



УДК 577.181:577.112.6

СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ. IV. ВЛИЯНИЕ КАТИОННЫХ ГРУПП ЛИЗИНА, АРГИНИНА И ГИСТИДИНА НА АНТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ С “КРУГОВЫМ” ТИПОМ АМФИПАТИЧНОСТИ

© 2022 г. Н. В. Амирханов*, #, А. В. Бардашева*, Н. В. Тикунова*, Д. В. Пышный*

*ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 11.03.2022 г.

После доработки 25.03.2022 г.

Принята к публикации 28.03.2022 г.

В данной работе синтезированы три новых синтетических антимикробных пептида (САМП) FXFFXFFXFF (X5F5), обладающих “круговым” (спиральным или циклическим) типом амфипатичности (КТА), содержащих катионные аминокислотные остатки аргинина, лизина или гистидина (X = Arg, Lys или His), исследована антимикробная и гемолитическая активность синтезированных пептидных препаратов. Показано, что в целом такие пептиды в сравнении с САМП XXXXXXXXXXFF (X9F2), обладающими “линейным” типом амфипатичности (ЛТА), проявляют более чем в 8 раз большую антибактериальную и в ~2 раза меньшую противогрибковую активность. Выявлено, что по отношению к бактериальным клеткам *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* и *Pseudomonas aeruginosa* наибольшей антибактериальной активностью обладают пептиды, содержащие в качестве катионных составляющих остатки аргинина, а наименьшей – пептиды с остатками гистидина. По отношению к грибковым культурам *Candida albicans*, напротив, наибольшей фунгицидной активностью обладают пептиды, содержащие в качестве катионных составляющих гистидиновые остатки. Показано, что исследованные пептиды X5F5, независимо от их катионного состава, обладают повышенной гемолитической активностью (20–60% гемолиза при 500 мкМ концентрации пептидов в среде) по сравнению с пептидами, обладающими “линейным” типом амфипатичности X9F2 (не более 4% гемолиза при той же концентрации пептидов). Несмотря на свою относительно высокую гемолитическую активность, средняя бактериальная селективность исследованных пептидов X5F5 остается достаточно высокой, среднегеометрический терапевтический индекс (СГТИ) для которых составляет ~10, за исключением пептида H5F5, содержащего остатки гистидина (СГТИ = 0.5). В то же время селективность гистидин-содержащего пептида H5F5 по отношению к клеткам грибов (ГИ = 2.7) в 5 раз выше его селективности по отношению к бактериальным клеткам, но в 200 раз ниже фунгицидной селективности гистидин-содержащего пептида H9F2 (ГИ = 571.4), обладающего “линейным” типом амфипатичности. Учитывая повышенную антибактериальную активность препаратов на основе САМП X5F5 с “круговым” типом амфипатичности, для создания антибактериальных препаратов наиболее перспективны пептиды, содержащие в качестве катионных групп аминокислотные остатки аргинина (R5F5) и лизина (K5F5), а для создания противогрибковых агентов – пептиды с “линейным” типом амфипатичности, содержащие в качестве катионных групп аминокислотные остатки гистидина (H9F2).

Ключевые слова: синтетические антимикробные пептиды, амфифильность, “линейный” тип амфипатичности, “круговой” тип амфипатичности, гемолитическая активность, селективность, антимикробная активность, фунгицидная активность, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*

DOI: 10.31857/S0132342322050049

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все более актуальным становится поиск новых типов антибиотиков (анти-

микробных препаратов), к которым патогенные микроорганизмы не способны были бы вырабатывать устойчивость. Перспективными в этом плане могут оказаться выявленные в природе ан-

Сокращения: АБА – антибактериальная активность; АМП – антимикробные пептиды; ГА – гемолитическая активность; КТА – “круговой” тип амфипатичности; ЛТА – “линейный” тип амфипатичности; МГК – минимальная гемолитическая концентрация (концентрация пептида, которая вызывает лизис не более 4% свежих красных кровяных клеток); МПК₅₀ – минимальная подавляющая концентрация (концентрация пептида, при которой рост микроорганизмов подавляется на 50%); САМП – синтетические антимикробные пептиды; ФА – фунгицидная активность; ХГ – хлоргексидин; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; HATU – 2-(1H-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионийгексафторфосфат; Hst – гистатин; PBS – фосфатно-солевой буфер; TFA – трифторуксусная кислота.

Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-35; эл. почта: nariman@niboch.nsc.ru).

тимикробные пептиды (АМП), синтезирующиеся в ответ на контакт с чужеродными микроорганизмами или их внедрение [1–4]. АМП – это в основном амфифильные катионные пептиды, которые воздействуют на отрицательно заряженную мембрану микробных клеток. В результате такого воздействия развитие резистентности патогенов к АМП в значительной степени затруднено, поскольку требует внесения серьезных изменений в структуру и электрофизиологические свойства их клеточной мембраны [1, 4–7].

В последнее время для исследования зависимости биологических свойств АМП от их структуры и аминокислотного состава с целью моделирования и поиска оптимальных и максимально простых по составу структур АМП с новыми улучшенными свойствами все больше используются искусственно создаваемые синтетические антимикробные пептиды (САМП) [4, 8–10], которые отличаются от природных АМП [11–14] или от их синтетических аналогов [9, 15–18] тем, что они могут быть сконструированы *de novo*, т.е. независимо от структуры многочисленно известных природных АМП [4, 8–10, 18–21]. Конструирование таких САМП должно быть основано на двух общих принципах воздействия АМП на микробные клетки, в частности на принципах *катионности* цепи и *амфифильности* пептида, т.е. наличия в молекуле пептида одновременно гидрофобных и гидрофильных катионных положительно заряженных групп [8, 9, 18]. Катионность цепи способствует взаимодействию с отрицательно заряженными микробными поверхностями, а гидрофобность позволяет встраиваться в микробные мембраны.

Однако для эффективного воздействия на мембраны микробных клеток наличия хаотично расположенных амфифильных групп в таких пептидах недостаточно. Существенное влияние на проявление биологических свойств может оказать последовательная линейная сгруппированность амфифильных групп вдоль цепи самой пептидной молекулы или образуемая определенным образом сосредоточенность таких групп в пространстве. Например, в зависимости от характера или типа сгруппированности и взаимного расположения полярных (гидрофильных и гидрофобных) амфифильных групп в АМП относительно друг друга в пространстве такие катионные амфифильные пептиды могут быть разделены на два подтипа или класса *амфипатичности*: пептиды с классическим широко известным и хорошо исследованным в литературе “*круговым*” (спиральным или кольцевым) типом амфипатичности (КТА) [2, 12, 13, 21, 22] (рис. 1а) и пептиды с малоизвестным “*линейным*” типом амфипатичности (ЛТА) (рис. 1б) [23–25]. Следует подчеркнуть, что пространственная сгруппированность амфифильных групп в САМП-КТА предполагает обязательное наличие α -спиральной структурированности самой молекулы пептида, благодаря которой на молекуле пептида образуются разделенные в про-

странстве своеобразные поверхности – гидрофильная “*спинка*” и гидрофобный “*животик*” (рис. 1а), тогда как в случае САМП-ЛТА достаточно лишь последовательного (линейного) расположения катионных групп друг за другом, образующих так называемую “*хвостовую*” катионную (гидрофильную) область пептидной молекулы и отдельную концевую часть в виде гидрофобной “*головки*” (рис. 1б). Оба типа таких пептидов (САМП-КТА и САМП-ЛТА) считаются амфифильными, поскольку имеют одновременно и гидрофильные, и гидрофобные группы, однако обладают различным типом амфипатичности, т.е. различным типом взаимного расположения амфифильных групп в пространстве.

Предполагается, что вследствие такой разной геометрической структурированности САМП-КТА и САМП-ЛТА механизмы и эффективность воздействия этих пептидов на микроорганизмы, так же как и их различная структура, могут быть разными [23, 24]. Говоря же о терапевтической значимости и токсичности таких пептидов, можно обратить внимание, например, на то, что САМП-КТА, исходя из своей структуры, должны быть более гидрофобными, а соответственно, и более токсичными по отношению к красным кровяным тельцам, т.е. обладать большей гемолитической активностью, чем САМП-ЛТА [23, 24].

Помимо разного типа амфипатичности пептидов на эффективность биологического воздействия также может оказывать влияние и их различный *катионный состав* [25]. Так, например, ранее было показано, что наличие различных катионных аминокислотных остатков, таких как аргинин, лизин или гистидин, в модельных САМП-ЛТА XXXXXXXXXXFF (**X9F2**) (X = Arg, Lys или His), по-разному способно влиять на антимикробную активность самого пептида [25]. Было выявлено, что аргинин- и лизин-содержащие производные таких пептидов обладают повышенной антибактериальной активностью, а пептиды, содержащие остатки гистидина, – повышенной антигрибковой активностью [25].

Тем не менее на настоящий момент аналогичное влияние катионного аминокислотного состава на свойства САМП-КТА, обладающих классическим “*круговым*” типом амфипатичности, не было исследовано. В настоящей работе нам необходимо было выяснить, уникальны ли обнаруженные для САМП-ЛТА особенности их антимикробной активности в зависимости от катионного аминокислотного состава или такими же особенностями обладают и САМП-КТА. Также необходимо было сравнить биологические свойства таких типов САМП друг с другом.

Цель настоящей работы – синтез и сравнительное исследование антимикробных и гемолитических свойств, а также оценка терапевтического индекса САМП: RFRRFFRRFF, KFK-

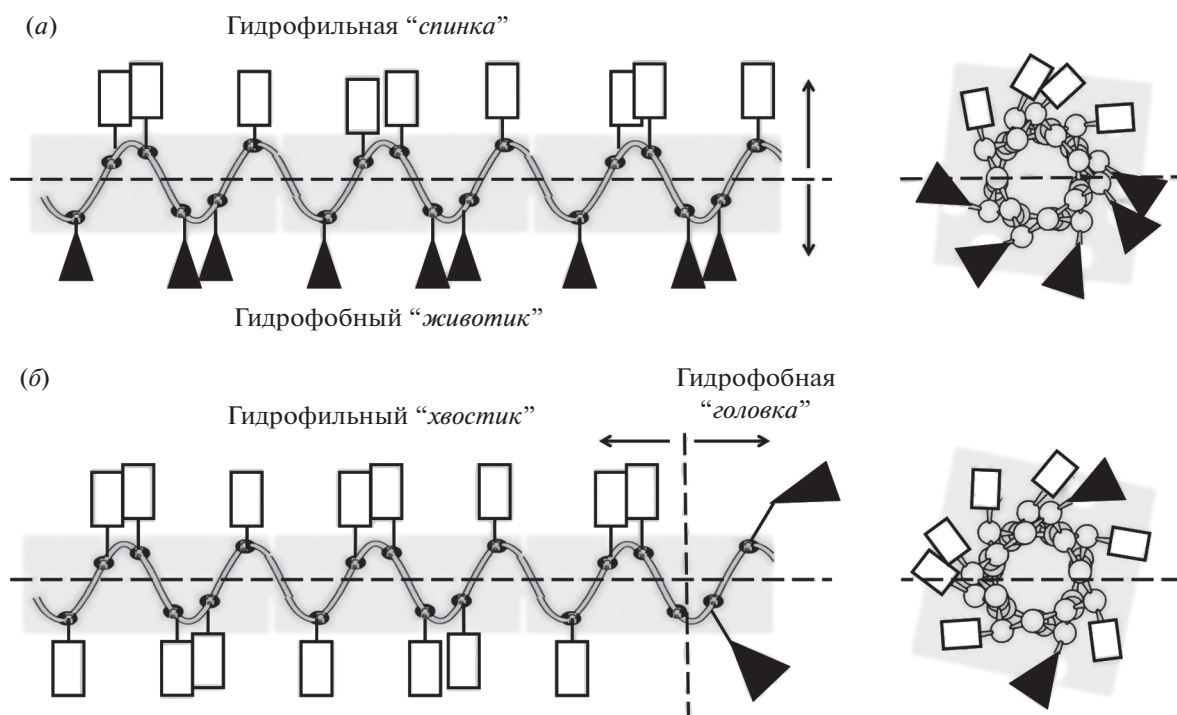


Рис. 1. Гипотетическое представление классического “кругового” (а) и “линейного” (б) типов амфипатичности α -спиральных пептидов. Прямоугольниками обозначены гидрофильные или катионные остатки аминокислот, треугольниками – гидрофобные остатки. В случае классического “кругового” типа амфипатичности (КТА) [2, 12, 13] гидрофобные и гидрофильные полярные поверхности α -спиральной молекулы пептида разделены продольной осевой линией (а). На рисунке верхняя поверхность гидрофильная, нижняя – гидрофобная (амфипатичность по типу “спинка–животик”). В случае линейного типа амфипатичности (ЛТА) гидрофобные и гидрофильные (катионные) остатки аминокислот разнесены на противоположных концах вдоль линейной оси пептида. Гидрофобная и гидрофильная полярные области в этом случае разделены поперечной линией, перпендикулярной продольной оси пептида (б), где один (левый) конец молекулы имеет гидрофильный “хвостик”, а противоположный (правый) – гидрофобную “головку”. Справа представлены двумерные проекции “спиральных колес” Шиффер и Эдмундсона [21, 22] этих же пептидов. Видно, что полярная однородность гидрофобных и гидрофильных групп в случае “линейного” типа амфипатичности (б) в проекции, представленной слева, гораздо выше, чем когда та же молекула представлена в классическом виде в виде двумерных проекций “спиральных колес” (справа).

KFFKKFF и HFHFFHFF (**X5F5**) (X = Arg, Lys или His), обладающих так называемым “круговым” (спиральным) типом амфипатичности, в зависимости от их катионного аминокислотного состава (аргинина, лизина или гистидина), а также сравнение полученных результатов с аналогичными данными для пептидов с “линейным” типом амфипатичности: RRRRRRRRFF, KKK-KKKKKKFF и HHHHHHHHFF (**X9F2**).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура, синтез и физико-химические свойства пептидов. В качестве модельных последовательностей для изучения свойств САМП-КТА и САМП-ЛТА нами были использованы соответствующие пептиды общей структуры XFXXFFXFF (**X5F5**) и XXXXXXXXFF (**X9F2**) (X = Arg, Lys или His), состоящие из катионных остатков аргинина, лизина или гистидина и гидрофобных остатков фенилаланина.

Последовательности пептидов **X5F5** построены таким образом, что в проекциях спиральных колец [2, 21, 22] все катионные (гидрофильные) аминокислотные остатки расположены компактно на одной стороне круга, а гидрофобные остатки – на противоположной (рис. 2а), а на самой молекуле пептида эти остатки образуют разделенные друг от друга, соответственно, гидрофильные и гидрофобные поверхности (рис. 1а).

Напротив, в случае пептидов **X9F2** с “линейным” типом амфипатичности катионные (X) и гидрофобные (F) группы в двумерных проекциях расположены хаотично по проекционному кругу (рис. 2б) и не образуют таким образом “круговой” тип амфипатичности. Полярно противоположные (гидрофобные и гидрофильные) амфифильные группы в таких пептидах компактно распределены по концам линейно вытянутой молекулы, образуя таким образом “линейный” тип амфипатичности, когда все катионные остатки сосредоточены на одном конце цепи в виде так называемого гидрофильного “хвоста”, а гидрофобные

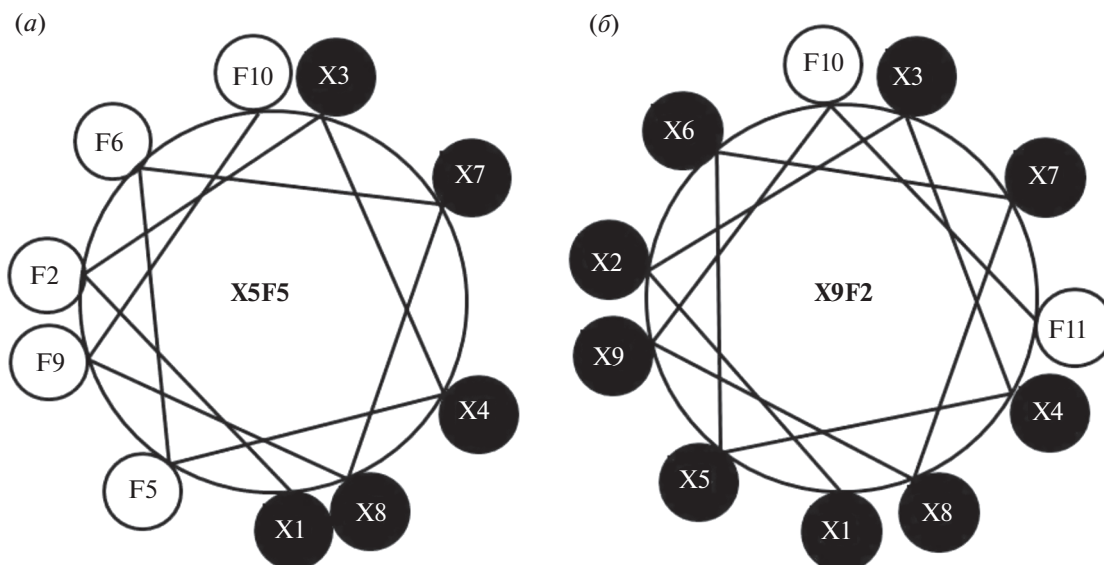


Рис. 2. Структуры пептидов XFXXFFXXFF (**X5F5**) (а) и XXXXXXXXXFF (**X9F2**) (б) (X = Arg, Lys, His), образующих, соответственно, “круговой” и “линейный” тип амфипатичности, представленные в виде двумерных проекций “спиральных колес” Шиффер и Эдмундсона [2, 21, 22]. Видно, что последовательности аминокислот в пептиде **X5F5** сконструированы таким образом, что все пять гидрофильных остатков расположены на одной стороне круговой проекции, а пять гидрофобных остатков – на противоположной стороне круга, образуя таким образом некую полярную однородность гидрофобных и гидрофильных групп, т.е. строго амфипатичную гидрофобно-гидрофильную круговую асимметрию. В проекциях пептида **X9F2** амфифильные группы расположены хаотично по кругу, не образуя при этом какую-либо строгую асимметрию, характерную для “кругового” типа амфипатичности.

остатки – на другом конце цепи в виде так называемой гидрофобной “головки” (рис. 1б).

Синтез пептидов **X5F5** и **X9F2** проводили стандартным твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии [26] согласно ранее опубликованной схеме [25] на пептидном синтезаторе PS3. Структура синтезированных пептидов **X5F5** и **X9F2** ($\text{H}_2\text{N-XFXXFFXXFF-C(O)NH}_2$ и $\text{H}_2\text{N-X}_9\text{F}_2\text{-C(O)NH}_2$ (X = Arg, Lys, His)) включала в себя последовательность аминокислот, содержащую свободную N-концевую аминогруппу (придающую пептиду дополнительный положительный заряд), и амидную группу на C-конце цепи, нейтрализующую отрицательный заряд свободной концевой карбоксильной группы. Эффективность присоединения одного аминокислотного мономерного звена, определенная путем измерения количества удаляемых Fmoc-групп на каждой стадии конденсации, для синтезированных пептидов в среднем составляла 96.9–99.8%. Конечные выходы пептидов после деблокирования, удаления с полимерного носителя и очистки методом оФВЭЖХ составили ~58–63% для САМП-КТА **X5F5** и ~56–63% для САМП-ЛТА **X9F2** (табл. 1). По данным оФВЭЖХ и масс-спектрометрии, все выделенные пептиды соответствовали ожидаемой структуре и были гомогенными с содержанием основного вещества не менее 95%. Время удерживания на колонке при оФВЭЖХ САМП-КТА **X5F5** по сравнению с соответствующими САМП-ЛТА **X9F2** [25] (табл. 1) было в це-

лом закономерно выше, что связано с увеличенным содержанием в их составе гидрофобных остатков фенилаланина (пять и два остатка Phe соответственно). Согласно этим данным, в случае как САМП-КТА **X5F5**, так и САМП-ЛТА **X9F2** наиболее гидрофобны пептиды, содержащие в качестве катионных групп остатки аргинина, затем – остатки гистидина, наименьшей гидрофобностью обладают пептиды, содержащие остатки лизина.

Таким образом, синтез всех пептидов **X5F5** в указанном режиме проходит достаточно эффективно, как и в случае ранее полученных пептидов **X9F2** [25] с относительно высокими выходами независимо от состава аминокислот в структуре пептида, а зависимость гидрофобности соответствующих пептидов от их катионного состава по данным оФВЭЖХ для САМП-КТА и САМП-ЛТА может быть расположена в одном ряду следующим образом:



Антимикробная активность пептидов. Антимикробную активность пептидов **X5F5** и **X9F2** изучали с использованием культур микроорганизмов: грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*), а также условно-

Таблица 1. Физико-химические характеристики пептидов

Пептид	Структура	Общий выход синтеза ^а , %	Время удерживания ^б , мин		Молекулярная масса	
			80% CH ₃ CN	50% CH ₃ CN	расч. [M + H]	эсп. [M + H]
САМП-КТА X5F5 (X – Arg, Lys или His)						
R5F5	RFRRFFRRFF	60.3	17.5	22.6	1533.8	1533.4
K5F5	KFKKFFKKFF	57.8	16.9	21.9	1393.8	1393.2
H5F5	HFHFFHFF	62.9	17.0	22.0	1438.6	1438.2
САМП-ЛТА X9F2 (X – Arg, Lys или His)						
R9F2	RRRRRRRRFF	56.0	15.5	20.4	1717.0	1716.5
K9F2	KKKKKKKKFF	57.8	14.6	18.2	1465.0	1465.3
H9F2	HHHHHHHFF	62.9	15.6	20.0	1545.7	1545.8

^а Конечный выход после удаления с полимерного носителя и очистки методом оФВЭЖХ в расчете на первую загруженную аминокислоту на полимерном носителе.

^б В условиях аналитической оФВЭЖХ (условия – см. “Эксперим. часть”).

патогенного дрожжеподобного гриба *Candida albicans*.

Тестируемые пептиды в конечных концентрациях 0.3–100 мкМ добавляли к культурам клеток микроорганизмов и наблюдали за ростом клеток. Влияние присутствия пептидов в культуральной среде на рост клеток контролировали измерением оптической плотности суспензии клеток при длине волны 595 нм в течение 24 ч [23–25].

Для оценки антимикробной активности исследованных пептидов были определены их минимальные подавляющие концентрации (МПК₅₀), при воздействии которых доля микробных частиц составляла 50% от концентрации частиц в контрольной культуре [25]. Для сравнения усредненной антимикробной активности пептидных препаратов для всех протестированных культур микроорганизмов были определены их среднегеометрические (СГ) [27, 28] значения МПК₅₀. Значения МПК₅₀ и СГ МПК₅₀, характеризующие антимикробную активность каждой из групп САМП-КТА **X5F5** и САМП-ЛТА **X9F2**, представлены в табл. 2.

В качестве универсальных положительных контролей для сравнения относительной антимикробной активности исследуемых пептидов использовали известные антисептические препараты – водные растворы нитрата серебра (AgNO₃) и хлоргексидина (ХГ). В некоторых случаях антимикробная активность исследуемых пептидов значительно превышала активность контрольных препаратов AgNO₃ и ХГ, а в других – оказалась ниже. Например, в случае дрожжевой культуры *C. albicans* значения МПК₅₀ для всех исследуемых пептидов – как САМП-КТА, так и САМП-ЛТА (МПК₅₀ от 1.4 до 25.9 мкМ) – были ниже, чем МПК₅₀ для контрольных препаратов AgNO₃ и ХГ (МПК₅₀ = 57.8 и 33.4 мкМ) (табл. 2), что указывает

на большую противогрибковую активность исследуемых пептидов по сравнению с AgNO₃ и ХГ. В случае же бактериальных культур, напротив, антибактериальная активность контрольных препаратов AgNO₃ и ХГ была выше (СГ МПК₅₀ = 38.6 и 7.6 мкМ), чем у исследуемых пептидов. Таким образом, AgNO₃ и ХГ проявили себя в качестве удобных, универсальных и надежных положительных контролей для исследования как антимикробной, так и антигрибковой активности САМП-КТА и САМП-ЛТА.

При сравнении антибактериальной активности пептидов в зависимости от их катионного состава следует отметить, что в группе исследуемых САМП-КТА максимальным антибактериальным действием по отношению ко всем исследованным бактериальным культурам, т.е. наименьшим значением СГ МПК₅₀, обладает аргинин-содержащий пептид **R5F5** (3.3 мкМ), следующим по активности в этой группе пептидов оказался пептид **K5F5** (5.5 мкМ), содержащий остаток лизина, тогда как пептид **H5F5**, содержащий остатки гистидина, проявил существенно меньшую активность (46.4 мкМ) (табл. 2). Аналогичная закономерность зависимости антибактериальной активности от катионного состава аминокислот наблюдается и в группе САМП-ЛТА **X9F2**. Таким образом, средняя антибактериальная активность для каждого из пептидов группы САМП-КТА и САМП-ЛТА в зависимости от их катионного состава понижается в ряду:



Средняя антигрибковая активность (по отношению к условно-патогенной дрожжевой культуре *C. albicans*) для этих же пептидов (табл. 2), напротив, в каждой группе максимальна для гисти-

Таблица 2. Антимикробная активность пептидов

Пептид	МПК ₅₀ , мкМ					СГ ₁ , мкМ
	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
САМП-КТА X5F5 (X – Arg, Lys или His)						
R5F5	17.0	6.2	4.7	2.1	1.9	3.3
K5F5	25.9	17.0	6.5	3.2	2.6	5.5
H5F5	7.7	58.1	80.0	30.3	32.8	46.4
СГ ₂ , мкМ	15.0	18.3	13.5	5.9	5.5	9.4 ^a
САМП-ЛТА X9F2 (X – Arg, Lys или His)						
R9F2	12.9	44.2	46.0	68.8	67.0	55.3
K9F2	18.9	>100.0	74.0	>100.0	70.5	>72.2
H9F2	1.4	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0
СГ ₂ , мкМ	7.0	≥76.2	>69.8	≥88.3	≥77.9	>77.8 ^a
AgNO ₃ ^б	57.8	51.2	32.9	39.5	33.5	38.6
ХГ ^б	33.4	4.1	6.5	12.0	10.5	7.6

СГ₁ – среднегеометрические значения МПК₅₀ по всем бактериям отдельно для каждого пептида (СГ по горизонтали, учитывая лишь бактериальные культуры).

СГ₂ – среднегеометрические значения МПК₅₀ по всем трем пептидам (X – Arg, Lys и His) для каждой культуры клеток отдельно (СГ по вертикали).

^a Суммарное среднегеометрическое значение МПК₅₀ по всем бактериям и пептидам для соответствующей группы САМП-КТА и САМП-ЛТА.

^б Водные растворы нитрата серебра (AgNO₃) и хлоргексидина (ХГ) использовали в качестве внутренних положительных контролей для сравнения относительной антимикробной активности пептидов.

дин-содержащих пептидов H5F5 и H9F2 (МПК₅₀ = 7.7 и 1.4 мкМ соответственно):



Таким образом, катионный состав АМП играет существенную роль, как в случае САМП-КТА, так и САМП-ЛТА, и обуславливает различное воздействие на клетки бактерий и грибов.

В каждой группе пептидных препаратов в отдельности были определены также суммарные среднегеометрические значения МПК₅₀ (СГ₁, табл. 2) по всем четырем видам исследованных бактериальных культур и трем катионным производным (Arg, Lys или His) пептидов, которые для САМП-КТА и САМП-ЛТА составили 9.4 и >77.8 мкМ соответственно. Таким образом, антибактериальная активность (АБА) САМП-КТА в целом более чем в 8 раз превосходит активность САМП-ЛТА:

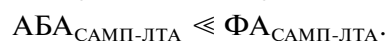
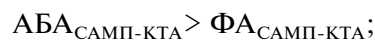


При сравнении антигрибковой активности двух рассматриваемых групп пептидов, напротив, САМП-ЛТА в целом проявила более высокую противогрибковую активность (СГ₂ = 7.0), чем САМП-КТА (СГ₂ = 15.0) (табл. 2). Другими словами, средняя антигрибковая или фунгицидная активность (ФА) для пептидов из группы САМП-

ЛТА в целом более чем в 2 раза превышает ФА для пептидов из группы САМП-КТА:



Противогрибковая активность САМП-ЛТА существенно выше не только по отношению к противогрибковой активности САМП-КТА, но и выше также по отношению к антибактериальной активности этой же группы пептидов внутри самой группы САМП-ЛТА. Так, например, в случае САМП-ЛТА общая средняя фунгицидная активность пептидов R9F2, K9F2 и H9F2 (СГ₂ = 7.0 мкМ) более чем в 10 раз превышает их общую среднюю антибактериальную активность (СГ₁ > 77.8 мкМ) (табл. 2). Напротив, в случае САМП-КТА общая противогрибковая активность пептидов R5F5, K5F5 и H5F5 (СГ₂ = 15.0 мкМ) была в ~2 раза ниже их общей антибактериальной активности (СГ₁ = 9.4 мкМ). Другими словами, пептиды из группы САМП-КТА более предпочтительно воздействуют на клетки бактерий, чем на клетки грибов, а пептиды из группы САМП-ЛТА, напротив, более эффективно воздействуют на клетки грибов, чем на клетки бактерий:



Говоря о повышенной антибактериальной избирательной активности САМП-КТА по сравне-

нию с САМП-ЛТА ($АБА_{САМП-КТА} > АБА_{САМП-ЛТА}$), можно предположить, что для проявления антибактериальной активности, вероятно, более характерен именно классический тип амфипатичности, образуемый α -спиральными пептидами. Катионные пептиды при контакте с микробными клетками проходят вначале через внешнюю мембрану и слой пептидогликана и далее взаимодействуют с отрицательно заряженными головками фосфолипидных групп цитоплазматической мембраны [17]. Согласно литературным данным, короткие α -спиральные АМР, как правило, не структурированы или слабо структурированы в растворе [8, 9, 17]. Отмечается, что при взаимодействии с отрицательно заряженной поверхностью мембран α -спиральная амфипатическая структурированность САМП-КТА способна усиливаться, и это способствует внедрению образовавшейся гидрофобной поверхности САМП-КТА во внутренний бислой фосфолипидной мембраны [17]. Вначале такие пептиды укладываются или плавают по поверхности мембраны в виде “бревен”, затем собираются в агрегаты типа “плотов” и образуют торроидальные поры в мембране, через которые может выливаться наружу внутреннее содержимое цитоплазмы [17]. В конечном счете такое действие пептидов может приводить к гибели клетки.

Пептиды с “линейным” типом амфипатичности структурированы таким образом, что образуют лишь гидрофильные и гидрофобные концы (рис. 1б), при этом исключается образование отдельных гидрофобных и гидрофильных α -спиральных поверхностей (рис. 1б и 2б). Вследствие этого в случае САМП-ЛТА, скорее всего, возможна реализация другого, более простого, “коврового”, способа воздействия на мембрану [17, 23]. Катионные пептиды при этом вначале устилают отрицательно заряженную поверхность в виде ковра с дальнейшим внедрением гидрофобных головок во внутренний бислой фосфолипидной мембраны и тем самым дестабилизируют цитоплазматическую мембрану в целом. Это приводит к разрушению мембраны и гибели клетки, но при больших концентрациях, чем в случае воздействия путем образования “торроидальных” пор с участием САМП-КТА.

Таким образом, “круговой” тип амфипатичности в случае воздействия на бактериальные клетки в исследованных нами случаях оказывается более эффективным по сравнению с “линейным” типом амфипатичности.

С другой стороны, в случае воздействия на клетки грибов “линейный” тип амфипатичности более эффективен и предпочтителен по сравнению с классическим типом амфипатичности. Вероятно, пептиды с “линейным” типом амфипатичности из-за своей меньшей структурированности в пространстве при взаимодействии с отрицательно заряженными компонентами клеточной стенки грибов и большей линейной одно-

родности гораздо легче проникают (проскальзывают) через более жестко сформированные и структурированные клеточные стенки грибов, чем через стенки бактерий. Таким образом, пространственная α -спиральная структурированность пептидов, усиленная взаимодействием с отрицательно заряженными компонентами клеточной стенки грибов, в случае САМП-КТА создает некоторые стерические препятствия или барьеры при прохождении через клеточные стенки грибов, тем самым снижая эффективность их воздействия по сравнению с эффективностью воздействия САМП-ЛТА.

Следует также обратить внимание на избирательное отношение САМП к грибковым клеткам по сравнению с бактериальными клетками в зависимости не только от типа амфипатичности (КТА или ЛТА), но и от их катионного состава пептидов. Так, например, среди всех исследованных катионных пептидов как в группе САМП-КТА, так и САМП-ЛТА наблюдается повышенная противогрибковая активность гистидин-содержащих пептидов **H5F5** и **H9F2** ($МПК_{50} = 7.7$ и 1.4 мкМ соответственно), которая в ~ 2 – 3 и 9 – 13 раз превышает противогрибковую активность, проявляемую соответствующими аргинин- (**R5F5** и **R9F2**) ($МПК_{50} = 17.0$ и 12.9 мкМ) и лизин-содержащими (**K5F5** и **K9F2**) ($МПК_{50} = 25.9$ и 18.9 мкМ) катионными производными (табл. 2). Такое избирательное действие пептидов **H5F5** и **H9F2**, содержащих остатки гистидина, по отношению к грибковым культурам по сравнению с аргинин- и лизин-содержащими катионными пептидами подтверждается литературными данными, в которых указывается на целый класс гистидин-содержащих природных АМП, так называемых гистатинов (Hst) – богатых гистидином (катионных) антимикробных белков [29]. Известно, что Hst содержатся в слюне [30] и проявляют избирательную активность как к условно-патогенным дрожжевым культурам, таким как *C. albicans* [30], так и к другим дрожжевым культурам [31].

Согласно литературным данным (см., например, обзор Puri et al. [29] и приведенные в нем ссылки), один из представителей гистатинов – Hst 5 – связывается с белками клеточной стенки *C. albicans* (Ssa1/2) и гликанами и поглощается клетками посредством переносчиков грибковых полиаминов. Попав внутрь грибковых клеток, Hst 5 может влиять на функции митохондрий и вызывать окислительный стресс, однако конечная причина гибели клеток – дисрегуляция объема и дисбаланс ионов, вызванный осмотическим стрессом. Но поскольку специфической активностью по отношению к *C. albicans* обладает не только Hst 5, но и остальные гистатины, содержащиеся в своем составе остатки гистидинов, вполне уместно предположить, что на поверхности дрожжевых клеток *C. albicans* имеются специфические рецепторы к гистидин-богатым пептидам. Другими словами, причина проникновения ги-

статинов, как можно предположить, — это не их катионные свойства (например, у гистидин-содержащих пептидов **H9F2** и **H5F5** один положительный заряд, образованный за счет открытой концевой аминокислотной группы, и слабый положительный заряд за счет остатков гистидина), а наличие рецепторов, специфических к гистидин-богатым пептидам. Проникновение в клетку в данном случае, скорее всего, должно идти не по электростатическому, а по рецептор-опосредованному механизму, хотя электростатическое взаимодействие также играет немаловажную роль в первоначальном связывании с отрицательно заряженной поверхностью клетки *C. albicans*.

В случае САМП-ЛТА **H9F2** избирательное противогрибковое воздействие многократно усиливается как за счет содержания в составе пептида гистидина, так и одновременно за счет его типа амфипатичности. Так, например, при сравнении действия САМП-ЛТА и САМП-КТА на *C. albicans* и на клетки бактерий, пептид **H9F2** из группы САМП-ЛТА проявил антигрибковую активность ($MPC_{50} = 1.4$ мкМ), превышающую его антибактериальную активность ($MPC_{50} > 100.0$ мкМ) более чем в 70 раз, тогда как аналогичный гистидин-содержащий пептид **H5F5** из группы САМП-КТА проявил антигрибковую активность ($MPC_{50} = 7.7$ мкМ), превышающую его антибактериальную активность ($MPC_{50} = 46.4$ мкМ) всего лишь в 6 раз. Другими словами, гистидин-содержащие пептиды проявляют высокую избирательную противогрибковую активность по сравнению с действием на клетки бактерий не только за счет содержания остатков гистидинов, обладающих определенным повышенным сродством к поверхности грибковых клеток, но и за счет своего типа амфипатичности.

Таким образом, в группе пептидов САМП-КТА, как и в случае ранее исследованных САМП-ЛТА, наибольшей антибактериальной активностью обладают пептиды, содержащие в качестве катионных составляющих аргининовые остатки, и наименьшей — пептиды с остатками гистидина. По отношению же к грибковым культурам, напротив, наибольшей противогрибковой активностью обладают пептиды, содержащие в качестве катионных составляющих гистидиновые остатки. В целом САМП-КТА при сравнении их с САМП-ЛТА проявляют большую антибактериальную активность и меньшую фунгицидную активность, при этом особо высокой антигрибковой активностью обладает гистидин-содержащий пептид **H9F2** из группы САМП-ЛТА, активность которого существенно выше аналогичной активности, проявляемой гистидин-содержащим пептидом **H5F5** из группы САМП-КТА.

Гемолитическая активность пептидов. Эксперименты, проведенные с лизисом эритроцитов, показали, что САМП-КТА **X5F5** обладают не только повышенной антибактериальной актив-

ностью, но также и существенно большей гемолитической активностью (рис. 3а), чем САМП-ЛТА (рис. 3б). Например, как ранее было показано [25], гемолитическая активность при действии САМП-ЛТА **R9F2**, **K9F2** и **H9F2** *in vitro* даже при достаточно высокой их концентрации в среде (1000 мкМ), содержащей эритроциты, составляла 3–4%, а при концентрации 500 мкМ лизису подвергалось всего лишь 2.4, 1.0 и 2.7% эритроцитов соответственно (рис. 3б), тогда как уровень гемолита для пептидов **R5F5**, **K5F5** и **H5F5** из группы САМП-КТА при той же их концентрации в среде 500 мкМ составил уже 37.9, 22.9 и 62.6% соответственно (рис. 3а), т.е. САМП-КТА по уровню их действия на эритроциты оказались в 15–20 раз более токсичными, чем САМП-ЛТА.

Такая высокая гемолитическая активность САМП-КТА **X5F5**, скорее всего, связана с их повышенной гидрофобностью, обусловленной содержанием в составе этих пептидов пяти гидрофобных остатков фенилаланина, тогда как в САМП-ЛТА **X9F2** содержится всего два таких гидрофобных остатка. Аналогичное влияние гидрофобности АМП на их гемолитическую активность было отмечено ранее во многих работах [8, 9, 32, 33]. Таким образом, в целом гемолитическая активность (ГА), проявляемая САМП-КТА, больше той же активности, проявляемой САМП-ЛТА:

$$GA_{\text{САМП-КТА}} > GA_{\text{САМП-ЛТА}}$$

Среди аргинин-, лизин- и гистидин-содержащих пептидов, как в группе САМП-КТА, так и в ранее исследованной группе САМП-ЛТА, наименьшей токсичностью по отношению к эритроцитам обладают лизин-содержащие пептиды **K5F5** и **K9F2**, а наибольшей — гистидин-содержащие пептиды **H5F5** и **H9F2** (рис. 3).

Таким образом, в зависимости от катионного состава аминокислот (Arg, Lys или His) относительную токсичность как САМП-КТА **X5F5**, так и САМП-ЛТА **X9F2** можно расположить в одном ряду по возрастанию их гемолитической активности:

$$H5F5 > R5F5 > K5F5;$$

$$H9F2 > R9F2 > K9F2.$$

Терапевтический индекс. Увеличение антимикробной активности АМП часто сопровождается увеличением их гемолитического действия, т.е. способности разрушать эритроциты [8, 9, 34, 35]. Другими словами, активный в отношении микроорганизмов препарат может оказаться в свою очередь также и довольно токсичным. В таком случае терапевтический потенциал антимикробных агентов оценивается на основе селективности их действия на исследуемые патогенные микроорганизмы по сравнению с аналогичным их действием на эритроциты, в виде терапевтического индекса (ТИ), т.е. как отношение величины минимальной гемолитической концентрации (МГК) к величине МПК, где МГК — концентра-

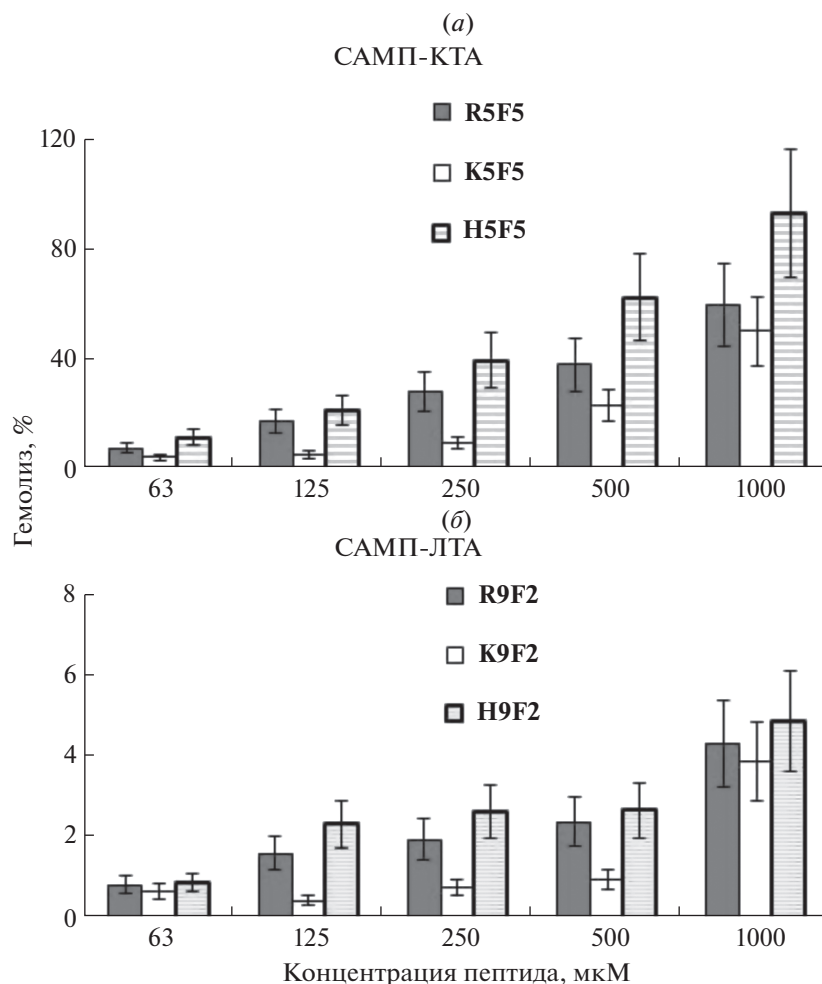


Рис. 3. Гемолитическая активность САМП-КТА (а) и САМП-ЛТА (б).

ция пептида, вызывающая лизис определенной доли свежих красных кровяных телец [24, 27].

Для оценки селективности действия пептидов нами были определены величины МГК пептидов и вычислены их значения ТИ (табл. 3). Для сравнения селективности каждого пептида по отношению ко всем бактериальным культурам в целом были подсчитаны также среднегеометрические (СГ) значения ТИ для каждого из пептидов по отношению ко всем исследованным бактериальным культурам, а также среднегеометрические значения ТИ по всем трем пептидам (X – Arg, Lys и His) для каждой культуры клеток отдельно.

В случае САМП-КТА **X5F5** наблюдается их высокая антибактериальная (СГ МПК₅₀ = 9.4 мкМ) (табл. 2) и одновременно высокая гемолитическая активность (СГ МГК = 35 мкМ) (табл. 3). Последний фактор существенно снижает среднюю селективность препаратов на основе САМП-КТА (СГ ТИ = 3.7) (табл. 3). Тем не менее, несмотря на свою повышенную токсичность,

некоторые САМП-КТА благодаря своей повышенной антибактериальной активности проявили относительно высокую селективность по отношению к отдельным бактериальным культурам. Например, высокая бактериальная селективность проявляется у аргинин- и лизин-содержащих пептидов **R5F5** и **K5F5** по отношению к бактериальным культурам *S. enterica* (ТИ = 15.7 и 18.8) и *P. aeruginosa* (ТИ = 17.4 и 23.1) – значения ТИ у этих пептидов выше значений ТИ аналогичных менее токсичных САМП-ЛТА **R9F2** и **K9F2** по отношению к тем же культурам клеток (ТИ = 13.4 и <10.0 для *S. enterica*; ТИ = 13.7 и 14.2 для *P. aeruginosa*) (табл. 3).

В случае САМП-ЛТА **X9F2**, напротив, наблюдается меньшая антибактериальная активность пептидов при их меньшей гемолитической активности. Первый из этих факторов уменьшает, а последний – увеличивает селективность этих препаратов. Например, СГ ТИ для САМП-КТА **R5F5** и **K5F5** составляет 10.0 и 10.9 соответственно, за исключением пептида **H5F5**, содержащего остаток гистидина (СГ ТИ = 0.5), а значение СГ ТИ

Таблица 3. Минимальная гемолитическая концентрация (МГК), терапевтический индекс (ТИ) и среднегеометрические (СГ) значения МГК и ТИ исследуемых пептидов

Пептиды	МГК ^а , мкМ	ТИ ^б					СГ ₁
		<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
САМП-КТА X5F5 (X – Arg, Lys или His)							
R5F5	33	1.9	5.3	7.0	15.7	17.4	10.0
K5F5	60	2.3	3.5	9.2	18.8	23.1	10.9
H5F5	21	2.7	0.4	0.3	0.7	0.6	0.5
СГ ₂	35	2.3	1.9	2.6	5.9	6.4	3.7 ^в
САМП-ЛТА X9F2 (X – Arg, Lys или His)							
R9F2	920	71.3	20.8	20.0	13.4	13.7	16.6
K9F2	1000	52.9	<10.0	13.5	<10.0	14.2	<11.8
H9F2	800	571.4	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0
СГ ₂	903	129.2	<11.9	<12.9	<10.2	<11.6	<11.6 ^в

^а МГК – минимальная гемолитическая концентрация – такая концентрация пептида (мкМ), которая вызывает лизис 4% свежих красных кровяных клеток. Средняя ошибка приведенных значений МГК, ТИ и СГ не превышает величины 15–20%.

^б ТИ – терапевтический индекс для каждой культуры микроорганизмов по отдельности, выраженный в виде отношения значения МГК к МПК₅₀. Большие значения ТИ указывают на большую селективность пептида.

^в Суммарное среднегеометрическое значение ТИ по всем бактериям и пептидам для соответствующей группы САМП-ЛТА и САМП-КТА.

СГ₁ – среднегеометрические значения ТИ по всем бактериям отдельно для каждого пептида (СГ по горизонтали, учитывая лишь бактериальные культуры).

СГ₂ – среднегеометрические значения МГК (мкМ) и ТИ по всем трем пептидам (X – Arg, Lys и His) для каждой культуры клеток отдельно (СГ по вертикали).

для САМП-ЛТА **R9F2** составляет 16.6 – величину не только сравнимую, но и даже превышающую аналогичное значение СГ ТИ для САМП-КТА **R5F5** (СГ ТИ = 10.0) (табл. 3). Другими словами, несмотря на свою сниженную антибактериальную активность, САМП-ЛТА **R9F2** обладает большим терапевтическим индексом, чем аналогичный аргинин-содержащий пептид **R5F5** из группы САМП-КТА, благодаря именно своей низкой гемолитической активности.

Таким образом, величины ТИ, представляемые в виде соотношения значений МГК к МПК в этих случаях, – это некий баланс, определяющий, в конечном счете, какой из этих двух факторов (антимикробная активность или токсичность) доминирует при оценке их реальной селективности или терапевтической значимости. Однако в целом сравнивать величины ТИ для САМП-ЛТА и САМП-КТА затруднительно из-за низкой, а порой и неопределенной в условиях эксперимента антибактериальной активности некоторых САМП-ЛТА, таких как **K9F2** и **H9F2**, среднегеометрические значения МПК₅₀ для которых составили >72.2 и >100 мкМ (табл. 2).

В случае фунгицидной активности особо следует отметить селективность гистидин-содержащего пептида **H9F2** из группы САМП-ЛТА по отношению к условно-патогенному грибу *C. albicans*. В данном случае высокая фунгицидная активность этого пептида одновременно сопро-

вождается низкой токсичностью, что приводит к его достаточно высокой селективности (ТИ = 571.4), более чем в 200 раз превышающей аналогичную селективность гистидин-содержащего пептида **H5F5** из группы САМП-КТА (ТИ = 2.7). По сравнению с пептидом **H9F2**, для пептида **H5F5** сниженная фунгицидная активность одновременно сопровождается его высокой гемолитической активностью, что дополнительно вносит вклад в снижение значения его фунгицидной селективности.

Таким образом, САМП с “круговым” типом амфипатичности характеризуются одновременно повышенной антимикробной и гемолитической активностью. Увеличение гемолитической активности такого типа пептидов, вероятно, связано с увеличением их гидрофобности. Однако у САМП с “круговым” типом амфипатичности сохраняется высокая бактериальная селективность, связанная с их увеличенной антибактериальной активностью. У пептидов же с “линейным” типом амфипатичности также сохраняется высокая бактериальная селективность, связанная в данном случае с их низкой гемолитической активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали реактивы для пептидного синтеза (Sigma, Fisher Scientific,

Bachem, Protein Technologies, США); полистирольный полимер 855013 Novabiochem® NovaSyn®TG Sieber resin, функционализированный 9-Fmoc-аминоксантен-3-илоксильным фрагментом, 200 ммоль/г (Merck Schuchardt OHG, Германия); защищенные аминокислотные мономеры (Protein Technologies, США); конденсирующий реагент HATU – 2-(1*H*-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуронийгексафторфосфат (кат. № 023926, Oakwood Products Inc., США).

Синтез пептидов. Пептиды были синтезированы твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии [26] аналогично опубликованной ранее схеме [25] на пептидном синтезаторе PS3 (Protein Technologies, США). Содержание основного вещества в синтезированных пептидах по данным оФВЭЖХ составляло не менее 95%.

Штаммы микроорганизмов. Штаммы патогенных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 14028 и условно-патогенного гриба *Candida albicans* ЭМТК 34 поддерживали и нарабатывали в Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Аналитическую оФВЭЖХ проводили на хроматографе LC-20 AD (Shimadzu, Япония) с использованием детектора SPD-M20A (Shimadzu, Япония) на колонке Gemini 5 μm NX-C18, 110 Å, 4.6 \times 250 мм (Phenomenex Inc., США), уравновешенной 0.1%-ным раствором TFA, в линейном градиенте концентрации ацетонитрила 0–50% или 0–80% в течение 30 мин при скорости потока 1 мл/мин, УФ-детекция при длине волны 210, 220, 240 и 260 нм.

Молекулярные массы пептидов (табл. 1) определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF (REFLEX III, Bruker Daltonics, Германия) и ESI-MS (LC/MS XCT Ultra, Agilent Technologies, США) в Центре масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Антимикробная активность пептидов. Растворы пептидов определенной концентрации для оценки антимикробной активности готовили из сухих навесок. Для пептидов **R9F2**, **K9F2** и **H9F2**, а также пептидов **R5F5**, **K5F5** и **H5F5**, которые содержали по два или пять остатков фенилаланина соответственно, дополнительно проводили определение концентрации путем измерения поглощения в ближней УФ-области спектра с использованием значений молярных коэффициентов поглощения при длине волны 260 нм, равных 330 и 820 л моль⁻¹ см⁻¹, молярные коэффициенты которых ранее были определены, исходя из соответствующих растворов пептидов, приготовленных из сухих навесок. Исходные растворы пептидов с концентрацией 1–2 мМ хранили при –15°C в темноте не более месяца. Непосредственно пе-

ред экспериментом растворы разбавляли до нужной концентрации средой Мюллера–Хинтона. Исходная концентрация пептидов для приготовления проб для дальнейшего испытания их гемолитической активности составляла 10 мМ в воде.

Для работы использовали взвесь ночных бульонных культур, выращенных на стандартных питательных средах. Количество микроорганизмов (титр) во взвеси определяли по оптической плотности при длине волны 595 нм.

Для оценки антибактериального действия пептидов проводили совместное инкубирование клеточных культур с исследуемыми пептидными препаратами в 96-луночных планшетах для культивирования. Ночные бульонные культуры ресуспендировали в среде Мюллера–Хинтона (для *C. albicans* – в среде Сабуро), доводя количество микроорганизмов до посевной дозы ~5 \times 10⁵ КОЕ/мл. В лунки последовательно вносили раствор исследуемых пептидных препаратов, а затем клеточную суспензию в соотношении 1 : 9 по объему (общий объем 200 мкл) в конечных концентрациях 0.3–100 мкМ. В качестве отрицательного контроля вместо тестируемого пептида вносили аналогичный объем среды Мюллера–Хинтона (для *C. albicans* – среды Сабуро). В качестве положительного контроля вместо тестируемого пептида вносили аналогичный объем водных растворов AgNO₃ или хлоргексидина (ХГ) в соответствующих разведениях, так же как и для пептидов, в конечных концентрациях 0.3–100 мкМ. Инкубацию проводили в течение 24 ч при 37°C и 560 об/мин на шейкер-инкубаторе (Kuhner LT-X, АБТЕК, Россия). В нулевой точке и через 2, 4, 5, 6, 7, 8 и 24 ч после начала инкубации измеряли оптическую плотность суспензии на планшетном спектрофотометре iMark™ (Bio-Rad, США) при длине волны 595 нм. Результаты выражали в виде среднего значения оптической плотности клеточной суспензии в трех независимых экспериментах, выполненным в двух повторах. Среднестатистическая ошибка (или стандартное отклонение значений экспериментальных данных) при этом не превышала 15–30%. Стандартное отклонение (S) рассчитывали по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2},$$

где n – число измерений, x_i – i -тый элемент выборки, x_m – среднее арифметическое значение выборки.

Расчет МПК₅₀. Исходя из полученных средних значений оптической плотности суспензий клеточных культур, определяли величины относительной степени роста культуры микробных клеток (N_p/N_0) в виде отношения оптической плотности микробных частиц после добавления пептидного препарата (N_p) к оптической плотности в контрольной культуре (N_0). Концентрацию

пептида, при которой величина относительной степени роста культуры микробных клеток составляла 50%, определяли по кривым зависимости величины относительной степени роста культуры микробных клеток (N_p/N_0) в процентах от концентрации пептидов [25].

Фотометрический метод оценки гемолитической активности антимикробных пептидов в отношении эритроцитов человека. Гемолитическую активность исследуемых пептидов тестировали в отношении свежих эритроцитов человека согласно ранее опубликованным методикам [25, 27, 36]. Образец крови для получения эритроцитов был предоставлен ООО “Лаборатория Гемотест” (Новосибирск, Россия).

Метод основан на измерении оптической плотности при длине волны 540 нм в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования суспензии эритроцитов, поскольку при разрушении эритроцитов вышедший из клеток гемоглобин придает среде характерную красную окраску, сохраняющуюся после осаждения эритроцитов. Свежие эритроциты человека трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS: 10 mM Na_2HPO_4 , 1.76 mM K_2HPO_4 , pH 7.4), содержащим 173 mM NaCl и 2.7 mM KCl. К 50 мкл суспензии эритроцитов в PBS добавляли растворы пептидов в виде двукратных серийных разведений до конечного объема 100 мкл и концентрации суспензии эритроцитов 4% (по объему, за 100% принимали объем суспензии осажденных центрифугированием эритроцитов), инкубировали в течение 30 мин при 37°C. После центрифугирования и отделения осадка измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 540 нм. За 100% гемолиза принимали оптическую плотность раствора, полученную при действии на эритроциты 10%-ного раствора тритона X-100. За 0% принимали оптическую плотность, полученную при действии на эритроциты “холодного” буферного раствора, не содержащего пептидных проб. Гемолитический анализ проводили дважды с использованием одного образца крови человека. Данные представлены как среднее значение \pm стандартные отклонения трех независимых экспериментов. Средняя ошибка эксперимента при этом не превышала 15–20%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе синтезированы три новых антимикробных пептида XFXFFXFF (**X5F5**) (X – Arg, Lys или His), обладающих “круговым” типом амфипатичности (САМП-КТА), изучены антимикробные и гемолитические свойства синтезированных пептидов в зависимости от их катионного аминокислотного состава (аргинина, лизина или гистидина) в сравнении с тремя антимикробными пептидами XXXXXXXXFF (**X9F2**) с “линейным” типом амфипатичности (САМП-ЛТА).

Показано, что все исследуемые САМП-КТА обладают ярко выраженной антибактериальной активностью (в отношении *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*) и меньшей фунгицидной активностью (в отношении *C. albicans*). Напротив, антибактериальная активность САМП-ЛТА существенно ниже их фунгицидной активности. По отношению к бактериальным клеткам наибольшая антибактериальная активность выявлена у пептидов, содержащих в качестве катионных составляющих остатки аргинина (**R5F5**, **R9F2**), а наименьшая – у пептидов с остатками гистидина (**H5F5**, **H9F2**).

По отношению к грибковым культурам, напротив, наибольшей фунгицидной активностью обладают пептиды, содержащие в качестве катионных составляющих гистидиновые остатки (**H5F5**, **H9F2**).

В экспериментах с лизисом эритроцитов человека показано, что гемолитическая активность САМП-КТА превышает активность САМП-ЛТА. Наименьшей токсичностью к эритроцитам обладают лизин-содержащие пептиды (**K5F5**, **K9F2**), а наибольшей – гистидин-содержащие пептиды (**H5F5**, **H9F2**).

Несмотря на относительно высокую гемолитическую активность, средняя бактериальная селективность исследованных пептидов **X5F5** остается достаточно высокой (СГ ТИ ≈ 10), за исключением пептида **H5F5**, содержащего остатки гистидина (СГ ТИ = 0.5). В то же время селективность гистидин-содержащего пептида **H5F5** по отношению к клеткам грибов (ТИ = 2.7) в 5 раз выше его селективности по отношению к бактериальным клеткам, но в 200 раз ниже фунгицидной селективности гистидин-содержащего пептида **H9F2** (ТИ = 571.4), обладающего “линейным” типом амфипатичности.

Таким образом, учитывая высокую антибактериальную активность САМП-КТА и несмотря на их повышенную гемолитическую активность, можно рекомендовать их аргинин и лизин-содержащие производные (**R5F5**, **K5F5**) в качестве перспективных антимикробных препаратов, поскольку в этом случае для получения одинакового терапевтически значимого эффекта требуется меньшая концентрация, а следовательно, и меньшее количество пептидного препарата по сравнению с аналогичными препаратами из группы САМП-ЛТА. Для создания противогрибковых препаратов наиболее перспективны пептиды из группы САМП-ЛТА, содержащие в качестве катионных групп аминокислотные остатки гистидина (**H9F2**).

БЛАГОДАРНОСТИ

Штаммы микроорганизмов получены из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых

культур Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование поддержано в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН № 121031300042-1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Peschel A., Sahl H.G.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. P. 529–536. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1441>
2. *Bahar A.A., Ren D.* // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013. V. 6. P. 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
3. *Chung P.Y., Khanum R.J.* // *Microbiol. Immunol. Infect.* 2017. V. 50. P. 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
4. *Kim H., Jang J.H., Kim S.C., Cho J.H.* // *J. Antimicrob. Chemother.* 2014. V. 69. P. 121–132. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt322>
5. *Баландин С.В., Овчинникова Т.В.* // *Биоорг. химия*. 2016. Т. 42. С. 255–275. [*Balandin S.V., Ovchinnikova T.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2016. V. 42. P. 229–248.] <https://doi.org/10.1134/S1068162016030055>
6. *Mookherjee N., Hancock R.E.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 2007. V. 64. P. 922–933. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6475-6>
7. *Navon-Venezia S., Feder R., Gaidukov L., Carmeli Y., Mor A.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. P. 689–694. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.689-694.2002>
8. *Liu X., Cao R., Wang S., Jia J., Fei H.* // *J. Med. Chem.* 2016. V. 59. P. 5238–5247. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b02016>
9. *Hollmann A., Martínez M., Noguera M.E., Augusto M.T., Disalvo A., Santos N.C., Semorile L., Maffia P.C.* // *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2016. V. 141. P. 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.003>
10. *Clark S., Jowitt T.A., Harris L.K., Knight C.G., Dobson C.B.* // *Commun. Biol.* 2021. V. 4. P. 605. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02137-7>
11. *Азимова В.Т., Потатуркина-Нестерова Н.И., Нестеров А.С.* // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 1. С. 1336. [*Azimova V.T., Potaturkina-Nesterova N.I., Nesterov A.S.* // *Modern Problems of Science and Education*. 2015. № 1. P. 1336.] <https://science-education.ru/en/article/view?id=17746>
12. *Jiang Z., Vasil A.I., Hale J.D., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S.* // *Biopolymers*. 2008. V. 90. P. 369–383. <https://doi.org/10.1002/bip.20911>
13. *Huang Y.B., Huang J.F., Chen Y.X.* // *Protein Cell*. 2010. V. 1. P. 143–152. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0004-3>
14. *Vlieghe P., Lisowski V., Martinez J., Khrestchatskiy M.* // *Drug Discov. Today*. 2010. V. 15. P. 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.10.009>
15. *Смирнова М.П., Афонин В.Г., Шпень В.М., Тяготин Ю.В., Колодкин Н.И.* // *Биоорг. химия*. 2004. Т. 30. С. 458–465. [*Smirnova M.P., Afonin V.G., Shpen' V.M., Tyagotin Yu.V., Kolodkin N.I.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2004. V. 30. P. 409–416.] <https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000043782.21640.c2>
16. *Giangeroso A., Sandri L., Tossi A.* // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. P. 5589–5600. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.02494.x>
17. *Tossi A., Sandri L., Giangeroso A.* // *Biopolymers*. 2000. V. 55. P. 4–30. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M)
18. *Dinh T.T.T., Kim D.-H., Lee B.-J., Kim Y.-W.* // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2014. V. 35. P. 3632–3636. <https://doi.org/10.5012/BKCS.2014.35.12.3632>
19. *Tew G.N., Liu D., Chen B., Doerksen R.J., Kaplan J., Carroll P.J., Klein M.L., de Grado W.F.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 5110–5114. <https://doi.org/10.1073/pnas.082046199>
20. *Javadpour M.M., Juban M.M., Lo W.C., Bishop S.M., Alberty J.B., Cowell S.M., Becker C.L., McLaughlin M.L.* // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 3107–3113. <https://doi.org/10.1021/jm9509410>
21. *Chen Y., Mant C.T., Farmer S.W., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S.* // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 12316–12329. <https://doi.org/10.1074/jbc.m413406200>
22. *Schiffer M., Edmundson A.B.* // *Biophys. J.* 1967. V. 7. P. 121–135. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(67\)86579-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(67)86579-2)
23. *Амирханов Н.В., Тикунова Н.В., Пышный Д.В.* // *Биоорг. химия*. 2018. Т. 44. С. 492–505. [*Amirkhanov N.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 492–503.] <https://doi.org/10.1134/S1068162018050035>
24. *Amirkhanov N.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 833–841. <https://doi.org/10.1134/S1068162019060037>
25. *Амирханов Н.В., Бардашева А.В., Тикунова Н.В., Пышный Д.В.* // *Биоорг. химия*. 2021. Т. 47. С. 315–326. [*Amirkhanov N.V., Bardasheva A.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 681–690.] <https://doi.org/10.1134/S106816202103002X>
26. *Chan W.C., White P.D.* // *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach* / Eds. Chan W.C., White P.D. Oxford: IRL Press, 2000. P. 64–66.
27. *Panteleev P.V., Bolosov I.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V.* // *J. Pept. Sci.* 2015. V. 21. P. 105–113. <https://doi.org/10.1002/psc.2732>

28. Jiang Z., Vasil A.I., Gera L., Vasil M.L., Hodges R.S. // Chem. Biol. Drug Des. 2011. V. 77. P. 225–240. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01086.x>
29. Puri S., Edgerton M. // Eukaryot. Cell. 2014. V. 13. P. 958–964. <https://doi.org/10.1128/ec.00095-14>
30. Khurshid Z., Najeeb S., Mali M., Moin S.F., Raza S.Q., Zohaib S., Sefat F., Zafar M.S. // Saudi Pharm. J. 2017. V. 25. P. 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.027>
31. Tsai H., Bobek L.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1336. P. 367–369. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(97\)00076-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(97)00076-7)
32. Wiradharma N., Sng M.Y., Khan M., Ong Z.Y., Yang Y.Y. // Macromol. Rapid Commun. 2013. V. 34. P. 74–80. <https://doi.org/10.1002/marc.201200534>
33. Wieprecht T., Dathe M., Epand R.M., Beyermann M., Krause E., Maloy W.L., MacDonald D.L., Bienert M. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 12869–12880. <https://doi.org/10.1021/bi971398n>
34. Dathe M., Wieprecht T., Nikolenko H., Handel L., Maloy W.L., MacDonald D.L., Beyermann M., Bienert M. // FEBS Lett. 1997. V. 403. P. 208–212. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00055-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00055-0)
35. Окороченков С.А., Желтухина Г.А., Небольсин В.Е. // Биомед. химия. 2012. Т. 58. С. 131–143. [Okorochenkova S.A., Zheltukhina G.A., Nebol'sin V.E. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. 2011. V. 5. P. 95–102.] <https://doi.org/10.1134/S1990750811020120>
36. Jacobsen F., Mohammadi-Tabrasi A., Hirsch T., Mittler D., Mygind P.H., Sonksen C.P., Raventos D., Kristensen H.H., Gatermann S., Lehnhardt M., Daigeler A., Steinau H.U., Steinstraesser L. // J. Antimicrob. Chemother. 2007. V. 59. P. 493–498. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl513>

Synthetic Antimicrobial Peptides. IV. The Effect of Cationic Groups of Lysine, Arginine and Histidine on the Antimicrobial Activity of Peptides with a “Circular” Type of Amphipathicity

N. V. Amirkhanov*, #, A. V. Bardasheva*, N. V. Tikunova*, and D. V. Pyshnyi*

Phone: +7 (383) 363-51-35; e-mail: nariman@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

The antimicrobial and hemolytic activity of synthetic antimicrobial peptides (SAMP) XFFXFFXFF (X5F5) with a “circular” (helical or cyclic) type of amphipathicity (CTA) containing cationic amino acid residues of arginine, lysine, or histidine (X = Arg, Lys, or His) was studied. It was shown that, in general, such peptides, when compared with SAMP XXXXXXXXXXFF (X9F2), which have a “linear” type of amphipathicity (LTA), exhibit more than 8 times greater antibacterial and approximately 2 times less antifungal activity. It was found that peptides containing arginine residues as cationic components have the highest antibacterial activity, and peptides with histidine residues have the lowest antibacterial activity. In relation to fungal cultures of *Candida albicans*, on the contrary, peptides containing histidine residues as cationic components have the highest fungicidal activity. It was shown that the studied X5F5 peptides, regardless of their cationic composition, have increased hemolytic activity (20–60% hemolysis at 500 μM peptide concentration in the medium) compared to peptides X9F2 with a “linear” type of amphipathicity (no more than 4% hemolysis at the same peptide concentrations). Despite their relatively high hemolytic activity, the average bacterial selectivity of the studied X5F5 peptides remains quite high, the average geometric therapeutic index (AG TI) for which is about 10, except for the H5F5 peptide containing histidine residues (AG TI = 0.5). At the same time, the selectivity of the histidine-containing peptide H5F5 with respect to fungal cells (TI = 2.7) is 5 times higher than its selectivity with respect to bacterial cells, but 200 times lower than the fungicidal selectivity of the histidine-containing peptide H9F2 (TI = 571.4), which has a linear amphipathic type. Taking into account the increased antibacterial activity of drugs based on SAMP X5F5 with a “circular” type of amphipathicity, it is recommended to use peptides containing arginine (R5F5) and lysine amino acid residues (K5F5) as cationic groups to create antibacterial drugs, and to create antifungal agents based on SAMP X9F2 with a “linear” type of amphipathicity, containing histidine amino acid residues as cationic groups (H9F2).

Keywords: synthetic antimicrobial peptides, amphiphilicity, “linear” amphipathicity type, “circular” amphipathicity type, hemolytic activity, selectivity, antimicrobial activity, fungicidal activity, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*