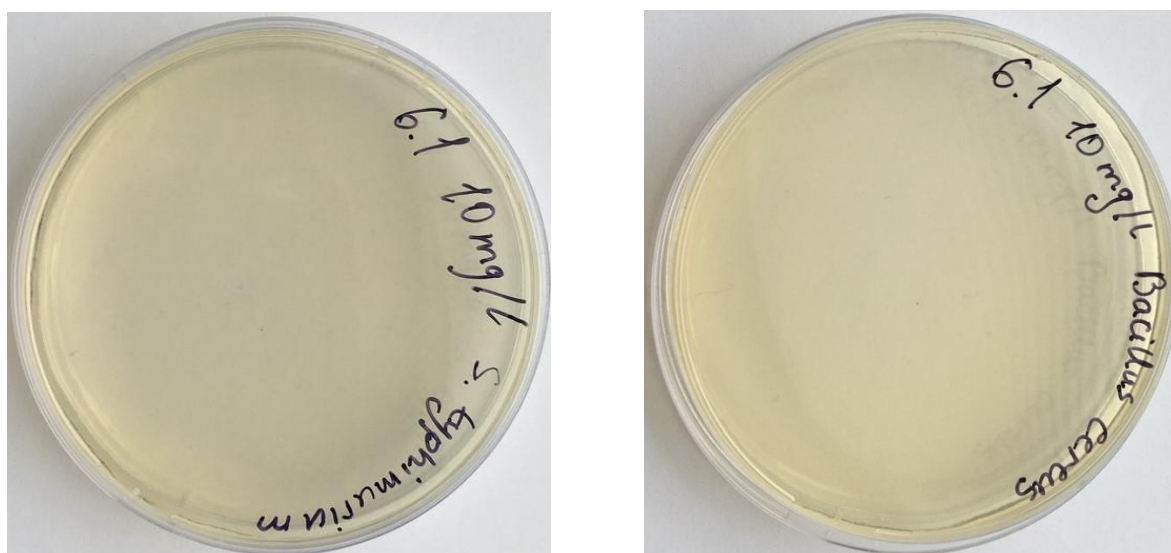


Рисунок 16 – Подтверждение бактерицидной активности пептида 6.1 в концентрации 10 мг/л в отношении *S. typhimurium* 1626 и *B. cereus* ATCC 10702 – отсутствие бактериального роста

Другими исследователями была изучена антимикробная активность АМП животного происхождения в отношении различных патогенов (Antimicrobial peptides in domestic animals..., 2021). Пептиды, выделенные от крупного рогатого скота, обладали минимальной ингибирующей концентрацией в отношении *E. coli* – 1-50 мг/мл, *S. aureus* – 2,5-125 мг/мл, *S. typhimurium* – 1-100 мг/мл, *C. albicans* – 6-63 мг/мл; от коз *E. coli* – 3-150 мг/мл, *S. aureus* – 50-150 мг/мл; от лошадей *E. coli* – 2-200 мг/мл, *S. aureus* – 50-150 мг/мл, *S. typhimurium* – 4 мг/мл; от свиней *E. coli* – 0,75-50 мг/мл, *S. aureus* – 1,7-8 мг/мл; от собак *S. aureus* – 5,66-100 мг/мл, *E. coli* – 21 мг/мл, *S. typhimurium* – 29 мг/мл.

Анализируя полученные нами данные и сравнивая их с результатами других исследователей, можно заключить, что пептиды, выделенные из насекомых в рамках настоящей работы, сопоставимы, а, в некоторых случаях даже превосходят по антимикробной активности пептиды животного происхождения. Следовательно, изолированные нами пептиды с установленными антимикробными свойствами (*G. mellonella* 3, 6 д/о; 3, 6 с/о; 2.3, 2.6, 3.2, 3.4, 3.6, 1.2, 4.2, 6.1; *M. domestica* 2; *H. illucens* 4, 7) можно

отнести к группе АМП для модельных штаммов возбудителей пищевых инфекций. При этом следует отметить значительно больший потенциал их антимикробной активности, что позволяет рассматривать возможность их последующего использования в дизайне противомикробных препаратов.

### 2.3.6. Характеристика выделенных антимикробных пептидов

В таблице 17 представлена информация о количестве пептидов, выделенных из *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* и их антимикробной активности. Была доказана антимикробная активность 12 пептидов, полученных из биомассы *G. mellonella*, одного - *M. domestica* и двух - *H. illucens*.

Таблица 17 – Антимикробная активность белковых фракций

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

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



Анализируя полученные результаты, можно отметить, что чаще всего антимикробную активность проявляли пептиды №6, выделенные из биомассы *G. mellonella*. Кроме этого, фракции пептидов №6 были получены при приблизительно одинаковом времени удерживания, а именно G. m. д/о 6 – 46,07; G. m с/о 6 – 46,00; G. m. 2.6 – 43,46 за редким исключением (G. m. 3.6 – 59,00) и обладали антимикробной активностью почти ко всем изучаемым штаммам. Данное обстоятельство свидетельствует о стабильности данного процесса и имеет определенные преимущества при его масштабировании.

### **2.3.7. Изучение острой токсичности антимикробных пептидов**

Оценку острой токсичности проводили с пептидом *G. mellonella* 6 д/о на белых беспородных мышах. Для презентативных экспериментов использовали 10 % раствор АМП. Результаты регистрировали после однократного внутрижелудочного и внутрибрюшинного введения указанного раствора. Животным массой 18-20 г АМП однократно вводили три разные концентрации 10% раствора АМП, варьируя объемы вводимых препаратов: 0,1 мл, что соответствовало 1000 мг/кг; 0,15 мл – 1500 мг/кг и 0,2 мл – 2000 мг/кг. В качестве отрицательного контроля применяли воду для инъекций.

Всего нами было сформировано 8 групп животных, включая две контрольные. Животным первой группы 10 % раствор АМП вводили внутрибрюшинно, животным второй – внутрижелудочным способом.

При учете результатов через 24 часа и на протяжении 14 дней наблюдения оказалось, что все 100% животных в каждой из экспериментальных групп остались живы (Таблица 18). Ни одна из использованных концентраций АМП как при внутрижелудочном, так и при парентеральном введении не была фатальной для мышей. Соответственно, нам не удалось установить среднесмертельную дозу АМП для биомоделей, поскольку максимально возможные дозы для внутрижелудочного и парентерального введения не привели к гибели ни одного животного. Согласно общепринятой гигиенической классификации ГОСТ 12.1.007-76, 10

% раствор АМП *G. mellonella* №6 д/о относится к 4 классу опасности (вещества малоопасные).

Таблица 18 – Изучение острой токсичности АМП *G. mellonella* № 6 д/о

№ п/п	Препарат*	Доза, мг/кг	Объем раствора для введения, мл/животное	Способ введения	Число животных в группе			
					Обработанных, шт.		Выжило, шт.	
					Абс.	%	Абс.	%
1	АМП <i>G. mellonella</i> № 6 д/о	1000	0,1	В/б	10	100	10	100
2		1500	0,15	В/б	10	100	10	100
3		2000	0,2	В/б	10	100	10	100
4	Вода для инъекций (контроль)	-	0,2	В/б	10	100	10	100
5	АМП <i>G. mellonella</i> № 6 д/о	1000	0,1	В/ж	6	100	6	100
6		1500	0,15	В/ж	6	100	6	100
7		2000	0,2	В/ж	6	100	6	100
8	Вода для инъекций (контроль)	-	0,2	В/ж	6	100	6	100

Примечание – исходный 10% раствор АМП.

На следующем этапе изучали аналогичные свойства всех остальных полученных нами АМП. Результаты исследования острой токсичности представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Изучение острой токсичности АМП

№ п/п	Вид насекомого (стадия развития насекомого)	Номер АМП	Результат исследования острой токсичности
1	<i>G. mellonella</i> (д/о)	2.3	4 класс опасности (вещества малоопасные)
		2.6	
		3	
		3.2	
		3.4	
		3.6	
		1.2	
		4.2	
		6	
		6.1	
2	<i>G. mellonella</i> (с/о)	3	4 класс опасности (вещества малоопасные)
		6	
3	<i>M. domestica</i> (д/о)	2	
4	<i>H. illucens</i> (д/о)	4	
		7	

Таким образом, исследуемые АМП, выделенные из биомассы насекомых *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* по результатам испытаний также были отнесены к 4 классу опасности (вещества малоопасные).

### 2.3.8. Изучение локализации пептидов в организме белых мышей

Для понимания механизма метаболизма антимикробных пептидов в макроорганизме, нами были проведены эксперименты по определению локализации АМП в конкретных целевых органах организма белых мышей. В результате проведенного эксперимента, было установлено, что АМП, меченые ФИТЦ через 24 ч после внутрибрюшинного введения не вызывали флуоресценции в крови (Рисунок 17), что явилось свидетельством их способности к быстрому транзитному движению через кровяное русло биомоделей.

Аналогичные данные были получены при внутримышечном введении АМП, меченых ФИТЦ, поскольку через 24 ч, отмечали полное выведение препарата из крови (Рисунок 18).

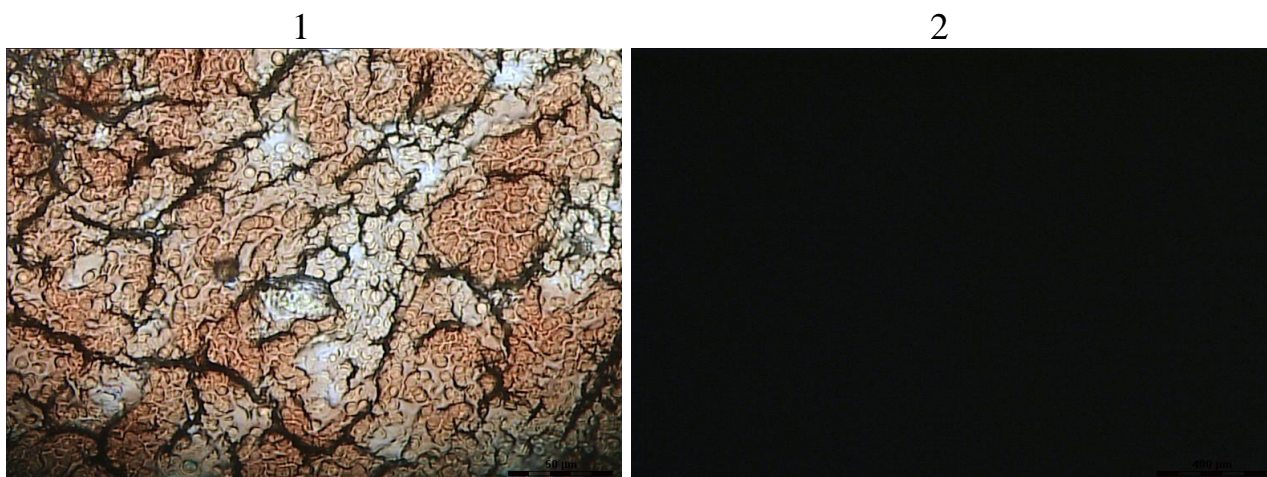


Рисунок 17 – Мазок образцов крови через 24 ч после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), х600

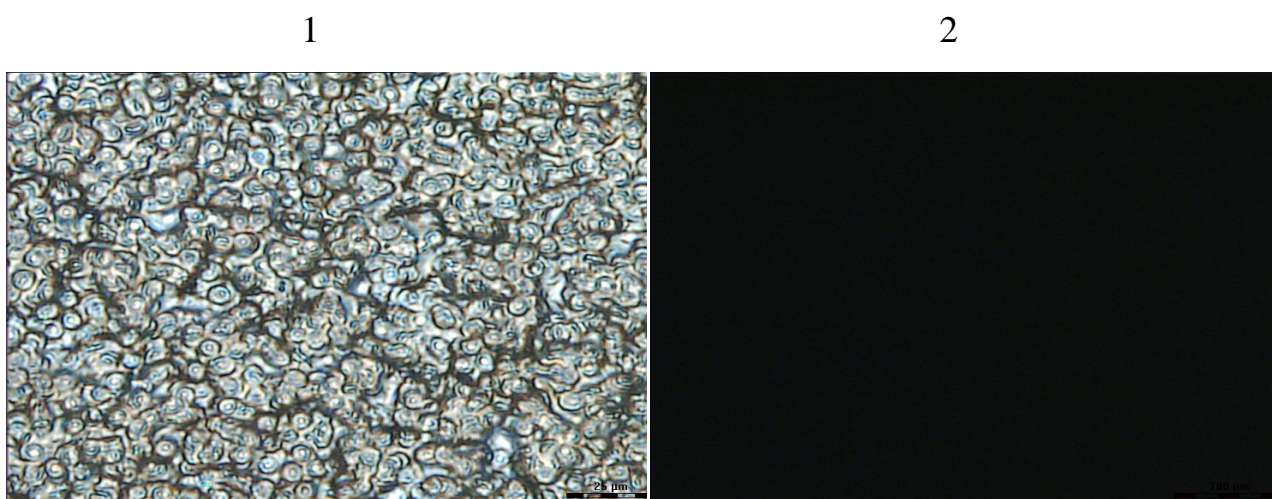
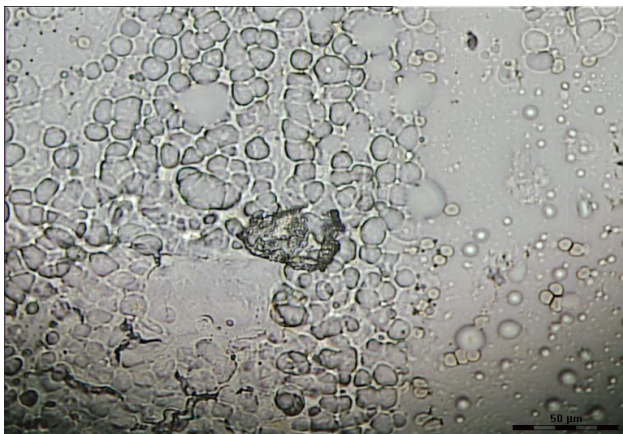


Рисунок 18 – Мазок крови мыши через 24 ч после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия без фильтра (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), х630

Флуоресценция не была обнаружена и при микроскопии мазка отпечатка из костного мозга после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ, что говорит о полном отсутствии пептидов в мозге (Рисунок 19).

1



2

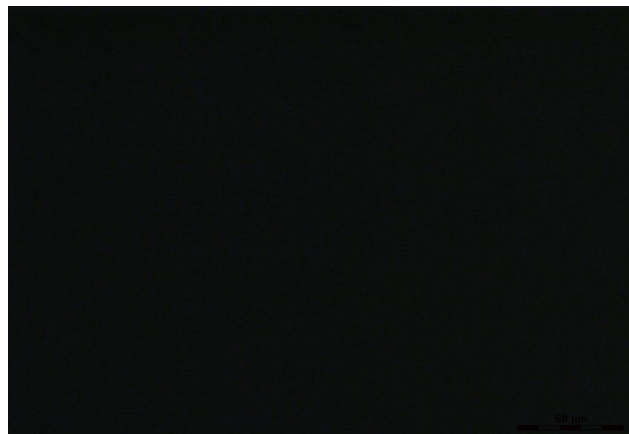
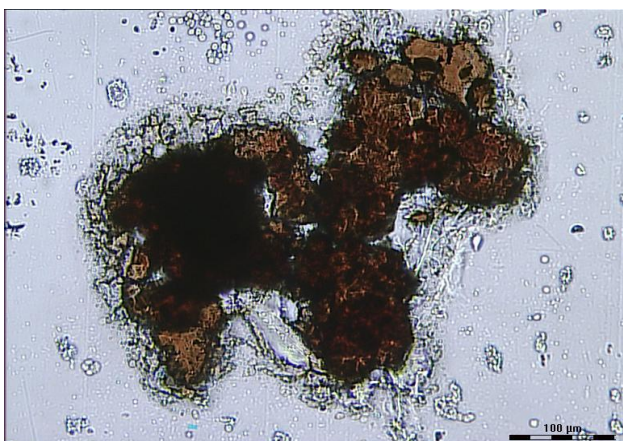


Рисунок 19 – Мазок отпечаток костного мозга мыши через 24 ч после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), х40

Однако довольно сильная и интенсивная флуоресценция в указанный период отмечалась после внутримышечного введения, что явилось результатом локализации искомого вещества в клетках костного мозга (Рисунок 20).

1



2

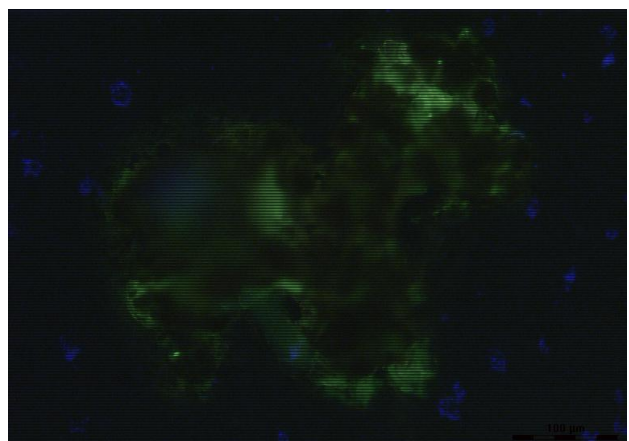


Рисунок 20 – Мазок отпечаток костного мозга мыши через 24 ч после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), х200

При микроскопии мазка отпечатка из паренхимы печени после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ, в те же сроки

регистрировали довольно интенсивное свечение внутри структурных образований (Рисунок 21), что указывало на сосредоточение пептидов в паренхиматозных клетках.

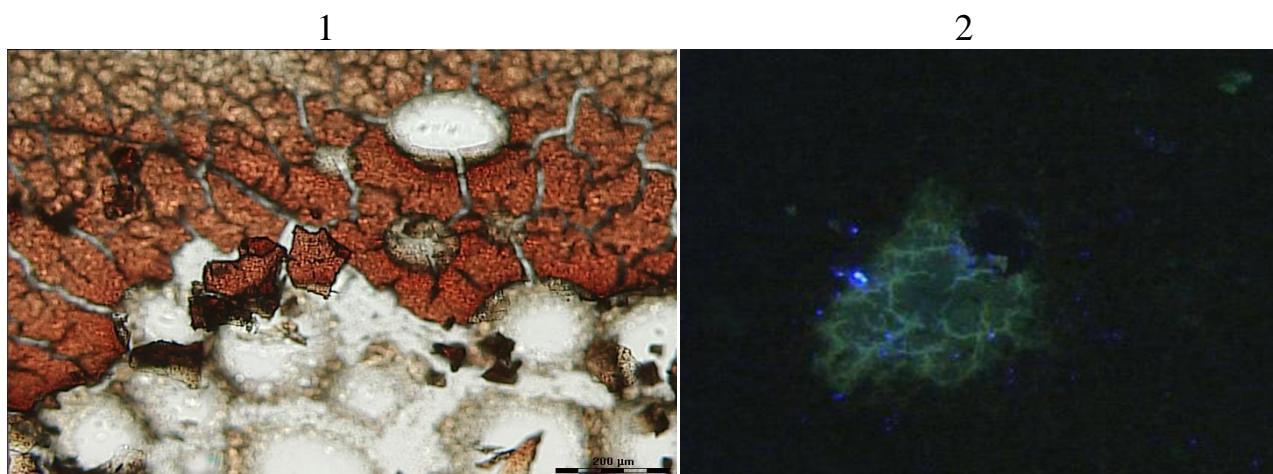


Рисунок 21 – Мазок отпечаток паренхимы печени мыши через 24 ч после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x100

Следует отметить, что после внутримышечного введения пептиды оказались способными также локализоваться в паренхиме печени, где выявлялись в течение последующих 24 ч с момента их введения, сосредотачиваясь внутри структурных образований, имеющих оболочку (Рисунок 22).

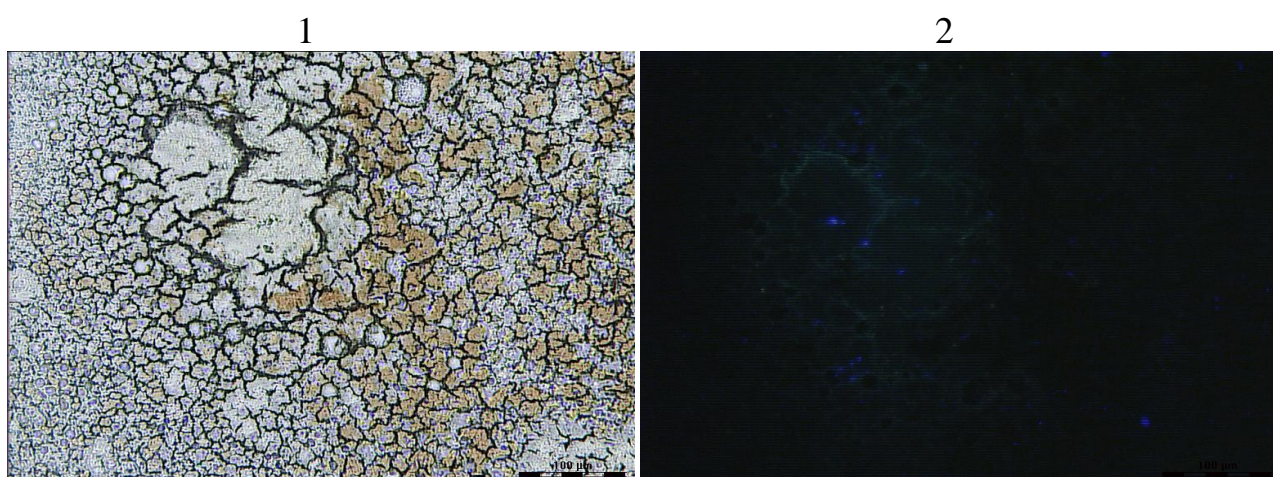


Рисунок 22 – Мазок отпечаток паренхимы печени мыши через 24 ч после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x200

Отсутствие флуорисценции искомым пептидов в почках регистрировали при микроскопическом исследовании мазка-отпечатка паренхимы почки через 24 ч после внутрибрюшинного введения АМП (Рисунок 23), что свидетельствовало об их отсутствии в данных органах.

1

2

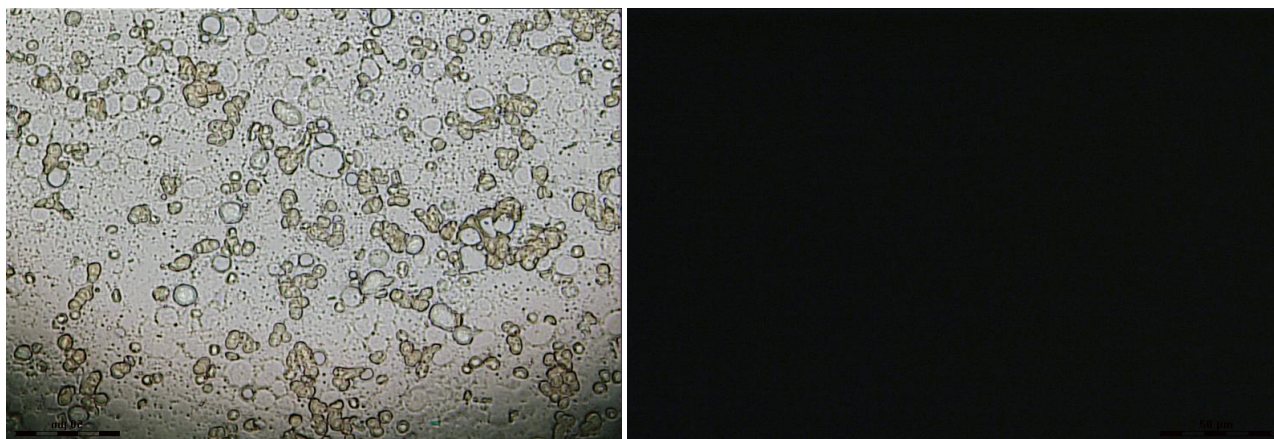


Рисунок 23 – Мазок отпечаток паренхимы почки мыши через 24 ч после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x400

1

2

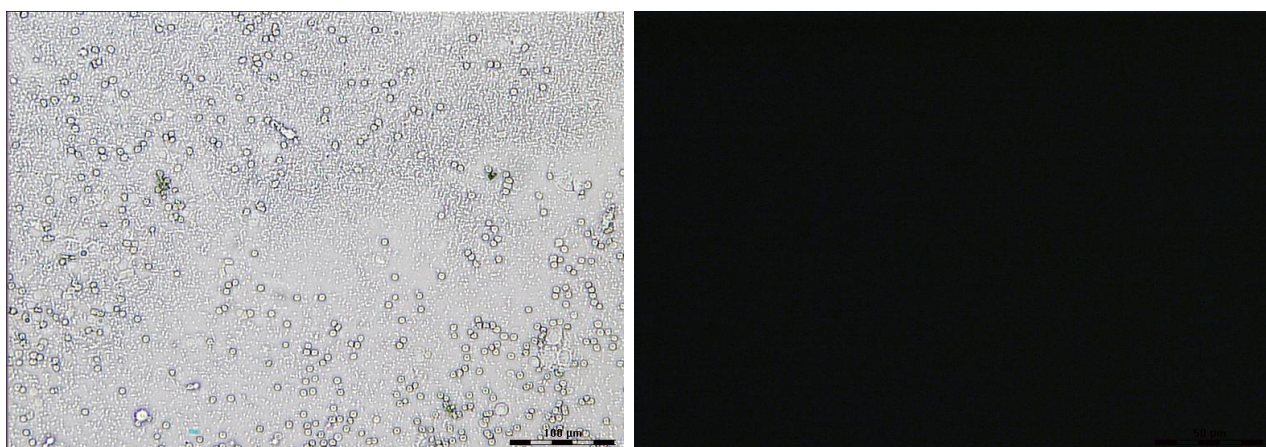


Рисунок 24 – Мазок отпечаток паренхимы почки мыши через 24 ч после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1). Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x200

Локализация пептидов в клетках селезёнки в течение 24 ч была подтверждена при микроскопии мазка отпечатка паренхимы селезенки мыши

после внутрибрюшинного введения АМП с регистрацией флюоресценции, имеющей строго очерченную форму и границы (Рисунок 25).

1

2

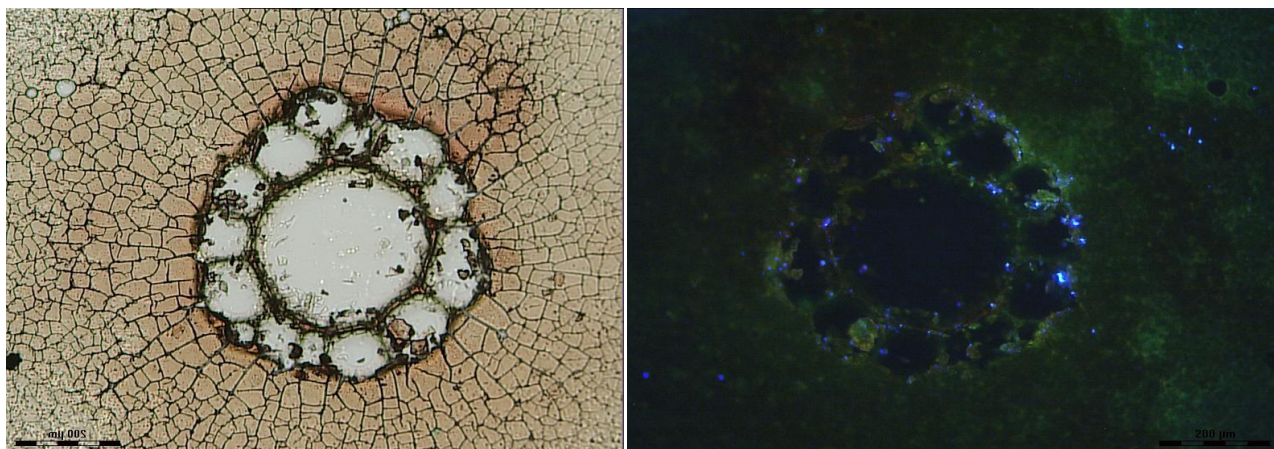


Рисунок 25 – Мазок отпечаток паренхимы селезенки мыши через 24 ч после внутрибрюшинного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1), Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x100

При внутримышечном введении АМП, меченых ФИТЦ, наблюдали аналогичные результаты (Рисунок 26).

1

2

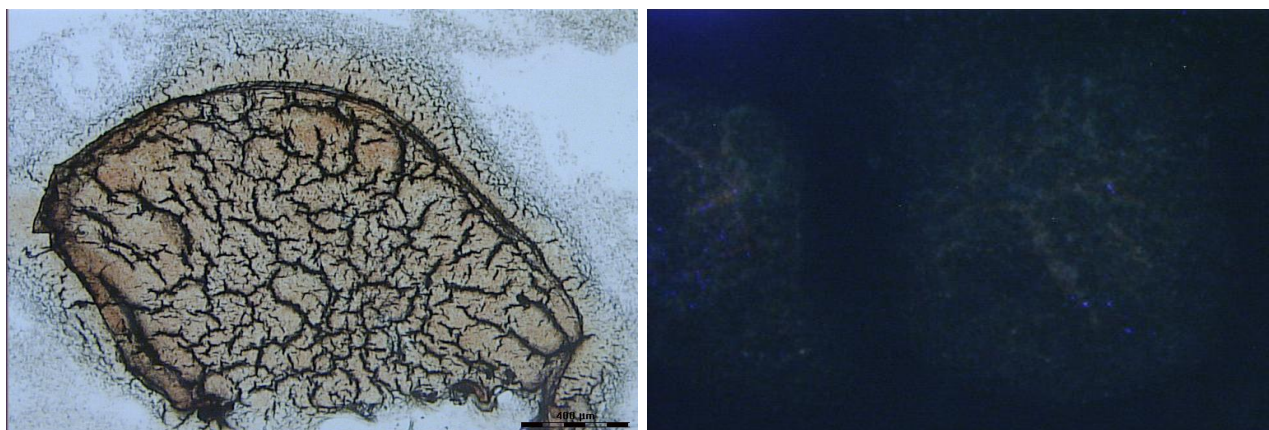


Рисунок 26 – Мазок отпечаток паренхимы селезенки мыши через 24 ч после внутримышечного введения АМП, меченых ФИТЦ. Световая микроскопия (1), Микроскопия с ультрафиолетовым фильтром (2), x50



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

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

## Заключение

Возбудители пищевых инфекционных болезней являются серьезной проблемой и оказывают значительный экономический ущерб в различных отраслях народного хозяйства. АМП могут иметь потенциальное применение в борьбе с указанными патогенами, в том числе некоторыми зоонозными инфекциями, которые представляют серьезную угрозу как для здоровья человека и животных, так и продовольственной безопасности. *Salmonella spp.* и *E. coli spp.* признаны основными зоонозными патогенами. Инфекции, вызываемые этими бактериями, являются одними из наиболее часто регистрируемых заболеваний пищевого происхождения во всем мире. Кроме этого, инфекции, вызванные такими патогенами как, *B. cereus* и *S. aureus* также широко распространены и наносят не менее серьезный экономический ущерб (Occurrence of *Salmonella*..., 2010; A metaanalysis of major..., 2018).

Антимикробные пептиды обладают некоторыми преимуществами перед антибиотиками, они обладают высокой бактерицидной скоростью и широким спектром антибактериальной активности благодаря неспецифическому механизму мембранного осмоса, в то время как традиционные антибиотики в основном взаимодействуют со специфическими мишенями. Таким образом, этот уникальный механизм действия АМП затрудняет выработку бактериями устойчивости к ним (Antimicrobial peptides as anti-infectives..., 2016; Loeffler, J. M. et al., 2001).

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 (Genotoxic and cytotoxic activity..., 2012).

Кроме того, антимикробные пептиды не оказывают токсического воздействия на эукариотические клетки и могут использоваться для лечения людей и животных, а также в кормлении животных как абсолютно безвредные вещества. Поиск новых альтернативных антибиотикам препаратов в животноводстве в первую очередь связан с растущей проблемой устойчивости к антибиотикам (The Antimicrobial peptide polyphemusin..., 2006).

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 противомикробным действием (Rosen, T. et al., 2011).

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: колонка BioSep S2000 300x2120 мм (Phenomenex, USA), скорость потока 1 мл/мин, длина волны 280 нм, объем петли 1575 мкл, элюент 0,1 М ФСБ, время хроматографирования 60 мин, объем вводимой пробы 20 мкл и температуре 25 °С. Разработанный нами алгоритм получения антимикробных пептидов может быть использован в дальнейших исследованиях по конструированию противомикробных препаратов на основе АМП.

Для изучения антибактериальной активности выделенных нами пептидов использовали следующие штаммы: *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. Выбор вышеперечисленных штаммов обусловлен тем, что данные микроорганизмы являются возбудителями пищевых инфекций, в том числе зоонозов. Кроме этого, штаммы *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027 могут быть отнесены к мультирезистентным и обладали устойчивостью к антибактериальным препаратам следующих групп: пенициллины, фторхинолоны, макролиды, полипептиды, фениколы, аминогликозиды, цефалоспорины, линкозамиды.

При исследовании антимикробной активности белковой фракции № 3, выделенной из *G. mellonella* на стадии до окукливания, была установлена антимикробная активность в концентрации 0,18 мг/л по отношению к *S. aureus* ATCC 6538 (209-P). Белковая фракция № 6 на той же стадии развития насекомого имела антимикробную активность в концентрации 0,111 мг/л по отношению к *S. typhimurium* 1626, *S. aureus* ATCC 6538 (209-P), *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. Аналогичные результаты были получены на этом

же биологическом объекте на стадии окукливания, однако оптимальным является использование насекомых на стадии до окукливания ввиду сокращения временных и экономических ресурсов. В этой связи в дальнейших исследованиях для получения водорастворимых пептидов использовали биомассу личинок на стадии до окукливания. 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, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. 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. В отношении штамма *B. cereus* ATCC 10702 антимикробную активность проявляют пептиды № 3.2 и 3.6, кроме этого пептид 3.2 ингибировал рост *E. coli* 1027. 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, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027.

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 *S. typhimurium* 1626, а в концентрации 0,625 мг/л наблюдалась максимальная задержка роста *E. coli* 1027. Таким образом, пептид 1.2 обладал антимикробной активностью в большей степени к штаммам *S. typhimurium* 1626, *E. coli* 1027.

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 10 мг/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.

Анализируя данные по определению острой токсичности выделенных антимикробных пептидов можно заключить, что максимально возможные дозы для внутрижелудочного и парентерального введения не привели к гибели ни одного животного, следовательно, для 10 % раствора АМП среднесмертельную дозу установить не удалось. Таким образом, изучаемые антимикробные пептиды были отнесены к 4 классу опасности (вещества малоопасные).

По результатам изучения локализации 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 флуоресценции 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 флюоресценции, имеющей строго очерченную форму и границы. Кроме этого, отмечали довольно интенсивное свечение внутри структурных образований при микроскопии мазка отпечатка из печени 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 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.

Согласно полученным нами данным можно предположить, что пептиды обладают тропизмом преимущественно к печени и селезенке, участвующим в девитализации и элиминации патогенов из организма СХЖ и человека, а также врожденном и адаптивном иммунном ответе на таргетные антигены возбудителей ИБ.

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. Поскольку при инфекционных заболеваниях, в том числе поражается печень, в которой происходит инактивация токсинов и в тоже время метаболизация пептидов согласно нашим исследованиям. Кроме этого локализация пептидов в селезенке, как в одном из периферических органов иммунной системы, где происходит накопление антигена, активация Т- и В-лимфоцитов, взаимодействие антигена и иммунокомпетентных клеток способствует развитию специфического иммунного ответа. Таким образом, учитывая все

вышеперечисленные эффекты, оказываемые антимикробными пептидами, а также бактерицидное действие на патогены будет обуславливать их терапевтическое действие.

Научно-исследовательская работа по выделению наиболее перспективных АМП может стать основой для разработки высокоэффективных антимикробных препаратов, в том числе, направленных на решение проблемы нарушения микробиоценозов живых организмов, а также терапии заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами.



## Выводы

1. Разработана методика выделения водорастворимых пептидов из личинок *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* и изучены их физико-химические свойства. Получено 15 водорастворимых пептидов с молекулярной массой в диапазоне 3,4-6 кДа.

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

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

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

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

### **Практические предложения**

1. Для получения экспериментальных серий антимикробных пептидов из биомассы насекомых рекомендуется использовать разработанный нами оригинальный алгоритм, включающий в себя следующие стадии: гомогенизацию; экстракцию; центрифугирование; многократное высаливание сульфатом аммония; повторное растворение.
2. При разделении белковых фракций методом ВЭЖХ для получения антимикробных серий пептидов использовать время хроматографирования 43-46 минут при скорости потока 1 мл/мин и колонку BioSep S2000 300x2120 мм.
3. Экспериментальные серии антимикробных пептидов в перспективе могут быть использованы для лечения и профилактики пищевых инфекций.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

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

### Список условных обозначений и сокращений

АБ – антибиотики

АМП – антимикробные пептиды

БСА – бычий сывороточный альбумин

БЦЖ – вакцина туберкулезная

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

д/о – до окукливания

ИБ – инфекционные болезни

ИБЖ – инфекционные болезни животных

ИБ СХЖ – инфекционные болезни сельскохозяйственных животных

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

ПААГ – полиакриламидный гель

с/о – стадия окукливания

СХЖ – сельскохозяйственные животные

SDS-Na – додецилсульфат натрия

ФИТЦ – флуорисцеин изотиоционат

ФСБ – фосфатносолевой буфер

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

### Список литературы

1. Антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения / М. С. Жаркова Д. С. Орлов, В. Н. Кокряков, О. В. Шамова – Вестник СПбГУ. – 2014. – Сер. 3, Вып.1 – С. 98–114.
2. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях/ Ашмарин, И.П., Воробьев, А.А. – Ленинград: Медгиз. Ленингр. отд-ние, 1962. – 180 с.
3. 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.
4. Буряк, А.К. Изучение пептидного состава антибактериально активных фракций методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии / А.К. Буряк, О.С. Срибная, П.П. Пурыгин // Биомедицинская химия. – 2010 – Т. 56 (3). – С. 387-396.
5. Влияние биологически активных пептидных компонентов гемолимфы личинок *G. mellonella* на рост и на ферментативную активность *E. coli* / Д.А. Костина, О.С. Федоткина, Н.А. Кленова [и др.] // Известия Самарского научного центра РАН. – 2013. – Т.15, №1. – С. 567 - 574.
6. Выделение антибактериальных компонентов из гемолимфы личинок *G. mellonella* / П.П. Пурыгин, О.С. Срибная, Н.А. Кленова [и др.] // Вестник СамГУ. – 2007. – №9/1 (59). – С. 270–285.
7. Иммунологические методы. Под ред. Фримеля Г., пер. с нем. Тарасова А.П. - М.: Медицина, 1987. – 472 с.
8. 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.

9. Майорова, Н.А. Корма, комбикорма и сырье для их производства. Методика измерений массовой доли аминокислот методом капиллярного электрофореза с системы капиллярного электрофореза Капель. Методика М-04-38-2009 / Н.А. Майорова. – Спб.: Люмекс, 2009. – 35с.
10. Методические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021). Новая версия 2021-01.
11. 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.
12. Николаев, А.Я. Биологическая химия/ А.Я. Николаев. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 566 с.
13. 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.
14. ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар. Методические указания. – Введ. - Министерство здравоохранения Российской Федерации.
15. 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.
16. 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.

17. Пат. 2475036 С2 Российская Федерация, МПК А23J 1/14, А23J 3/14. Получение растворимого изолята белка канолы/ М. Швайцер, Б. Э. Грин, К. И. Сигалл, Д. Лоджи; Баркон ньютрасайнс корп.. – EDN YZCPBM. – № 2011105041/10: заявл. 10.07.2009: опубл. 20.02.2013.

18. 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.

19. 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.

20. 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.

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

22. 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.

23. Сычева М.В. Антимикробные пептиды тромбоцитов разного происхождения как эффекторы врожденного иммунитета: характеристика и

активность / Сычева М.В., Жерар И.В., Карташова О.Л. //Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2019. – № 3. – С. 20.

24. 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.

25. 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.

26. Acquired resistance to the rice blast in transgenic rice accumulating the antimicrobial peptide thanatin / T. Imamura, M. Yasuda, H. Kusano [et al.] // Transgenic Res. – 2010. – Vol. 19 (3). – P. 415 - 424.

27. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets / N.E. Hopman, E.C. Keessen, C. Harmanus [et al.] // Vet. Microbiol. – 2011. – Vol. 149. – P. 186–192.

28. Aedesin: structure and antimicrobial activity against multidrug resistant bacterial strains/ S. Godreuil, N. Leban, A. Padilla [et al.] // PLoS One 2014; 9:e105441-e105441.

29. 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.

30. A metaanalysis of major foodborne pathogens in Chinese food commodities between 2006 and 2016 / N. Paudyal, H. Pan, X. Liao et al. // Foodborne Pathogens and Disease. – 2018. – Vol. 15. – P. 187–197.

31. 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.

32. Anti-helicobacter pylori properties of the antivenom peptide bicarinalin /J. Guzman, N. T'en'e, A. Touchard [et al.]// Toxins. – 2018– Vol. 10 (1). – P. 21

33. Antimicrobial activity of human hepcidin 20 and 25 against clinically relevant bacterial strains: effect of copper and acidic pH / G. Maisetta, G. Maisetta, R. Petruzzelli [et al.] // Peptides. – 2010. – Vol. 31 (11). – P. 1995 - 2002.

34. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002/ D.A. Tadesse, S. Zhao, E. Tong [et al.]// *Emerg Infect Dis.* – 2012. – 18(5). – P. 741-749.
35. An antimicrobial peptide-A3: effects on growth performance, nutrient retention, intestinal and faecal microflora and intestinal morphology of broilers/ S.C. Choi, S.L. Ingale, J.S. Kim [et al.]// *Br. Poult. Sci.* – 2013. – Vol. 54. – P. 738–746.
36. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds / A. Lipkin, V. Anisimova, A. Nikonorova [et al.] // *Phytochemistry.* – 2005. – Vol. 66 (20). – P. 2426 - 2431.
37. Antimicrobial peptides as anti-infectives against *Staphylococcus epidermidis* / S. Agarwal, G. Sharma, S. Dang [et al.] // *Med. Princ. Pract.* – 2016. – Vol. 25. – P. 301–308.
38. 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.
39. Antimicrobial peptides from the edible insect *Musca domestica* and their preservation effect on chilled pork / X. Dang, X. Zheng, Y.Wang [et al.] // *J Food Process Preserv.* – 2019. – 00:e14369.
40. Antimicrobial peptides from the venom gland of the social wasp *Vespa tropica*/ X. Yang, Y. Wang, W.H. Lee [et al.]// *Toxicon.* – 2013. – Vol. 74. – P. 151–157.
41. Antimicrobial Peptides in 2014. / G. Wang, B. Mishra, K. Lau [et al.] // *Pharmaceuticals.* – 2015. – Vol. 8. – P. 123–150.
42. Antimicrobial peptides in domestic animals and their applications in veterinary medicine/ C.E. Valdez-Miramontes, J. De Haro-Acosta, C.F. Aréchiga-Flores [et al.] // *Peptides.* – 2021. – Vol. 142. – P. 170576.
43. Antimicrobial peptides: interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics / A. Hollmann, M. Martinez, P. Maturana [et al.] // *Front. Chem.* – 2018. – Vol. 6. – P. 1–13.



44. Antimicrobial peptides isolated from insects and their potential applications / N. Azmiera, A. Krasilnikova, S. Sahudin [et al.] // *Journal of Asia-Pacific Entomology*. – 2022. – Vol. 25. – 101892.
45. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance/ J. Mwangi, X. Hao, R. Lai [et al.] // *Zoological Research*. –2019. – Vol. 40(6). – P. 488-505.
46. Antimicrobial Susceptibility Trends Among Gram-Negative Bacilli Causing Bloodstream Infections: Results from the China Antimicrobial Resistance Surveillance Trial (CARST) Program, 2011–2020/ M. Yan, B. Zheng, Y. Li [et al.] // *Infection and Drug Resistance*. – 2022. – Vol. 15. – P.2325–2337.
47. 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.
48. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of *Bacillus cereus* in foods/ H. Rahnama, R. Azari, M. H. Yousefi [et al.] // *Food Control*. – 2023. – Vol. 143. – 109250.
49. *Bacillus cereus*-Induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: Epidemiology and genetic characterization / B. Glasset, S. Herbin, L. Guillier [et al.] // *Euro Surveillance*. – 2016. – Vol. 21. –30413.
50. *Bacillus cereus* isolated from vegetables in China: incidence, genetic diversity, virulence genes, and antimicrobial resistance / Yu, P., Yu, S., Wang, J. [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2019. – 11:848.
51. *Bacillus cereus*: public health burden associated with ready-to-eat foods in Himachal Pradesh / N. Rana, A.K. Panda, N. Pathak [et al.] // *J. Food Sci. Technol.* – 2020. – Vol. 57. – P. 2293–2302.
52. Baltzer, S.A. Antimicrobial peptides – promising alternatives to conventional antibiotics / S.A. Baltzer, M.H. Brown // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 20 (4). – P. 228–235.

53. Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores/ L. Yang, T. A. Harroun, T. M. Weiss [et al.] // *Bioph. J.* – 2001. – Vol. 81 (3). – P. 1475-1485.
54. Bédard, F. Recent progress in the chemical synthesis of class II and S-glycosylated bacteriocins / F. Bédard, E. Biron // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol.9 – P.1048.
55. Blocking of Plasmodium transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes/ V. Kokoza, A. Ahmed, S. Woon Shin [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2010. – Vol. 107 (18). – P. 8111–8116.
56. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? / K.A. Brogden // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2005. – Vol. 3. – P. 238–250.
57. Brogden, N. K. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? / N. K Brogden, K. A. Brogden // *International Journal of Antimicrobial Agents.* – 2011. – Vol. 38. – P. 217–225.
58. Carmona-Ribeiro, A. M. Novel Formulations for Antimicrobial Peptides / A. M. Carmona-Ribeiro, L. D. Melo Carrasco // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2014. – Vol.15 – P. 23-26.
59. 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.
60. Cationic antimicrobial peptides: Alternatives and/or adjuvants to antibiotics active against methicillin-resistant *S. aureus* and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* / R. Geitani, C.A. Moubareck, L. Touqui [et al.]// *BMC Microbiol.* –2019. –Vol.19–P. 54.
61. Characterisation of three alpha-helical antimicrobial peptides from the venom of *Scorpio maurus palmatus*/ P.L. Harrison, M.A. Abdel-Rahman, P.N. Strong [et al.] // *Toxicon.* – 2016. – Vol. 117. – P.30–36.

62. 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.
63. 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.
64. Clausen, M-L. Antimicrobial Peptides, Infections and the Skin Barrier / M-L. Clausen, T. Agner // *Curr Probl Dermatol.* – 2016. – Vol. 49. – P.38–46.
65. Combination strategies to enhance the efficacy of antimicrobial peptides against bacterial biofilms / L. Grassi, G. Maisetta, S. Esin [et al.] // *Front. Microbiol.* –2017. – Vol. 8. – P.2409.
66. Cross, A. Patterns of bacteraemia aetiology / A. Cross, M.M. Levine // *The Lancet Infectious Diseases.* – 2017. – Vol. 17. – P. 1005–1006.
67. Crystal Structure of the Plant Defensin NsD7 bound to Phosphatidic Acid / F.T. Lay, C.G. Adda, P.K. Vener [et al.] // *Proc Natl Acad Sci.* – 2016. – Vol.113. – P. 11202-11207.
68. 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.
69. De novo transcriptome analysis and detection of antimicrobial peptides of the American cockroach *Periplaneta americana* (Linnaeus) / I.-W. Kim, J.H. Lee, S. Subramaniyam [et al.] // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11 (5). – e0155304.
70. Determination of the disulfide array in sapecin, an antibacterial peptide of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) / T. Kuzuhara, Y. Nakajima, K. Matsuyama [et al.] // *J. Biochem.* – 1990. –Vol. 107. – P. 514–518.
71. Diamond, G. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense / G. Diamond // *Curr. Pharm. Des.* – 2009. – Vol. 15. – P. 2377 - 2392.

72. 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.
73. DRAMP 2.0, an updated data repository of antimicrobial peptides/ X., Kang, F. Dong, C. Shi [et al.] // *Sci Data.* – 2019. – Vol. 6. – P. 148.
74. Effects of antibacterial peptides on rumen fermentation function and rumen microorganisms in goats / Z. Ren, R. Yao, Q. Liu [et al.] // *PLoS One.* – 2019. – V. 14. e0221815.
75. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986.
76. Effects of dietary supplementation with an antimicrobial peptide-P5 on growth performance, nutrient retention, excreta and intestinal microflora and intestinal morphology of broilers / S.C. Choi, B.J. Chae, I.K. Kwon [et al.] // *Anim. Feed Sci. Technol.* – 2013. – Vol. 185. – P. 78–84.
77. Effects of dietary supplementation with an expressed fusion peptide bovine lactoferricin-lactoferrampin on performance, immune function and intestinal mucosal morphology in piglets weaned at age 21 d/ Z. Tang, Y. Yin, Y. Zhang [et al.] // *Br. J. Nutr.* – 2009. – Vol. 101. – P. 998–1005.
78. Effects of dietary supplementation with antimicrobial peptide-P5 on growth performance, apparent total tract digestibility, faecal and intestinal microflora and intestinal morphology of weanling pigs / J.H. Yoon, S.L. Ingale, J.S. Kim [et al.] // *J. Sci. Food Agric.* – 2013. – Vol. 93. – P. 587–592.
79. Effects of pig antibacterial peptides on growth performance and intestine mucosal immune of broiler chickens / H. Bao, R. She, T. Liu [et al.] // *Poult. Sci.* – 2009. – Vol. 88. – P. 291–297.
80. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli* / P. Stordeur, D. Marlier, J. Blanco [et al.] // *Vet. Microbio.* – 2002. – Vol. 84 (3). – P. 231-241.

81. Farrokhi, N. Plant peptides and peptidomics / N. Farrokhi, J.P. Whitelegge, J.A. Brusslan // *Plant Biotechnol J.* – 2008. – Vol. 6 – P. 105 – 134.
82. Fjell, C.D. Designing antimicrobial peptides: form follows function / C.D. Fjell // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2011. – Vol. 11 (1). – P. 37 – 51.
83. Fritig, B. Antimicrobial proteins in induced plant defense / B. Fritig, T. Heitz, M. Legrand // *Curr. Opin. Immunol.* – 1998. – Vol. 10 (1). – P. 16–22.
84. From design to screening: a new antimicrobial peptide discovery pipeline / S. A. Guralp, Y. E. Murgha, J.-M. Rouillard [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – 8:e59305.
85. Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity / T. Ganz // *Nat Rev Immunol.* –2003. – Vol. 3. – P. 710-720.
86. Garbacz, K. Activity of antimicrobial peptides, alone or combined with conventional antibiotics, against *S. aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients / K. Garbacz, W. Kamysz, L. Piechowicz // *Virulence.* – 2017. – Vol.8– P. 94–100.
87. 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.
88. Genome-wide identification of toll-like receptors in the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* and expression analysis responding to *Aeromonas hydrophila* infection / T. Liu, Y. Han, S. Chen [et al.] // *Fish Shellfish Immunol.* – 2019. – Vol. 87. – P. 478–489.
89. Genotoxic and cytotoxic activity of host defense peptides against human soft tissue sarcoma in an in vitro model / L. Steinstraesser, J. Hauk, A.-B. Sammy [et al.] // *Drug Chem. Toxicol.* – 2012. – Vol. 35 (1). – P. 96 - 103.
90. 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.

91. 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. – P. 1-7.
92. Gordon Y. J. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs/ Y.J. Gordon, E.G. Romanowski, A.M. McDermott // Curr. Eye Res. – 2005. –Vol. 30. – P. 505–515.
93. Griffiths, M. W. *Bacillus cereus* food poisoning/ M. W. Griffiths, H. Schraft // In F.borne Diseases, D. O. Cliver, & H. P. Riemann (Eds.) London: Academic press., 2002. – P. 261–270.
94. Gruber, C.W. Distribution and evolution of circular miniproteins in flowering plants / C.W. Gruber // Plant Cell. – 2008. – Vol. 20 (9). – P. 2471 - 2483.
95. Hancock, R.E.W. Peptide antibiotics / R.E.W. Hancock, D.S. Chapple //Antimicrob. Agents Chemother. – 1999. – Vol. 43 (6). – P. 1317–1323.
96. 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.
97. Hoffmann, J.A. Innate immunity of insects/ J.A. Hoffmann //Curr Opin Immunol. – 1995. – Vol. 7. – P. 4–10.
98. 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.
99. Host defense peptides in wound healing/ L. Steinstraesser, T. Koehler, F. Jacobsen [et al.] // Mol. Med. – 2008. – Vol. 14. – P. 528–537.
100. Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD9/ P. Presicce, S. Giannelli, A. Taddeo [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2009. – Vol. 86. – P. 941–948.

101. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells/ D. Yang, Q. Chen, O. Chertov [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2000. – Vol. 68. – P. 9–14.
102. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from the venom of the ant *Tetramorium bicarinatum* / A. Rifflet, S. Gavalda, N. T'en'e [et al.] // *Peptides*. – 2012. – 38 (2). – P. 363–370.
103. 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.
104. Identification and design of antimicrobial peptides for therapeutic applications. / A. Ahmad, E. Ahmad, G. Rabbani [et al.] // *Curr Protein Pept Sci.*– 2012.- P. 23.
105. Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin / I. Zelezetsky, U. Pag, N. Antcheva [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2005. – Vol. 434 (2). – P. 358–364.
106. Immunoinformatics analysis and evaluation of recombinant chimeric triple antigen toxoid (r-HAB) against *Staphylococcus aureus* toxaemia in mouse model / R.K. Kota, H.B. Kolla, P.N. Reddy [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2021. – Vol. 22-23. P. 8297–8311.
107. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by Cecropin D in vitro / X. Liu, C. Guo, Y. Huang [et al.] // *Infect. Genet. Evol.* – 2015. – Vol.34 – P. 7–16.
108. Insect antimicrobial peptides and their applications / H.-Y. Yi, M. Chowdhury, Y.-D. Huang [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* –2014. – Vol. 98– P. 5807–5822.
109. Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications / D. Brady, A. Grapputo, O., Romoli [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – P. 1–22.
110. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to

rabbit lung macrophage bactericidal peptides / J. Lambert, E. Keppi, J.L. Dimarcq [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1989. – Vol. 86 (1). – P. 262–266.

111. Jain, A. Marine antimicrobial peptide tachyplexin 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.

112. Kanost, M.R. Encyclopedia of Insects/ Kanost, M.R., Hemolymph. In: Resh, V.H., Carde, R.T. (Eds.) 2nd Edition – University of California: Academic Press: Berkeley, 2009. – P. 446–449.

113. 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.

114. Kokryakov, V.N. Biology of antibiotics of animal origin / SPb.: Science, 1999. – P.162.

115. Koszalka, P. Antitumor activity of antimicrobial peptides against U937 histiocytic cell line / P. Koszalka // Acta Biochim. – 2011. – Vol. 58 (1). – P. 111 - 117.

116. Kumar, P. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility / P. Kumar, J. N. Kizhakkedathu, S.K. Straus // In Vivo Biomolecules. – 2018. – Vol. 8(1). – P 4.

117. Kylsten, P. The cecropin locus in *Drosophila*; a compact gene cluster involved in the response to infection / P. Kylsten, C. Samakovlis, D. Hultmark // EMBO J. – 1990. – Vol. 9 (1). – P. 217–224.

118. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage/ U.K. Laemmli // Nature. –1970. – P. 680–685.

119. Lai Y. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense/ Y. Lai, R. L. Gallo // Trends Immunol. – 2009. –Vol. 30. – P. 131–141.

120. 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.



121. Lee, T.H. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure/ T.H. Lee, K.N. Hall, M.I. Aguilar // *Cur. Top. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 16 (1). – P. 25-39.
122. 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.
123. 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.
124. 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.
125. Li'evin-Le Moal, V. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota / V. Li'evin-Le Moal, A.L. Servin // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2006. – Vol. 19. – P. 315–337.
126. 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.
127. Loeffler, J.M. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase/ J. M. Loeffler, D. Nelson, V.A. Fischetti.// *Science.* – 2001. – Vol. 294. – P. 2170–2172.
128. 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.
129. Lu, J. Isolation, characterization and anti-cancer activity of SK84, a novel glycine-rich antimicrobial peptide from *Drosophila virilis*/ J. Lu, Z.-w. Chen // *Peptides.* – 2010. – Vol. 31. – P. 44–50.

130. 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.
131. 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.
132. Mao, X. Epidemiological analysis of 1060 bacterial foodborne diseases in China in 2003-2007 / X. Mao, J. Hu, X. Liu // *Chinese Journal of Food Hygiene.* – 2010. – Vol. 22. – P. 224–228.
133. Mechanistic and phenotypic studies of bicarinalin, BP100 and colistin action on *Acinetobacter baumannii* / M.G. Eales, E. Ferrari, A.D. Goddard [et al.] // *Res. Microbiol.* – 2018. – Vol. 169 (6). – P. 296–302.
134. Meister, M. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*/ M. Meister, B. Lemaitre, J.A. Hoffmann // *BioEssays.* – 1997. – Vol. 19 (11). – P. 1019–1026.
135. Meunier, O. From the discovery of antibiotics to emerging highly drug-resistant bacteria / O. Meunier // *Soins.* – 2015. – Vol. 797. – P. 14 - 20.
136. Molecular mechanism of action of  $\beta$ -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.
137. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance/ A.P. Magiorakos, A. Srinivasan, R.B. Carey [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection.* – 2012. – Vol. 18. – P. 268-281.
138. 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.

139. 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.
140. Nicole, L. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides / L. Nicole // Cell Mol Life Sci. – 2013. – Vol. 70 – P. 3545–3570.
141. Novel hybrid peptide cecropin A (1–8)-LL37 (17–30) with potential antibacterial activity / X.-B. Wei, R.-J. Wu, D.-Y. Si [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17. – P. 983.
142. Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in dairy products with an inactivation trial using D-Tryptophan and ascorbic acid in the rice pudding / M. Elafify, A.F. Alsayeqh, S.F. Aljasir [et al.] // LWT - Food Science and Technology. – 2023. – Vol. 175. – 114485.
143. Occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in swine / A. Farzan, R.M. Friendship, A. Cook [et al.] // Zoonoses Public Health. – 2010. – Vol. 57. P. 388–396.
144. 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.
145. 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.
146. Paola G. The effects of larval diet on adult life-history traits of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) / G. Paola, M.-S. Anabel, R. Santos // Eur. J. Entomol. – 2013. – Vol. 110(3). – P. 461–468.
147. Penetration of antimicrobial peptides in a lung surfactant model / L.M.P. Souza, J.B. Nascimento, A.L. Romeu [et al.] // Colloids Surf. B Biointerfaces. – 2018. – Vol. 167. – P. 345–353.

148. Pentamers not found in the universal proteome can enhance antigen specific immune responses and adjuvant vaccines/ A. Patel, J.C. Dong, B. Trost [et al.] // PLoS One. – 2012. – V. 7(8). – e43802.
149. Peptides in the hemolymph of *Hermetia illucens* larvae completely inhibit the growth of *Klebsiella pneumonia* in vitro and in vivo / D.-H. Lee, K.-B. Chu, H.-J. Kang [et al.] // J. Asia-Pac. Entomol. – 2020. – Vol. 23 (1). – P. 36–43.
150. Peters, B. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs / B. Peters, M.E. Shirtliff, M.A. Jabra-Rizk // PLoS Patho. – 2010. – Vol.6. – P.33-37.
151. Potent bactericidal effects of bicarinalin against strains of the *Enterobacter* and *Cronobacter genera*/ N. T'en'e, V. Roche-Chatain, A. Rifflet [et al.] // Food Control. – 2014. – Vol. 42. – P. 202–206.
152. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* from antibiotic-free broilers during organic and conventional processing / M. Bailey, R. Taylor, J. Brar [et al.] // J Food Prot. – 2020. – Vol. 83(3). – P. 491–496.
153. Prevalence and characterization of food-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in China / S. Wu, J. Huang, F. Zhang [et al.] // Front. Microbiol. – 2019. – 10: 304.
154. Prevalence of antimicrobial resistance (AMR) *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from broilers in the East Coast of Peninsular Malaysia/ S. Ibrahim, L.W. Hoong, Y.L. Siong [et al.] // Antibiotics. – 2021. – Vol. 10. – P. 579.
155. Prime-boost BCG vaccination with DNA vaccines based in betadefensin-2 and mycobacterial antigens ESAT6 or Ag85B improve protection in a tuberculosis experimental model / A.R. Cervantes-Villagrana, R. Hernandez-Pando, A. Biragyn [et al.] // Vaccine. – 2013. –Vol. 31. – P. 676–684.
156. Prophage-encoded immune evasion factors are critical for *Staphylococcus aureus* host infection, switching, and adaptation / Chaguza C., Smith J.T., Bruce S.A. [et al.] // Cell Genomics. – 2022. – Vol. 2. 100194.

157. Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193 (1). – P. 265-275.
158. Pse-T2, an antimicrobial peptide with high-level, broadspectrum antimicrobial potency and skin biocompatibility against multidrugresistant *pseudomonas aeruginosa* infection / H.K. Kang, C.H. Seo, T. Luchian [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2018. – Vol. 62 (12). –e01493–18.
159. Rahnamaeian, M. Antimicrobial peptides. Modes of mechanism, modulation of defense responses / M. Rahnamaeian // *Plant Signal Behav.* – 2011. – Vol. 6 (9). – P. 1325 - 1332.
160. 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.
161. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus noncarriers / H.F.L. Wertheim, M.C. Vos, A. Ott [et al.] // *Lancet.* – 2004. –Vol. 364. P. 703–70.
162. Rodríguez-Rojas, A. Antimicrobials, stress and mutagenesis / A. Rodríguez-Rojas, O. Makarova, J. Rol // *PLoS Pathog.* –2014.–Vol.10. – P. 12 -14.
163. Rodvold, K.A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Therapy: Past, Present, and Future / K.A. Rodvold, K.W. McConeghy // *Clinical Infectious Diseases.* – 2014. – 58:S20–7.
164. Rosen, T. Antibiotic resistance: an editorial review with recommendations / T. Rosen // *J Drugs Dermatol.* – 2011. – Vol.10– P. 724-733.
165. Sang, Y. Porcine host defense peptides: expanding repertoire and functions / Y. Sang, F. Blecha // *Dev. Comp. Immunol.* – 2009. – Vol. 33 (3). – P. 334 - 343.
166. Saulnier, D.M. Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation / D.M. Saulnier, S. Kolida, G.R. Gibson // *Curr. Pharm. Des.* – 2009. – Vol. 15 – P. 1403–1414.

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

168. Structure–activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2 / A. Hocquellet, B. Odaert, C. Cabanne [et al.] // *Peptides.* – 2010. – Vol. 31 (1). – P. 58 – 66.

169. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in a colony / D.C. Sheppard, J.K. Tomberlin, J.A. Joyce [et al.] // *Journal of Medical Entomology.* – 2002. – Vol. 39(4). – P. 695–698.

170. Salmonellosis in Finishing Pigs in Spain: Prevalence / J.P. Vico, I. Rol, V. Garrido [et al.] // *Antimicrobial Agent Susceptibilities, and Risk Factor Analysis, Journal of Food Protection.* – 2011. – Vol. 74 (7). – P. 1070–1078.

171. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity / H. Steiner, D. Hultmark, Å. Engström [et al.] // *Nature.* – 1981. – Vol. 292 (5820). – P. 246–248.

172. Shin, H.S. Novel attacin from *Hermetia illucens*: cDNA cloning, characterization, and antibacterial properties/ H.S. Shin, S.-I. Park// *Prep. Biochem. Biotech.* – 2019. – Vol. 49 (3). – P. 279–285.

173. 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.

174. Silva, P. M. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes / P.M. Silva, S. Gonçalves, N. C. Santos // *Front. Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 97.

175. Sonorensin: an antimicrobial peptide, belonging to the heterocycloanthracin subfamily of bacteriocins, from a new marine isolate, *Bacillus sonorensis* MT93 / L. Chopra, G. Singh, V. Choudhary [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – Vol. 80. – P. 2981–2990.

176. Sornchuer, P. Prevalence, virulence genes, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* isolated from foodstuffs in Pathum Thani Province, Thailand / P. Sornchuer, R. Tiengtip // *Pharmaceutical Sciences Asia*. – 2021. – Vol. 48(2). – P. 194–203.

177. 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.

178. Synergistic efficacy of *Aedes aegypti* antimicrobial peptide cecropin A2 and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa* / Z. Zheng, N. Tharmalingam, Q. Liu et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2017. – 61 (7) :e00686-17.

179. 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.

180. Technological Potential of Antimicrobial Peptides / V. Machado, J. Gelinski, C. M. Baratto [et al.] // *Indian journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2020. – P. 1–23.

181. 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.

182. 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.

183. The antimicrobial peptide thanatin reduces fungal infections in Arabidopsis: thanatin reduces fungal infection in plants / A. Koch, W. Khalifa, G. Langen [et al.] // *J. Phytopathol.* – 2012. – Vol. 160 (10). – P. 606 - 610.

184. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections / N.J. Afacan, A.TY. Yeung, O.M. Pena [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2012. – Vol. 18. – P. 807–819.

185. The evolutionary genomics of host specificity in *Staphylococcus aureus* / M. Matuszewska, G.G.R. Murray, E.M. Harrison [et al.] // Trends Microbiol. – 2020. Vol. 28. – P. 465–477.
186. The structure and biological functions of  $\beta$ -hairpin antimicrobial peptides / P.V. Panteleev, I.A. Bolosov, S.V. Balandin [et al.] // Actanaturae – 2015. – Vol. 1 (24). – P. 39-50.
187. 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.
188. Tonk, M. The medical potential of antimicrobial peptides from insects / M. Tonk, A. Vilcinskas.// Curr. Top. Med. Chem. – 2017. – Vol. 17. – P. 554–575.
189. Tosi, M. F. Innate immune responses to infection / M. F. Tosi, J. Allergy // Clin. Immunol. – 2005.–Vol. 116, N 2. – P. 241–249.
190. Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom / X. Xu, J. Li, Q. Lu [et al.] // Toxicon. – 2006. – Vol. 47 (2). – P. 249–253.
191. Use of recombinant porcine beta-defensin 2 as a medicated feed additive for weaned piglets / Z. Peng, A. Wang, L. Xie [et al.] // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. 26790.
192. Venom of *Scorpio maurus palmatus* / M.A. Abdel-Rahman, P.N. Strong, M. Tawfik [et al.] // Toxicon. – 2016. - Vol.117 – P.30-36.
193. Wang, G. Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies / G. Wang // Advances in molecular and cellular microbiology. CAB International. – 2010. – Vol. 18. – P. 230.
194. Wang, G. Database-guided discovery of potent peptides to combat HIV-1 or superbugs / G. Wang // Pharmaceuticals. – 2013. – Vol. 6. – P. 728–758.
195. Wang, Z. The Antimicrobial Peptide Database, Nucleic Acids Research / Z. Wang, G.Wang// APD. – 2004. – Vol.32. – P. 32-34.



196. Wiesner J. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system / J. Wiesner, A. Vilcinskas // *Virulence*. – 2010. – Vol. 1 (5). – P. 440 - 464.
197. 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.
198. 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.
199. World Organisation for Animal Health. OIE annual report on antimicrobial agents intended for use in animals. Better understanding of the global situation; 2020 [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/AMR/A\\_Fourth\\_Annual\\_Report\\_AMR.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_Fourth_Annual_Report_AMR.pdf)ExternalLink
200. Wu, T. Expression of antimicrobial peptides thanatin (S) in transgenic *Arabidopsis* enhanced resistance to phytopathogenic fungi and bacteria / T. Wu, D. Tang, W. Chen // *Gene*. – 2013. – Vol. 527 (1). – P. 235 - 242.
201. Wu, Q. Insect antimicrobial peptides, a mini review / Q.Wu, J. Patočka, K. Kuřca // *Toxins*. – 2018. – Vol.10. – P. 461.

## Приложения

