

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



ГАВРЮШИНА ИРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ АНТИМИКРОБНЫХ
ПЕПТИДОВ - ЭМЕРИЦИЛЛИПСИНОВ И РАЗРАБОТКА
БИОТЕХНОЛОГИИ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

- Научный руководитель:** – **Садыкова Вера Сергеевна**
доктор биологических наук, доцент
- Официальные оппоненты:** – **Манучарова Наталия Александровна**
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
факультет почвоведения, кафедра биологии почв, профессор
- **Ревин Виктор Васильевич**
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва», декан факультета биотехнологии и биологии, заведующий кафедрой биотехнологии, биоинженерии и биохимии
- **Александрова Алина Витальевна**
доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра микологии и альгологии, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится 14 февраля 2023 г. в 17:00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, факультет почвоведения, аудитория М-2. Тел: 8(495)-939-35-46.

E-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/517532579/>

Автореферат разослан 12 января 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Костина Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Ухудшение экологической обстановки, эпидемия ВИЧ, COVID-19, широкое использование трансплантационной терапии и, в целом, увеличение числа хирургических вмешательств приводит к значительному росту заболеваемости грибковыми инфекциями и, в частности, глубокими (инвазивными) микозами, с трудом поддающимися лечению существующими лекарственными препаратами [Bongomin et al., 2017; Shadrivova et al., 2021; GAFFI in the news Annual Report 2021]. У здоровых людей эти заболевания встречаются довольно редко, однако в последние годы резко возросла заболеваемость поверхностными и инвазивными микозами людей, относящихся к «группе риска» с нарушениями в иммунной системе, нарушениями физических барьеров клетки или измененным микробиомом. Микозы кожи преимущественно вызывают рода *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton*, наиболее распространенными инвазивными патогенами являются виды родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Pneumocystis*, вызывающих мукормикозы виды родов *Mucor* и *Rhizopus* [Pianalto et al., 2016]. Появляются новые виды клинически значимых патогенных грибов, как, например, недавно описанный вид *Candida auris* [Jeffery-Smith et al., 2018], а ранее известные как типично сапротрофные виды и роды грибов приобретают патогенность. Кроме того, в настоящее время растет число клинических изолятов грибов, устойчивых ко всем используемым противогрибковым препаратам [Geddes-McAlister et al., 2019; Revie et al., 2018; Patil et al., 2017].

Лекарственных препаратов антимикотиков на рынке крайне мало, и они имеют существенные недостатки, такие как токсичность, низкий терапевтический индекс, аллергические реакции. При этом последний класс противогрибковых препаратов эхинокандинов, который используется в клинике с 2000 гг., был открыт более пятидесяти лет назад, и с тех пор на рынке фармацевтических компаний не появлялось ни одного нового природного антибиотика с противогрибковым действием [Aldholmi et al., 2019]. Это свидетельствует о том, что существует острая необходимость в разработке новых препаратов [Li et al., 2021].

В последние годы антимикробные пептиды (АМП) привлекают внимание в качестве терапевтических агентов, так как имеют следующие преимущества: высокую селективность, низкую иммуногенность, хорошую возможность проникновения в клетку-мишень и меньший риск развития резистентности за счет быстрого действия на клеточную стенку или мембрану. За последние два десятилетия общее число пептидов, одобренных на основных фармацевтических рынках, увеличилось в два раза [Lau et al., 2018]. Природные биоактивные пептиды используют как для разработки лекарственных препаратов, так и в качестве модели для создания синтетических структурных аналогов на их основе. К основным недостаткам, препятствующим их применению, можно отнести их потенциальную цитотоксичность. [Casagrande et al., 2021]. Некоторые природные и полученные синтетическим путем АМП уже были изучены в клинических испытаниях с целью разработки лекарственных препаратов для лечения грибковых инфекций кожи [Hospenthal et al., 2013; Clancy et al., 2013; Edwards et al., 2010].

Одним из актуальных направлений поиска продуцентов АМП в мире является разработка новых методов их выделения из редких и некультивируемых ранее микроорганизмов разных экстремальных экониш – морской среды, растений,

пещер, ледников и т.д. Из малоизученных местообитаний могут быть выделены новые штаммы, образующие новые антибиотические соединения. Представители микромицетов рода *Emericellopsis* активно изучаются как продуценты антибиотиков уже более полувека. Род *Emericellopsis* включает в себя 20 видов (<http://www.indexfungorum>, <https://www.mycobank.org>), которые в соответствии с различной филогенией и экологией разделяются на две отдельные группы – морские и наземные клады [Zuccaro et al., 2004]. Эти грибы распространены во многих экстремальных экотопах и являются продуцентами уже известных АМП [Grum-Grzhimaylo et al., 2013; Gonçalves et al., 2020]. Зервамицины А-Е, рекомендованные к доклиническим исследованиям, синтезируются несколькими видами этого рода [Balashova et al., 2000]. У вида *Emericellopsis microspora* выделены и описаны эмеримицины II, III, IV [Георгиева и др., 2009]. А. Берг с соавт. [Berg et al., 1999] установил наличие у штамма *Emericellopsis donezkii* НК1005 синтеза бергофунгинов А и В, для которых в 2017 г. определена структура методом рентгенструктурного анализа [Gessmann et al., 2017]. Их гомологи, бергофунгины С и D, были обнаружены и у вида *E. salmosynnemata* [Shenkarev et al., 2007; Berg et al., 1999]. Штамм *Emericellopsis* sp. ВАUA8289 [Ishiyama et al., 2000] продуцирует гептаибин, а *Emericellopsis minima* – сесквитерпены и гельволевую кислоту [Carreira Cátia et al., 2015]. Кроме того, для представителей этого рода известно о синтезе β-лактамных антибиотиков – цефалоспоринов Р, N, С, ответственных за лизис цианобактерий [Георгиева и др., 2009; Carreira Cátia et al., 2015].

Алкалофильный вид *Emericellopsis alkalina* был выделен из содовых озер Кулундинской степи (Россия) в 2013 г [Grum-Grzhimaylo et al, 2013]. Проведенный в 2015–2017 гг. первичный скрининг 10 изолятов этого вида выявил у них наличие противогрибковой активности в отношении возбудителей условно-патогенных микроскопических грибов [Baranova et al., 2017]. В 2018 г из экстракта культуральной жидкости штамма *E. alkalina* ВКПМ 1428 выделен и описан новый пептаибол эмерициллипсин А (EmiA), обладающий противогрибковой активностью в отношении возбудителей инвазивных аспергиллезов и кандидозов, в том числе с резистентностью к флуконазолу. [Rogozhin et al., 2018; Baranova et al., 2017]. Однако масштабного скрининга способности к образованию и накоплению противогрибковых соединений, в частности эмерициллипсинов в разных биотехнологических системах на большой выборке культур у грибов рода *Emericellopsis* ранее не проводилось.

Цель работы: исследование биологической активности, особенностей накопления новых антимикробных пептидов – эмерициллипсинов, выделенных из алкалофильных грибов рода *Emericellopsis*, и разработка технологии их получения.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие **задачи исследования:**

1. провести исследование на наличие потенциальных продуцентов эмерициллипсинов среди коллекции штаммов (38 культур) алкалофильных грибов вида *Emericellopsis alkalina* и близкородственных видов *Emericellopsis* cf. *maritima* и *Emericellopsis* cf. *terricola*, изолированных из почв прибрежной зоны различных засоленных озер, изучить особенности накопления пептидов и структуру;
2. провести сравнительную оценку антифунгальной активности EmiA-Е в отношении условно-патогенных коллекционных и клинических изолятов

- мицелиальных грибов с множественной резистентностью с целью отбора наиболее активного соединения;
3. провести оценку фунгицидной активности для основного компонента – EmiA на расширенной панели клинических изолятах патогенных дрожжевых грибов;
 4. провести оценку цитотоксической и гемолитической активности для EmiA;
 5. отработать условия культивирования EmiA в разных биотехнологических системах, обеспечивающих максимальный выход антибиотика. Разработать лабораторный регламент его получения.

Объектами исследования являлись штаммы алкалофильных грибов вида *E. alkalina* и близкородственных видов, выделенные из щелочных засоленных почв различных географических регионов. Культуры получены из коллекции «Грибы экстремальных местообитаний» кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (Россия).

Предмет исследования – биологически-активные вещества (антимикробные пептиды), оценка их цитотоксической, гемолитической активности, а также оценка антимикробной активности и технологической рентабельности культур грибов для разработки регламента получения EmiA.

Научная новизна.

Впервые охарактеризованы четыре новых антимикробных пептида – эмерициллипсины (EmiB-E), установлена структура их аминокислотных последовательностей, все они принадлежат к группе пептаиболов и являются структурными гомологами основного компонента – EmiA.

Для 32 изолятов алкалофильных грибов *Emericellopsis alkalina* из содовых почв показана способность к образованию эмерициллипсина А (EmiA), он детектирован в экстрактах из культуральной жидкости и мицелия, а для 15 изолятов этого вида также установлена способность к образованию его гомологов EmiB-E.

Кроме структурных гомологов для трех изолятов выделена и охарактеризована новая активная дегидратированная форма EmiA (dEmiA), не содержащая гидроксильную группу в составе молекулы. Способность к синтезу dEmiA установлена для двух близкородственных видов рода *Emericellopsis*.

Впервые проведены оценка антифунгальной активности на большой выборке тест культур условно-патогенных коллекционных мицелиальных и дрожжевых грибов, а также в отношении клинических изолятов мицелиальных и дрожжевых грибов – возбудителей системных и диссеминированных микозов, резистентных к применяемым в терапевтической практике препаратам *in vitro* для всех индивидуальных пептаиболов.

Для EmiA показана цитотоксическая активность на опухолевую линию колоректальной карциномы (HCT116), за счет способности влиять на клеточный цикл и индуцировать апоптоз.

При исследовании эффекта на эритроциты человека показано низкое гемолитическое действие пептида, в концентрации 20 мкМ лизису подвергалось не более 12 % клеток, что свидетельствует о перспективности данного соединения для дальнейшего изучения как нового природного антибиотика с противогрибковым действием для лечения глубоких и инвазивных микозов.

Теоретическая и практическая значимость.

Отобранные штаммы грибов дополнили коллекцию культур микроорганизмов – продуцентов антибиотиков Научно-исследовательского

института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе и используются в научно-исследовательских и учебных целях.

Активность основного компонента EmiA исследована на расширенной панели клинических изолятов родов *Candida* и *Cryptococcus* с множественной лекарственной устойчивостью к флуконазолу, интраконазолу и низкой чувствительностью к каспофунгину. Показано что, антимикотик оказывает противогрибковое действие на патогенные и клинические изоляты рода *Aspergillus*, на клинические дрожжевые изоляты р. *Candida* и *Cryptococcus neoformans*. Среди клинически одобренных антибиотиков только амфотерицин В демонстрирует сравнимый профиль активности в отношении лекарственно-устойчивых *Cr. neoformans* и *Cr. laurentii*, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов с криптококковым менингитом.

Разработан лабораторный регламент получения нового противогрибкового пептида EmiA из алкалофильного гриба штамма *E. alkalina* E101 в условиях стационарного мембранно-жидкостного культивирования на (2D-) матрицах нанокристаллической бактериальной целлюлозы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Способность к образованию эмерициллипсинов не является штаммоспецифичным признаком, характеризуется сходным профилем синтезируемых пептидов у разных штаммов *Emericellopsis alkalina* и близкородственных видов, выделенных из засоленных содовых почв. Накопление антимикробных пептидов происходит преимущественно в щелочных условиях.
2. Сформирована коллекция штаммов грибов алкалофильного рода *Emericellopsis* – продуцентов новых антимикробных пептидов эмерициллипсинов. Установлена структура для четырех новых EmiB-E, последовательности аминокислот в полипептидной цепи представляют собой гомологичные основному компоненту структуры с единичной заменой одной из аминокислот.
3. Доминирующий компонент – пептид EmiA обладает противогрибковым действием в отношении клинических изолятов патогенных грибов с множественной лекарственной устойчивостью. Ингибирующая активность EmiA против азолустойчивых патогенных изолятов *Aspergillus* spp., *Candida* spp. и *Cryptococcus* spp. проявляется на уровне антифунгального препарата амфотерицина В. Кроме того, EmiA ингибирует формирование биопленок грамположительных патогенных бактерий из группы ESKAPE.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.6 Биотехнология, а именно пункту 1. Генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии, пункту 4. Направленный биосинтез, получение биологически активных соединений, метаболитов, изучение их состава и разработка методов анализа, технико-экономических критериев оценки.

Личный вклад автора. Разработка и постановка экспериментальных научных исследований, изложенных в диссертационной работе, а также анализ полученных результатов исследовательской работы, были выполнены автором самостоятельно под руководством д.б.н. Садыковой Веры Сергеевны.

Автор, Гаврюшина Ирина Александровна, провела анализ актуальной литературы, по теме работы. Осуществила оценку способности различных штаммов вида *E. alkalina*, а также близкородственных видов, изолированных из

различных экотопов, на способность образования комплекса эмерициллипсинов. Отработала условия культивирования в разных биотехнологических системах, обеспечивающих максимальный выход антибиотиков. Выделение и определение структуры индивидуальных пептидов EmiA-E проводила в сотрудничестве с институтом биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова и Научно-исследовательским институтом физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Провела оценку антимикробной активности EmiA-E в отношении условно-патогенных и патогенных клинических изолятов микроорганизмов с множественной резистентностью в сотрудничестве с ГБУЗ Московским городским научно-практическим центром борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения г. Москвы. Разработала лабораторный регламент получения EmiA в условиях стационарного мембранно-жидкостного культивирования на носителе (бактериальной целлюлозе). Обработала и проанализировала результаты экспериментов.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обоснована использованием современных методов исследований и оборудования, а также статистической обработкой данных.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на всероссийских и международных конференциях: Международный конгресс «Биотехнологии: состояния и перспективы развития» (Москва, 2019 г.), научная конференция с международным участием «Вакцинология как ответ биологическим угрозам» посвященная 100-летию основания НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва, 2019 г.), Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2021» (Москва, 2021 г., диплом 2 степени за устный доклад), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 90-летию со дня основания медицинского вуза в Крыму «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (Симферополь, 2021 г., диплом 3 степени за устный доклад), The 1st International Electronic Conference on Antibiotics (Швейцария, 2021), 2-ая Всероссийская научная конференция с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям обитания среды» (Иркутск, 2022 г.), The 2nd International Electronic Conference on Antibiotics – Drugs for Superbugs: Antibiotic Discovery, Modes of Action And Mechanisms of Resistance, 15-30 June, 2022.

Апробация диссертации была проведена на Ученом совете ФГБНУ «НИИНА», протокол № 6 от 16 июня 2022 года.

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 19 научных статей и материалов конференций, из которых – 5 статей в изданиях, индексируемых в базах данных RSCI, Scopus и Web of Science, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, в том числе 3 в изданиях, входящих в первый и во второй квартиль по импакт-фактору, согласно рейтингу научных журналов SCImago (SJR, SCImago Journal Rankings); все статьи опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ для публикации диссертационных работ. Получен Патент РФ № 2710377 «Способ получения противогрибкового антибиотика эмерициллипсина А».

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 182 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка

сокращений, списка литературы и приложений. Работа содержит 11 таблиц, 23 рисунка и 2 приложения. Список литературы включает 240 источников, в том числе 227 на иностранном языке.

Благодарности. Автор выражает благодарности своему руководителю д.б.н., доценту Садыковой В.С., сотрудникам кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова к.б.н. М.Л. Георгиевой, к.б.н. Е.Н. Биланенко, д.б.н. А.В. Куракову, сотрудникам лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова к.х.н. Е.А. Рогожину, м.н.с. А.С. Барашковой, сотрудникам ФГБНУ «НИИНА» имени Г.Ф. Гаузе к.б.н. А.Е. Кувариной, к.б.н. Т.А. Ефименко, к.б.н. Н.Н. Маркеловой, инженеру М.А. Суконникову, сотрудникам Института Белозерского А.В. Тимофеевой, к.х.н. М.В. Серебряковой, сотруднику ГБУЗ МНПЦ борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения г. Москвы д.б.н. А.Б. Кулько.

Данная работа выполнена при поддержке грантов: РФФИ №19-34-90088 аспиранты, РФФИ №18-74-10073 и РФФИ №21-75-00062. Автор получала стипендию Правительства Российской Федерации в 2020/2021 и 2021/2022 гг.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая ценность полученных результатов.

Обзор литературы. В главе рассмотрена проблема устойчивости условно-патогенных и патогенных грибов к противогрибковым препаратам, отмечена важность в поиске и разработке новых антибиотиков для лечения поверхностных и инвазивных микозов. Проведен обзор структурного разнообразия и биологической активности антимикробных пептидов. Описаны противогрибковые антимикробные пептиды, выделенные из растений, животных, грибов. Представлены и охарактеризованы современные базы данных и дана классификация различных групп антимикробных пептидов. Обобщены данные по антифунгальной активности антимикробных пептидов, синтезируемых микроскопическими грибами разных таксонов. Рассмотрены механизмы действия антимикробных пептидов на патогенные грибы, методы иммобилизации грибов для получения целевых метаболитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были 38 алкалофильных и алкотолерантных изолятов грибов рода *Emericellopsis*, выделенных из содовых солончаков Кулундинской степи, Забайкалья и Северо-Восточной Монголии из коллекции культур «Грибы экстремальных местообитаний» кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Штамм *Emericellopsis alkalina* A118 (ВКПМ F-1428) (*Hypocreales*, *Ascomycota*), ранее отобранный и депонированный в ВКПМ как продуцент EmiA [Rogozhin et al., 2018], использовали как контрольный для сравнения по содержанию антибиотика.

Культивирование штаммов *E. alkalina* в различных биотехнологических системах.

Поверхностное культивирование. Культивирование 32 штаммов вида *E. alkalina* и 6 штаммов близкородственных видов осуществляли в термостате

(«Binder», Германия) в стационарных условиях при температуре 28 °С в течение 14 суток в колбах Эрленмейера на жидкой щелочной среде. Состав, г/л: минеральная основа (Na_2CO_3 – 24,0; NaHCO_3 – 6,0; NaCl – 6,0; KNO_3 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0) и органическая основа (дрожжевой экстракт – 1,0; солодовый экстракт (15 °Баллинга) – 30,0) [Георгиева и др., 2009]. В качестве посевного материала использовали 5-суточную культуру гриба *E. alkalina*, выращенную на агаризованной щелочной среде.

Глубинное культивирование. Для штамма *E. alkalina* E101 с целью сравнения выхода пептидов EmlA-E проводили глубинное культивирование в шейкере-инкубаторе («Innova 40R», США) в течение 14 суток при температуре 28 °С, 105 об/мин на жидкой щелочной среде [Георгиева и др., 2009]. В качестве посевного материала использовали суспензию спор *E. alkalina* E101 плотностью $0,5 \times 10^5$ КОЕ/мл.

Культивирование при различных значениях pH. С целью сравнения выхода EmlA проводили поверхностное и глубинное культивирование штамма *E. alkalina* E101 при различных начальных значениях pH (7,0; 9,0 и 10,0) в динамике на 7, 14 и 21 сутки при температуре 28 °С. Состав питательных сред представлен ниже:

При pH=7,0. Состав, г/л: буфер (0,1М раствор $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ – 19,21; 0,2М раствор $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 71,63) и органическая основа (дрожжевой экстракт – 1,0; солодовый экстракт (15 °Баллинга) – 30,0).

При pH=9,0. Состав, г/л: буфер (0,1М раствор Na_2CO_3 – 10,6; 0,1М раствор NaHCO_3 – 8,1) и органическая основа (дрожжевой экстракт – 1,0; солодовый экстракт (15 °Баллинга) – 30,0).

При pH=10,0. Состав щелочной среды.

Стационарное мембранно-жидкостное культивирование. С целью увеличения выхода основного вещества EmlA и получения гомологов проводили культивирование отобранного высокоактивного штамма *E. alkalina* E101 в экспериментальном ферментере, сконструированном по авторским чертежам, разработанным д.б.н. А.В. Кураковым в МГУ им. М.В. Ломоносова [Шаркова и др., 2016]. Предварительно получали матрицы бактериальной целлюлозы. В качестве продуцента бактериальной целлюлозы использовали штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547). Культивирование осуществляли в стационарных условиях при температуре 27 °С в течение 14 суток на жидкой синтетической среде Н-5. Состав, г/л: сахароза – 70,0; дрожжевой экстракт – 5,0; Na_2HPO_4 – 2,7; K_2HPO_4 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,0; моногидрат лимонной кислоты – 1,15 [Патент RU 2464307, 2012]. Полученную матрицу бактериальной целлюлозы отделяли от культуральной жидкости, отмывали ее от клеток продуцента 0,1М раствором NaOH [Moniri et al., 2017], затем дистиллированной водой, лиофильно высушивали и стерилизовали. В ламинарном боксе в ферментер наливали 100-120 мл стерильной щелочной среды [Георгиева и др., 2009], на металлическую решетку помещали стерильную лиофильно-высушенную матрицу бактериальной целлюлозы диаметром 10 см, толщиной 1 мм. В качестве посевного материала использовали 1 мл суспензии спор *E. alkalina* E101 плотностью $0,5 \times 10^5$ КОЕ/мл. Культивировали в течение 14 суток при температуре 28 °С.

Экстракция эмерициллипсинов из культуральной жидкости и мицелия и получение обогащенных водно-спиртовых концентратов. Экстракцию эмерициллипсинов проводили из культуральной жидкости (КЖ) и мицелия (Рис. 1).

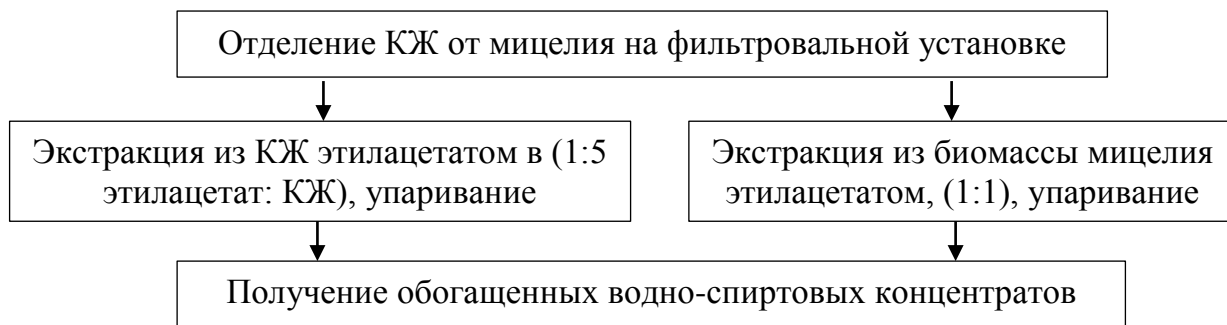


Рисунок 1. Схема экстракции эмерициллипсинов из культуральной жидкости и мицелия.

Выделение EmlA-E методом ОФ-ВЭЖХ. Обогащенный водно-спиртовой концентрат эмерициллипсинов центрифугировали при комнатной температуре 7 мин со скоростью 14 000 об/мин. Надосадочную жидкость использовали для выделения индивидуальных пептидов EmlA-E с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Метод ВЭЖХ основан на гидрофобности эмерициллипсинов. Концентрат наносили на колонку XBridge ВЕН 4,6×250 мм («Waters», Ирландия) с неподвижной фазой C18 и осуществляли фракционирование в градиенте повышения концентрации ацетонитрила в воде с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты: 16-28 % – за 12 мин; 28-55 % – за 27 мин; 55-75 % – за 20 мин и 75-85 % – за 10 мин с последующим изократическим элюированием в течение 25 мин. Детектирование поглощения разделяемых веществ осуществляли при $\lambda=214$ нм. Хроматограммы были обработаны с использованием программного обеспечения «Multichrom для Windows 9x&NT версии 1,5x-E» (Ampersend, Россия).

Определение количественного содержания EmlA. Количественное содержание EmlA определяли методом аналитической ВЭЖХ в тех же условиях, что и выделение EmlA-E. В качестве стандарта использовали основной компонент EmlA с чистотой не менее 89% [Rogozhin et al., 2018]. Готовили стандартные разведения EmlA в 50 %-ном водном растворе метанола с концентрациями 1,2; 2,21; 5,18; 6,35; 8,64 мкг/мл.

Определение гомологов методом LC/ESI-MS/MS. Очищенные соединения анализировали методом аналитической жидкостной хроматографии / масс-спектрометрии сверхэффективной (UPLC-MS) с использованием прибора Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus с ионной ловушкой и системой Thermo Accela UPLC (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Образцы наносились на микроколонку YMC Triart (C₁₈ 150 мм × 2 мм, 1,9 μм) (YMC Co., Киото, Япония). Определение поглощения контролировали с помощью детектора с диодной матрицей UV/Vis (UV-VIS DAD) (190-600 нм) и масс-спектрометрии полного сканирования (MS) (электрораспылительная ионизация (ESI+), 150-2000 а.е.). Фракции растворяли в смеси вода / метанол / уксусная кислота (88:10:2) до концентрации 1 мг/мл, фильтровали через 0,45-метровый нейлоновый фильтр и вводили в систему жидкостной хроматографии (LC).

Детекция EmlA и dEmlA методом биоавтографии. С целью обнаружения форм EmlA и dEmlA использовали метод биоавтографии [Блинов, Хохлов, 1970]. Фракцию EmlA в концентрациях 0,25; 0,50 и 1,00 мкг/мл наносили на пластину Sorbifil (L=50 мм). Хроматографию проводили в камере с системой элюентов хлороформ : метанол (3:1). Высушенную пластину помещали в чашки с тест-культурами *Aspergillus niger*, *Candida albicans* на агаризованной среде Сабуро

[Sabouraud, 1892] (плотность суспензии $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Чашки с пластиной инкубировали 24 ч при 28 °С и определяли Rf активной фракции.

Определение фрагментации отдельных индивидуальных молекул EmiA и dEmiA методами MALDI-TOF MS и MS/MS. Методом MALDI-TOF MS/MS определяли спектр фрагментации отдельных индивидуальных молекул EmiA и dEmiA и сопоставляли с заявленной формулой EmiA [Rogozhin et al., 2018]. Проводили подготовку образцов. 0,3 мкл фракции EmiA (в растворе 20% ацетонитрила; 79,5% MQ (очищенная вода); 0,5% трифторуксусной кислоты), собранные при разделении ВЭЖХ, смешивали с 0,3 мкл 50 %-ного водного этанола и с 0,5 мкл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты. Регистрация спектров и MS-анализ проводились с использованием MS-спектрометра MALDI-TOF (UltrafleXtreme BrukerDaltonics, Германия), оснащенного УФ-лазером (Nd) в режиме регистрации положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность массового обнаружения составляет около 1Да. Спектры MALDI-TOF MS и MS/MS были обработаны с помощью программного обеспечения Daltonics FlexAnalysis 3.4 (Bruker).

Оценка антифунгальной активности экстрактов и индивидуальных соединений EmiA-Е. Оценивали антимикробную активность культуральной жидкости (КЖ), постэкстракционной КЖ, экстрактов из КЖ и мицелия на условно-патогенных плесневых и дрожжевых тест-культур видов *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 2091 диско-диффузионным методом [Егоров, 2004]. В качестве контроля использовали стандартные диски с амфотерицином В (40 мкг, «НИИ Пастера», Россия).

Оценку противогрибковой активности и минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) для индивидуальных пептидов проводили методом серийных разведений на клинических изолятах дрожжевых грибов, выделенных из клинического материала больных в ГБУЗ МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ: *Aspergillus niger* 1133 м, *A. terreus* 497, *A. fumigatus* 390м, *C. albicans* 1582, *C. glabrata* 1402, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* 1447, *C. parapsilosis* 571, *Cryptococcus neoformans* 297 и *Cr. laurentii* 325м. Концентрация спор грибов составляла $0,4-5 \times 10^4$ клеток/мл. Тестируемые вещества растворяли в ДМСО (диметилсульфоксид), готовили серии двукратных разведений от 2000 до 1,5 мкг/мл. Препаратом сравнения служил амфотерицин В (Sigma, США). Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) противогрибковых препаратов считывали через 24 ч культивирования для *C. albicans* и 48 ч культивирования для *A. niger*. МПК определяли, как минимальную концентрацию препарата, полностью предотвращающую рост тест-штамма.

Оценка антимикробной активности в отношении био пленкообразующих бактерий. Клинические изоляты бактерий *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* были взяты из коллекции культур ЦНИИ эпидемиологии (Москва, Россия). В лунки планшета вносили стерильные тefлоновые кубики для формирования биопленок и бактериальную суспензию в концентрации 10^5 КОЕ/мл. Планшет инкубировали 20 ч на орбитальном шейкере. Кубики с биопленками, отмытые от среды, содержащей планктонные клетки, переносили в новый планшет со средой, содержащей серийные двукратные разведения пептида. Инкубировали 18 ч при 37 °С и определяли минимальную биоцидную концентрацию пептида в отношении дисперсных клеток биопленки (МБКд), для чего отбирали аликвоты по 10 мкл из лунок без видимого роста, делали высев на плотные питательные среды и

инкубировали 20 ч при 37 °С. За МБКд принимали концентрацию пептида, которая обеспечивала выживаемость субкультуры <0,1% по сравнению с контролем. Биоплёнки на поверхности кубиков механически разрушали и рекультивировали в бульоне Мюллер-Хинтона (МХ) [Mueller, Hinton, 1941] для определения минимальной биоцидной концентрации пептида, ингибирующей рост сформированных биопленок (МБКб). Минимальную концентрацию пептида, предотвращающую формирование биоплёнок, определяли путём культивирования бактерий на тефлоновых кубиках в лунках планшета в присутствии различных концентраций EmiA при 37 °С, 24 ч. Образовавшиеся на поверхности кубиков биопленки окрашивали 0,1% водным раствором кристаллического фиолетового 5 минут и экстрагировали этанолом. По оптической плотности полученных растворов при $\lambda=595$ нм определяли интенсивность формирования биоплёнок по сравнению с контролем. Для сравнения различий между контрольными и обработанными антимикробными биопленками использовался однофакторный дисперсионный анализ с помощью множественного сравнительного теста Бонферрони. Значение $p < 0,005$ считалось статистически значимым.

Оценка цитотоксической активности EmiA *in vitro*. Цитотоксическую активность EmiA проверяли на опухолевых клеточных линиях: НСТ-116 (колоректальная карцинома человека), К-562 (хронический миелоидный лейкоз человека), MCF-7 (инвазивная карцинома протоков молочной железы человека), В16 (меланома мыши) и MDA-MB 231 (линия рака молочной железы). РСФ (постнатальные фибробласты человека) был взят в качестве контрольного варианта. Навески изучаемых веществ растворяли в ДМСО до концентрации 10 мМ. В качестве контроля использовали противоопухолевый антибиотик доксорубин.

Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты ($5-10 \times 10^3$ клеток в 200 мкл культуральной среды), вносили растворы исследуемых препаратов, объемом не более 5% от объема среды в лунках. В качестве контроля использовали доксорубин. Культуры инкубировали 72 ч при 37 °С, 5% CO₂. В лунки вносили 20 мкл реактива МТТ (тиазолий синий тетразолий бромид; 3-(4,5-диметил-тиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолий бромид), и планшеты помещали в CO₂-инкубатор на 2-4 ч. О жизнеспособности клеток судили по цветной реакции, развивающейся при восстановлении тетразолия формазандегидрогеназами митохондрий. Окраску регистрировали на спектрофотометре при $\lambda=540$ нм. Оптическую плотность в лунках, где клетки инкубировались без добавления веществ (контроль), принимали за 100%. Определяли концентрацию внесенного препарата, начиная с которой процент выживших клеток становился меньше 50% (ингибирующая концентрация, IC₅₀), являющуюся определяющей при сравнении цитотоксического действия различных соединений.

Для оценки влияния на клеточный индекс и индукцию апоптоза использовали линию клеток НСТ116. Анализ пролиферации клеточной линии проводили с использованием системы iCELLigence RTCA. В ячейки кюветы прибора добавляли 300 мкл клеточной суспензии НСТ116 плотностью 1×10^5 клеток/мл. Через 24 ч питательную среду DMEM [Atlas, Snyder, 2006] заменяли новой средой, содержащей различные концентрации EmiA, и средой без добавления пептида в качестве контроля и инкубировали 48 ч.

Оценка гемолитической активности EmiA *in vitro*. Кровь инкубировали 2-3 ч при 4 °С. Взвесь эритроцитов 100 мкл разбавляли физиологическим буфером

(рН 7,2) до 500 мкл. Растворы исследуемых веществ с концентрацией 10 мкМ ДМСО разбавляли фосфатным буфером (PBS) 1:10. Готовили растворы с концентрациями 5, 10 и 20 мкМ. Добавляли смесь PBS с эритроцитами до общего объема 200 мкл. Контроль (К) – смесь эритроцитов с водой (100%-ный гемолиз). Интактный контрольный раствор (И) – смесь эритроцитов с PBS и ДМСО. В качестве контрольного образца с активным гемолизом использовали антибиотик грамицидин С (Gram S). Смесь инкубировали 1 ч при 37 °С. Оптическую плотность надосадочной жидкости измеряли при $\lambda=570$ нм. За 100% принимали оптическую плотность надосадочной жидкости в контрольной пробе с водой.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Анализ способности изолятов коллекции штаммов рода *Emericellopsis* к накоплению EmiA и отбор активных культур.

Для 38 изолятов рода *Emericellopsis* из коллекции «Грибы экстремальных местообитаний» кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова был проведен анализ на способность к образованию антимикробного пептида – эмерициллипсина А (EmiA). Тридцать два штамма были отнесены к виду *E. alkalina*, шесть штаммов как *Emericellopsis* sp. Два штамма (1KS17-1 и 2KS17-1) были идентифицированы как *E. cf. maritima*, а штамм 1KS17-4 как *E. cf. terricola*). Противогрибковой активностью обладали только экстракты из культуральной жидкости и мицелия, в простэкстракционном остатке активность отсутствовала и EmiA в постэкстракционном остатке не обнаружен. Сравнительный анализ показал, что штаммы, выделенные из почв разных типов засоленности, различаются по количественному содержанию основного компонента EmiA (Таблица 1).

Таблица 1. Антифунгальная активность экстрактов и содержание EmiA у штаммов рода *Emericellopsis*, выделенных из почв с различным типом минерализации.

Номер штаммов	Антифунгальная активность, зона мм				EmiA в КЖ, мг/л	EmiA в мицелии, мг/г
	Экстракты из КЖ		Экстракты из мицелия			
	<i>A. niger</i> 00760	<i>C. albicans</i> ATCC 2091	<i>A. niger</i> 00760	<i>C. albicans</i> ATCC 2091		
Содово-хлоридный тип засоления почвы						
M20	16,00±0,48	20,00±0,60	10,00±0,30	10,00±0,30	1,85±0,05	0,51±0,01
Содовый тип засоления почвы						
E101	17,00±0,51	12,00±0,36	8,00±0,24	10,00±0,30	2,21±0,07	1,01±0,03
A113	10,00±0,30	20,00±0,60	7,00±0,21	–	1,35±0,04	1,06±0,03
Хлоридный тип засоления почвы						
2KS17-1	10,00±0,30	12,00±0,36	9,00±0,27	9,00±0,27	0,17±0,01	0,51±0,01
1KS17-1	26,00±0,38	13,00±0,30	–	–	0,19±0,01	0,30±0,01

E101, M20, A113 – штаммы *E. alkalina*; 1KS17-1 и 2KS17-1 – штаммы *E. cf. maritima*. Обозначения: «–» экстракты не тестировали, «н.о.» – не обнаружено

Штаммы *E. alkalina*, выделенные из почв содовых и содово-хлоридных типов засоления, характеризуются высоким накоплением EmiA. Максимальное количество EmiA обнаружено в культуральной жидкости типового штамма *E. alkalina* E101 – 2,21 мг/л среды. Штаммы A113 и M20 вида *E. alkalina* также характеризовались высокими уровнями EmiA как в культуральной жидкости, так и в мицелии, составляющими 1,35 и 1,06 мг/л для A113, и 1,85 и 0,51 мг/л для M20, соответственно. У штаммов (1KS17-1 и 2KS17-1) другого вида этого рода *E. cf. maritima*, изолированных из почв хлоридного типа засоления, количество EmiA было выше в мицелии.

Для штаммов продуцентов, показавших наибольший выход пептида (E101, A113, M20) вида *E. alkalina* в концентратах культуральной жидкости помимо основного компонента EmiA были детектированы и собраны методом полупрепаративной ВЭЖХ 4 других индивидуальных соединения, элюированных с колонки от 60,0 до 66,5 мин, для определения их аминокислотных последовательностей. Общий выход всех пептидов составил около 2,5% по отношению к общей массе полученного концентрата. На основе структуры основного компонента EmiA проводили идентификацию минорных соединений с помощью масс-спектрометрии LC-ESI/MS/MS (Рис. 2). Согласно ранее полученным данным, структура основного антибиотика EmiA, определенная методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии, имеет следующую форму: Methyldecanoyl-MePro-ANMOD-Ala-Aib-Ile-Iva-βAla-Alaol-Glyol [Rogozhin et al., 2018].

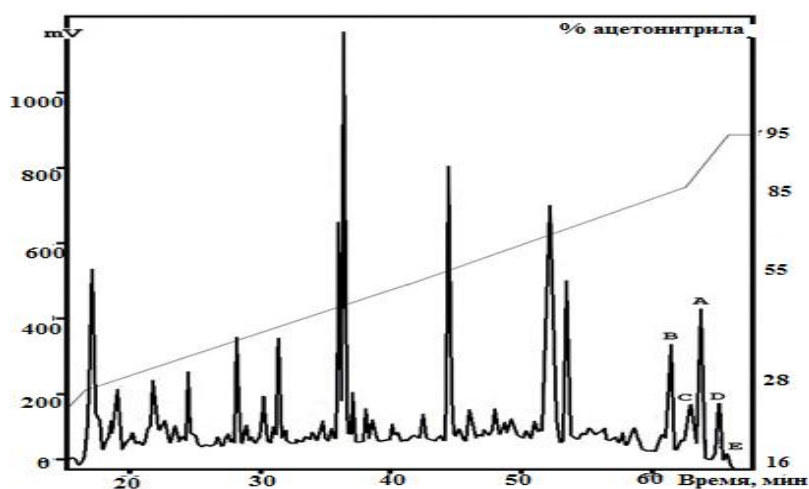


Рисунок 2. Фракционирование концентрата *Emericellopsis alkalina* с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Целевые компоненты отмечены буквами А-Е [Kuvarina et al., 2022].

Результаты показали, что все четыре соединения являются гомологами (изоформы) EmiA с одиночными заменами аминокислотных остатков. Выделенные минорные соединения были названы эмерициллипсины В-Е (EmiB-E) (Таблица 2). Все 4 соединения в первичной структуре содержали следующие замены: изовалин на α-аминоизомасляную кислоту в положении 7 («гомолог В»), аланин на серин в положении 3 («гомолог С»), α-аминоизомасляную кислоту на изовалин в положении 4 («гомолог D») и аланинол на α-аминоизомасляную кислоту в положении 8 («гомолог E»).

Минорные компоненты накапливались преимущественно в мицелии у всех штаммов, у которых они были детектированы.

Таблица 2. Структурная характеристика EmiA-E.

Пептаибол	Последовательность аминокислот
EmiA	Methyldecanoyl-MePro-AHMOD-Ala-Aib-Ile-Iva-βAla-Alaol-Glyol
EmiB	Methyldecanoyl-MePro-AHMOD-Ala-Aib-Ile- Aib -βAla-Alaol-Glyol
EmiC	Methyldecanoyl-MePro-AHMOD- Ser -Aib-Ile-Iva-βAla-Alaol-Glyol
EmiD	Methyldecanoyl-MePro-AHMOD-Ala- Iva -Ile-Iva-βAla-Alaol-Glyol
EmiE	Methyldecanoyl-MePro-AHMOD-Ala-Aib-Ile-Iva-βAla- Aib -Glyol

*все замены, отличающиеся от первичной последовательности молекулы EmiA, выделены красным цветом

Образование EmiA-E и дегидроформы разными видами рода *Emericellopsis*.

У двух штаммов *E. cf. maritima* (1KS17-1, 2KS17-1), выделенных из хлоридных типов засоления в зоне элюирования основного компонента – EmiA были обнаружены два близких соединения с разной степенью гидрофобности (установлено по времени удерживания при разделении методом ВЭЖХ). Результаты анализа ВЭЖХ показали наличие двух пиков: 1 (tR = 37,3 мин) и 2 (tR = 39,4 мин) (Рис. 3).

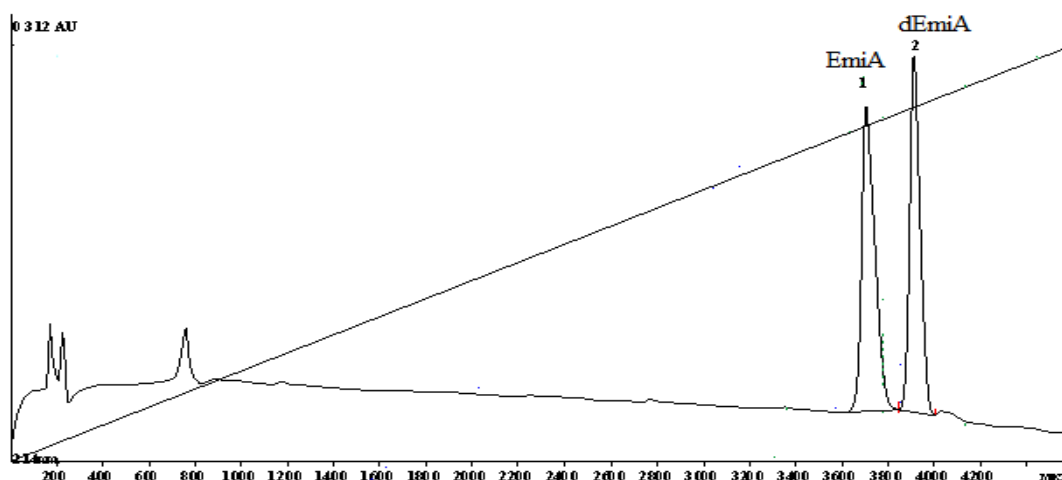


Рисунок 3. Профиль анализируемого образца методом ОФ-ВЭЖХ. Пик 1 и 2 со временем удерживания 37,4 мин и 39,3 мин соответственно [Kuvarina et al., 2022].

Эти два пика были собраны отдельно и проанализированы методом MALDI-TOF MS. Пик 1 содержал вещество с молекулярной массой 1050,7 Да (Рис. 4), а пик 2 содержал вещество с массой 1032,7 Да (Рис. 5). Масса молекулярного иона 1050,7 Да соответствует основному компоненту EmiA (Рис. 4). Разница между массами двух молекулярных ионов в 18 Да коррелирует с молекулярной массой молекулы воды (M_r ~ 18 Да) (Рис. 4 и 5).

Таким образом, в анализируемых образцах штаммов *E. cf. maritima* (1KS17-1, 2KS17-1) (Рис. 6а, 6б) наблюдалось два компонента, один из которых представляет собой основной пептид EmiA, а другой является его дегидратированной формой (dEmiA), не содержащей гидроксильную группу.

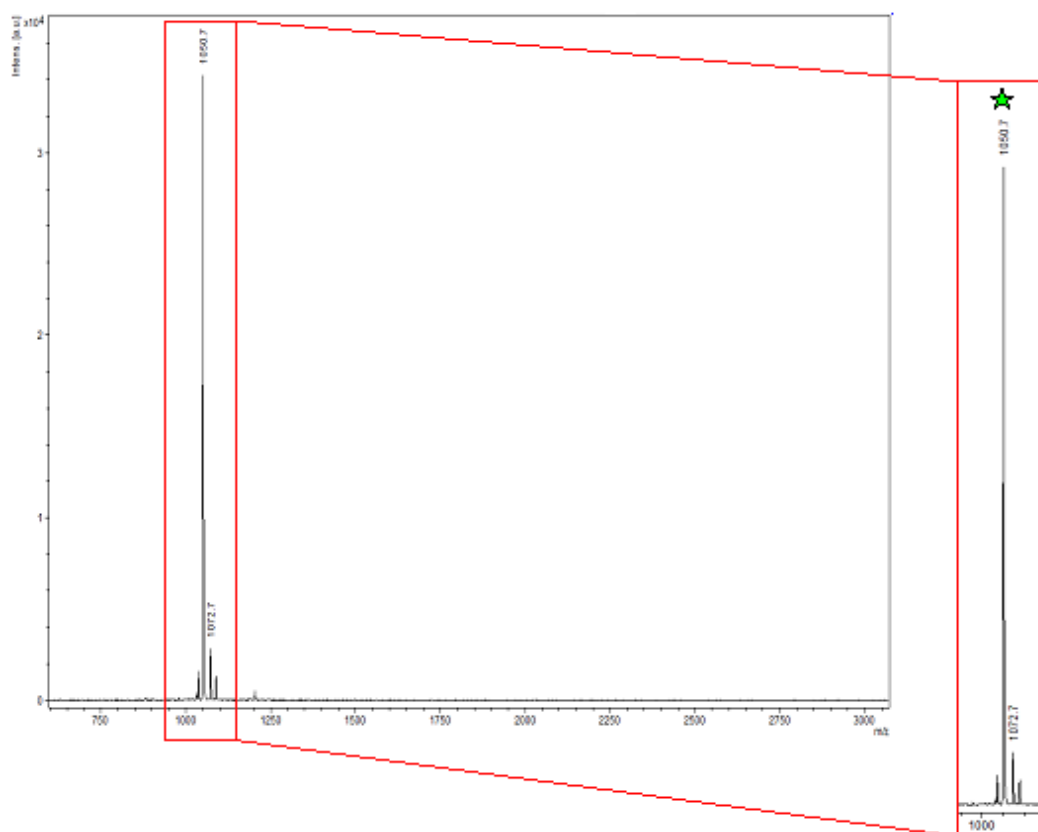


Рисунок 4. Масс-спектр MALDI-TOF MS фракции относится к пику Еm1А со временем удерживания 37,4 мин [Kuvarina et al., 2022].

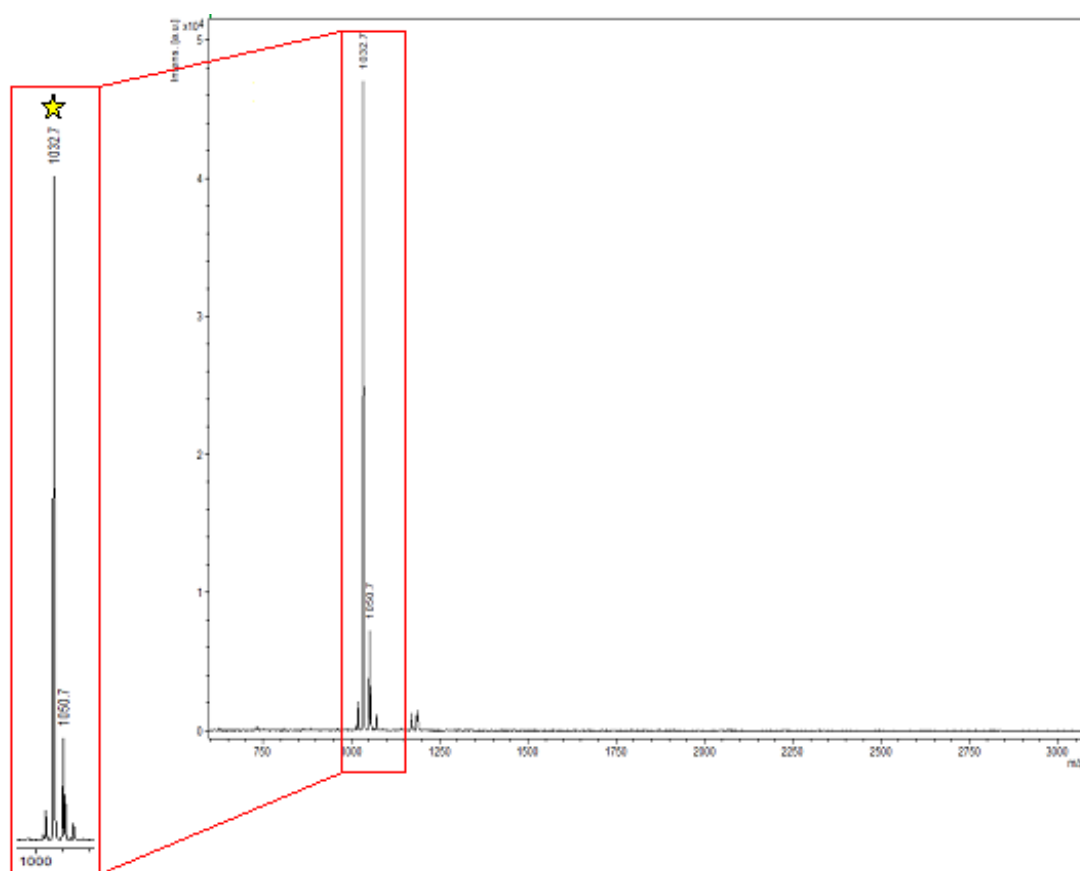


Рисунок 5. Масс-спектр MALDI-TOF MS относится к пику dEm1А со временем удерживания 39,3 мин [Kuvarina et al., 2022].

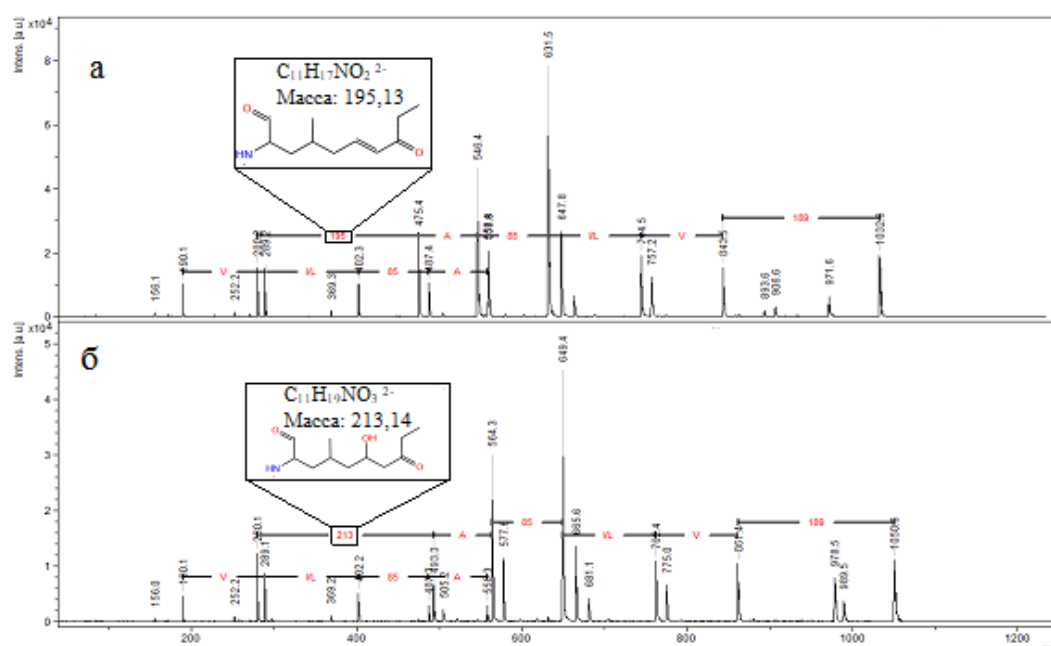


Рисунок 6а, 6б. Спектры MALDI-TOF MS/MS молекулярных ионов с массами 1032,7 Да и 1050,7 Да [Kuvarina et al., 2022].

Дегидратированная форма EmiA (dEmiA) проявляла антифунгальную активность в отношении условно патогенных грибов *Aspergillus niger* ATCC 16404 и *Candida albicans* ATCC 14053, МИК составляла 4 и 2 мкг/мл соответственно. Такие же значения были получены ранее для основного компонента EmiA [Rogozhin et al., 2018, Kuvarina et al., 2021]. Результаты, выявленные при биоавтографии, показали наличие двух зон задержки роста со значениями Rf: 0,20 и 0,55 соответственно в системе хлороформ : метанол в соотношении 3:1. Поскольку обе формы EmiA и dEmiA обладают антифунгальной активностью, можно предположить, что отсутствие гидроксильной группы в молекуле антибиотика не оказывает влияние на его противогрибковое действие.

Антифунгальная активность EmiA-E.

Для всех выделенных гомологов была оценена антифунгальная активность. Основной компонент EmiA проявил высокую активность как в отношении условно-патогенных коллекционных, так и клинических изолятов рода *Aspergillus*, значения МИК находились в диапазоне 0,5-4 мкг/мл. Для EmiB МИК составляет от 4 до 8 мкг/мл, в зависимости от тест-штамма р. *Aspergillus* (Таблица 3).

Таблица 3. Минимальная ингибирующая концентрация EmiA-E в отношении различных условно-патогенных коллекционных и клинических изолятов рода *Aspergillus*.

Виды и штаммы рода <i>Aspergillus</i>	МИК, мкг/мл					
	EmiA	EmiB	EmiC	EmiD	EmiE	AmpB
<i>A. niger</i> ATCC 16404	4	8	32	>64	>64	1
<i>A. niger</i> 1133m*	4	8	32	>64	>64	1
<i>A. terreus</i> 3K*	0,5	4	8	16	32	>64
<i>A. terreus</i> 497*	1	4	8	16	64	>64
<i>A. fumigatus</i> VKM F-37	2	8	16	32	>64	1
<i>A. fumigatus</i> 390m*	2	8	16	32	>64	1

* патогенные клинические изоляты рода *Aspergillus*

В отличие от основного компонента EmiA, большинство изолятов *Aspergillus* оказались нечувствительны к EmiD и EmiE (диапазон МИК 16-64 мкг/мл). Изоляты *A. terreus* – вида, обладающего природной резистентностью к полиеновому противогрибковому препарату амфотерицину В (AmpB), также были чувствительны к EmiA и EmiB (Таблица 3).

Соединение EmiA было выбрано для дальнейшего функционального анализа из-за его сильной антимикотической активности и большого количества в общем экстракте.

Поскольку антифунгальная активность для EmiA - основного соединения, преобладающего в пептидном комплексе, по результатам оценки на патогенных клинических изолятах рода *Aspergillus* была максимальной, он был отобран далее для оценки его противогрибкового действия на клинических изолятах дрожжевых грибов – возбудителей кандидозов и диссеминированных микозов. EmiA был активен в отношении изолятов *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. neoformans* со значениями МИК в диапазоне 0,5-2 мкг/мл, резистентным к флуконазолу. Интересно, что EmiA также проявлял сильную противогрибковую активность, аналогичную амфотерицину В, в отношении обоих видов изолятов *Cryptococcus*, которые обладают устойчивостью к пептидному антимикотику каспофунгину и флуконазолу (Таблица 4).

Таблица 4. Минимальная ингибирующая концентрация EmiA в отношении клинических изолятов грибов рода *Candida* и *Cryptococcus*.

Виды и штаммы рода <i>Candida</i> и <i>Cryptococcus</i>	МИК, мкг/мл			
	EmiA	AmpB	CAS	FZ
<i>Candida albicans</i> 1402	2	0,5	0,06	64
<i>C. glabrata</i> 1402	0,25	1	0,06	128
<i>C. krusei</i> 1447	1	2	0,25	R
<i>C. tropicalis</i> 156	1	0,5	0,06	64
<i>C. parapsilosis</i> 571	1	1	1	128
<i>Cryptococcus neoformans</i> 297	0,5	0,5	>64	16
<i>Cr. laurentii</i> 325m	0,5	0,25	16	32

FZ – флуконазол, CAS – каспофунгин, AmpB – амфотерицин В, EmiA – эмерициллипсин А

Таким образом, установлено, что ингибирующая активность EmiA в отношении резистентных к препаратам группы азолов патогенных изолятов *Aspergillus* spp., *Candida* spp. и *Cryptococcus* spp. проявляется на уровне амфотерицина В.

Действие EmiA на формирование биопленок клиническими изолятами бактерий.

В число наиболее опасных инфекционных биопленкообразующих бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний включены грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus* с множественной лекарственной устойчивостью. До настоящего времени в литературе нет сведений о влиянии АМП грибного происхождения на биопленкообразующие бактерии. С целью исследования возможного антибактериального действия EmiA было оценено его действие в отношении клинических изолятов грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus* и образования ими биопленок (Рис. 7 и 8).

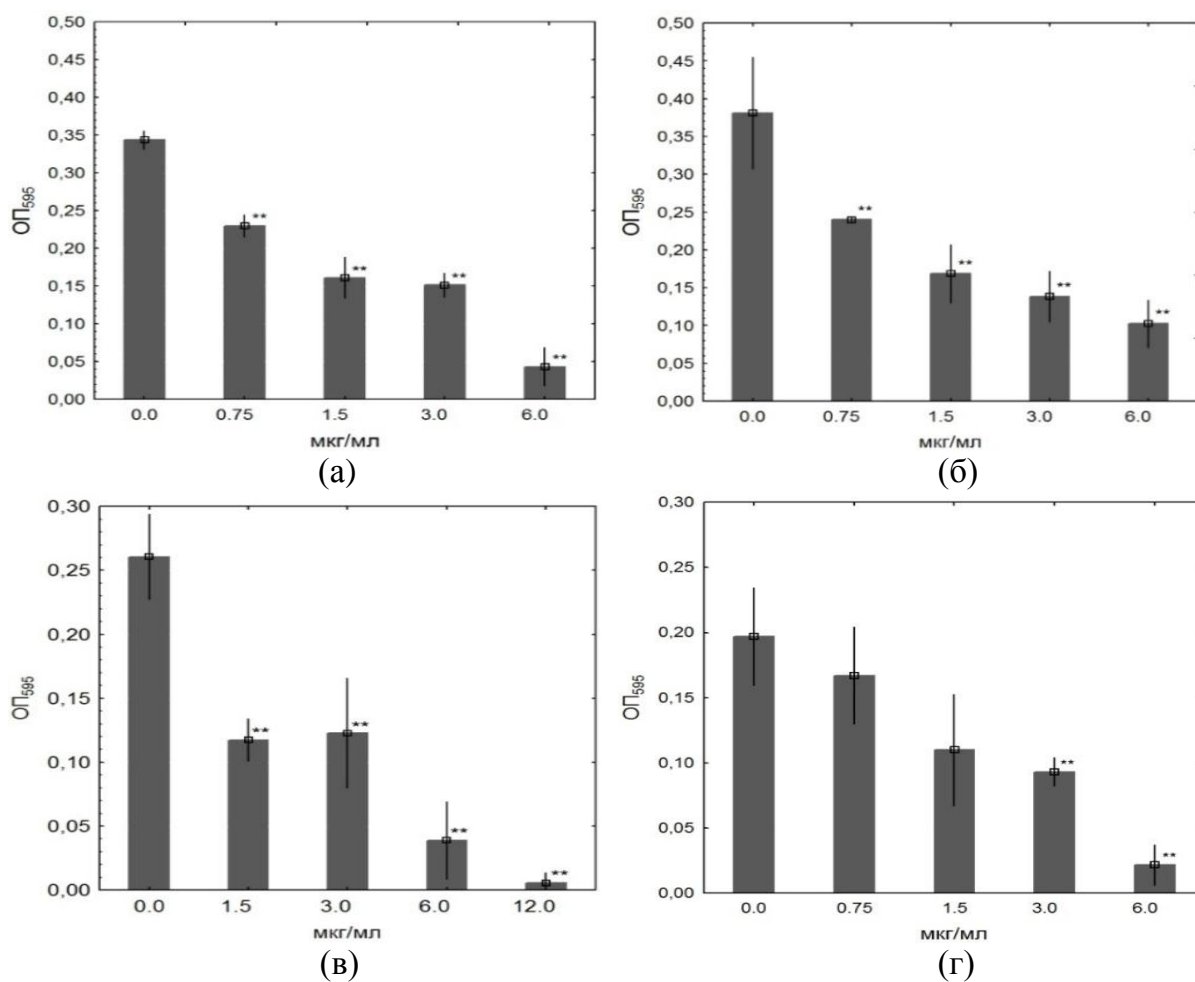


Рисунок 7. Анализ образования биопленки при ОП₅₉₅ штаммами *Staphylococcus aureus* (а – *S. aureus* 1; б – *S. aureus* 2; в – *S. aureus* 3; г – *S. aureus* 4) при различных концентрациях EmiA (мкг/мл) [Садыкова и др., 2020].

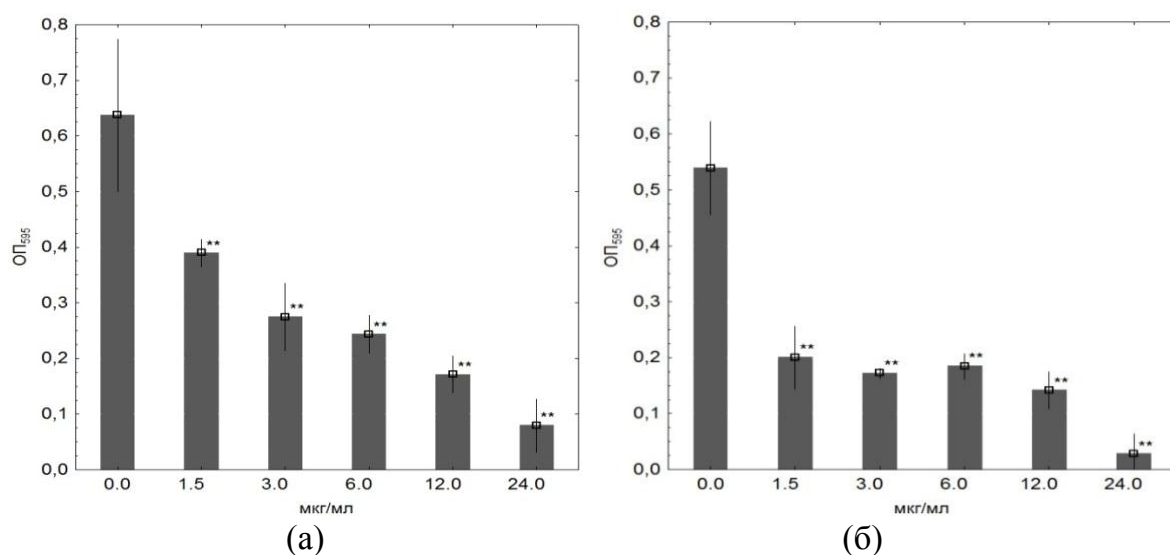


Рисунок 8. Анализ образования биопленки при ОП₅₉₅ штаммами *Enterococcus* (а – *E. faecalis* 6; б – *E. faecium* 7) при различных концентрациях EmiA (мкг/мл) [Садыкова и др., 2020].

** Концентрации пептида, при которых наблюдались статистически значимые различия между контрольными биопленками и биопленками, образующимися в присутствии пептида ($p < 0,005$).

Установлено, что EmiA в субингибирующих концентрациях статистически значимо предотвращали образование бактериальных биопленок *in vitro* в отношении грамположительных бактерий.

Максимальный эффект наблюдался при концентрациях пептида, соответствующих ½ МБК, и составил от 73,2% до 97,8% в зависимости от изолята. При концентрации 15 мкг/мл образование биопленки достоверно уменьшилось на 53,0%, 56,0%, 53,1% соответственно для *S. aureus* 1, 2, 3.

Антибиопленочная активность пептида в отношении клинических изолятов грамположительных бактерий (*S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*) находилась в диапазоне от 50 до 200 мкг/мл, что свидетельствовало о слабом действии EmiA на предварительно сформированные биопленки этих бактерий. Исследуемый антибиотик не обладал способностью к активному взаимодействию с экзополисахаридным матриксом, составляющим основу сформированных бактериальных биопленок, что, по-видимому, определяется, в первую очередь, отсутствием функциональных групп на его поверхности. Однако, субингибирующие концентрации EmiA предотвращали образование бактериальных биопленок *in vitro* в отношении грамположительных бактерий, при этом наблюдалось достоверное различие как между клиническими изолятами одного вида бактерий, так и между изолятами различной видовой принадлежности

Цитотоксическая активность EmiA.

Известно, что практически для всех противогрибковых препаратов, применяемых в клинике, одним из основных недостатков является высокая токсичность на нормальные клетки. Активные, но высокотоксичные соединения в экспериментах *in vitro* отбраковываются для дальнейшего изучения как потенциальные кандидаты для разработки антибиотиков. В дальнейших экспериментах оценивали возможное цитотоксическое действие EmiA на различных линиях опухолевых клеток и нормальных клетках – постнатальных фибробластах человека *in vitro*. Цитотоксическая активность на уровне доксорубина была обнаружена только в отношении клеток НСТ116 (0,25 мкМ), (Таблица 5). На других клеточных линиях опухолевых клеток и фибробластах цитотоксическая активность EmiA значительно уступала препарату сравнения – противоопухолевому антибиотику доксорубину (от 4 до 25 раз).

Таблица 5. Цитотоксическая активность EmiA.

Клеточные линии	IC ₅₀ , мкМ	
	EmiA	Доксорубин
НСТ-116	0,25±0,03	0,20±0,03
К-562	1,00±0,14	0,25±0,03
MDA-MB-231	8,00±1,04	0,80±0,09
MCF-7	11,00±1,20	0,50±0,06
B16	16,00±2,08	0,60±0,07
PFC	11,50±1,50	0,20±0,03

В дальнейшем для оценки влияния EmiA на рост опухолевых клеток НСТ116 была использована система анализа клеток iCELLigence RTCA, которая позволяет отслеживать не только эффект ингибирования роста, но и оценить влияние на индукцию апоптоза и ДНК, и способствует выбору лучших соединений-кандидатов на ранней стадии разработки лекарств перед началом испытаний на животных.

Различия в клеточной пролиферации под влиянием повышения концентрации EmiA вызвали изменения клеточного индекса (CI). При добавлении EmiA в питательную среду CI изменялся в зависимости от концентрации пептида: при 0,25 мкг/мл – от 0,4 до 1,1; при 1,0 мкг/мл – от 0,4 до 0,7; при 4,0 мкг/мл – от 0,4 до 0,6; при 16,0 мкг/мл – от 0,4 до 0,5. Контроль от 0,4 до 1,3. EmiA проявлял сильное ингибирующее действие и постоянно сохранял свои значения CI на низких уровнях при концентрациях $\geq 1,0$ мкг/мл (Рис. 9).

В концентрации 0,25 мкг/мл антибиотик индуцирует апоптоз и приводит к накоплению содержания ДНК в фазе G0/G1. При концентрации пептида 1,0 мкг/мл, эффективно снижается значение клеточного индекса (CI), а концентрация 0,25 мкг/мл является минимальной ингибирующей концентрацией в отношении клеток колоректальной карциномы (HCT116). Результаты активности HCT116 не сопоставимы с результатами анализа цитотоксичности во многих исследованиях для антимикробных пептидов из группы пептаиболов [Stefanowics-Hajduk et al., 2020; Hazekawa et al., 2019] и значительно ниже показателей цитотоксического действия в отношении нормальных клеток человека для противогрибкового препарата амфотерицина В.

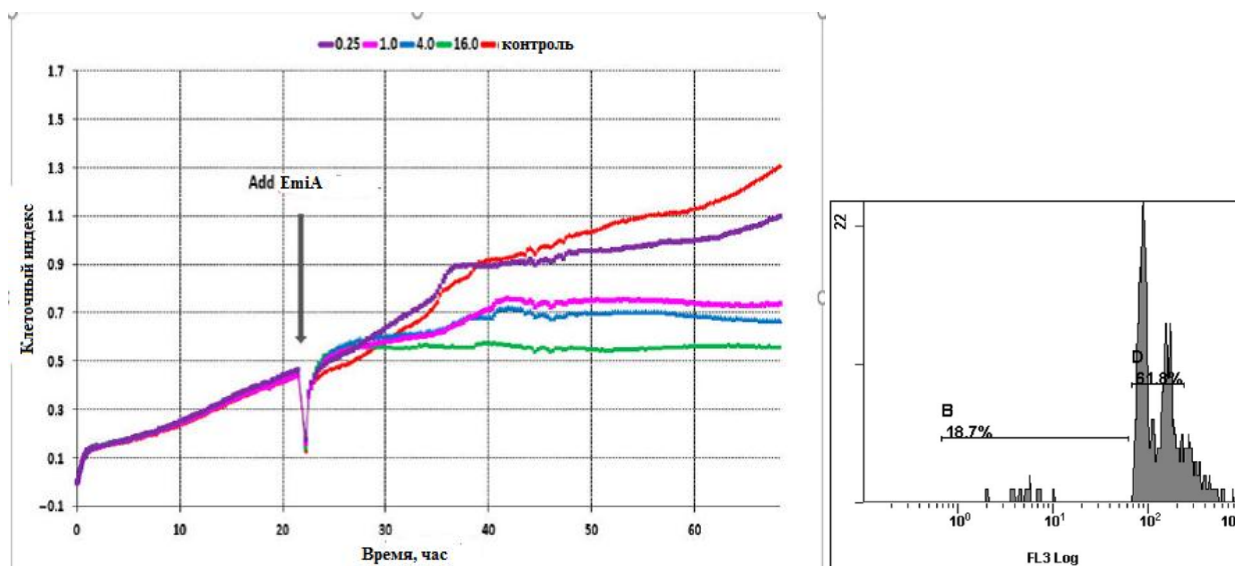


Рисунок 9. Клеточный индекс (CI) линии опухолевых клеток HCT116 при различных концентрациях EmiA: 0,25 мкг/мл; 1,0 мкг/мл; 4,0 мкг/мл; 16,0 мкг/мл. Уровень апоптоза клеток HCT116 под влиянием EmiA в концентрации 0,25 мкг/мл: зона В – клетки с фрагментированной ДНК (апоптоз); зона D представляет собой процент клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла [Kuvarina et al., 2022].

Гемолитическая активность EmiA.

Для более глубокого изучения возможного токсического эффекта EmiA была проведена серия экспериментов по его гемолитической активности, которая заключается в способности разрушать мембрану эритроцитов. EmiA показал 12,6%-ный гемолиз при концентрации 20 мкМ по сравнению со 100%-ным гемолизом для пептидного антибиотика грамицидина С в тех же концентрациях вещества (Рис. 10).

Таким образом, в сравнении со многими пептидными антибиотиками EmiA практически не оказывает гемолитического действия на эритроциты в

концентрациях до 20 мкМ, при выраженном противогрибковом действии в диапазоне концентраций 2-4 мкМ.

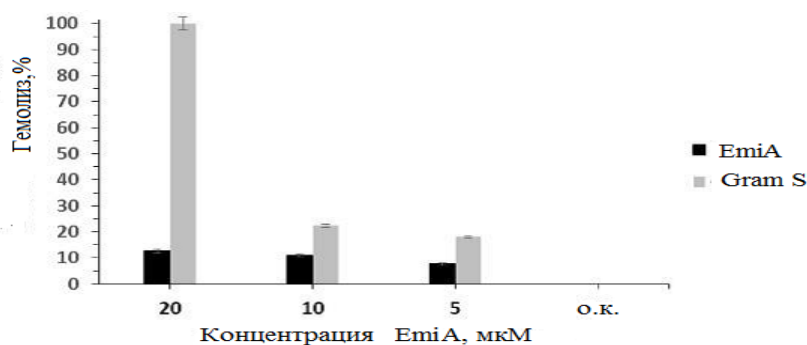


Рисунок 10. Гемолитическая активность EmiA и грамицидина С (Gram S) на эритроцитах человека. Обозначения: о.к.: отрицательный контроль (0,9% раствор NaCl) [Kuvarina et al., 2022].

Разработка биотехнологии получения EmiA.

Для разработки биотехнологии получения эмерициллипсинов был использован типовой штамм-продуцент *E. alkalina* E101 как наиболее активный и продуктивный по выходу основного компонента EmiA при поверхностном культивировании. Оптимальное значение рН питательной среды может влиять на выход антибиотиков продуцентами. В связи с этим исследовали образование эмерициллипсинов в культуральной жидкости и мицелии при различных начальных значениях рН (7,0; 9,0 и 10,0) в поверхностных и глубинных условиях культивирования в динамике на 7, 14 и 21 сутки (Рис. 11).

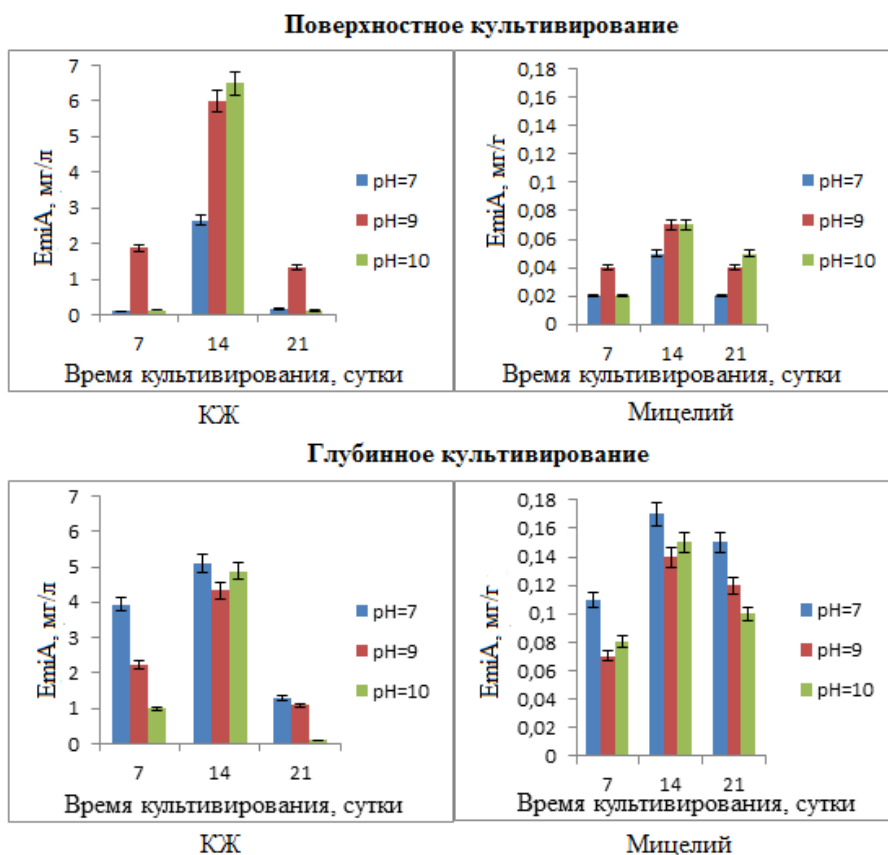


Рисунок 11. Динамика образования EmiA при различных начальных значениях рН в динамических и статических условиях культивирования.

Влияние рН. Оптимальным значением рН среды в глубинных условиях культивирования для накопления EmiA в мицелии штаммом *E. alkalina* E101 является рН 7,0 при этом его содержание в мицелии во всех вариантах значительно ниже, чем в культуральной жидкости. В стационарных условиях культивирования оптимальным являлся диапазон щелочных значений рН от 9,0 до 10,0 (Рис. 11).

Влияние времени культивирования. Для поверхностного и глубинного способов культивирования оптимальная длительность процесса составила 14 суток. Максимальное содержание EmiA в культуральной жидкости достигается при поверхностном культивировании и составляет 6,0-6,5 мг/л, а в мицелии содержание EmiA выше при глубинном культивировании – 0,14-0,17 мг/г (Рис. 11).

Стационарное мембранно-жидкостное культивирование на бактериальной целлюлозе. Алкалофильные грибы *E. alkalina* являются одними из важнейших доминантов на побережье содовых и соленых озер. Поскольку большинство озер неглубокие с непостоянной линией уреза воды, а в некоторых случаях озера могут полностью высыхать в летний период, организмы, обитающие на их побережье, приспособлены к условиям микроаэрофилии и в природе часто растут на пленках из цианообактериальных матов [Георгиева и др., 2009]. Моделирование природных условий продуцента на бактериальных пленках может способствовать увеличению выхода целевых компонентов, в том числе антибиотиков.

Было проведено сравнительное изучение трех способов выращивания штамма-продуцента *E. alkalina* E101 – поверхностного, глубинного и стационарного мембранно-жидкостного культивирования на бактериальной целлюлозе в течение 14 суток.

Исследования показали, что при росте на бактериальной целлюлозе в качестве подложки для типового штамма *E. alkalina* E101 выход EmiA увеличивается в 1,7 раза в сравнении с поверхностным способом культивирования и в 2,3 раза в сравнении с глубинным культивированием (Таблица 6), при этом помимо основного целевого пептаибола EmiA синтезируются его гомологи В и С. При глубинном культивировании выход пептидов уменьшался в 1,3 раза, в сравнении с поверхностным культивированием.

Таблица 6. Содержание EmiA в штамме *Emericellopsis alkalina* E101 при различных типах культивирования (14 сутки).

Тип культивирования	EmiA в КЖ, мг/л	EmiA в мицелии, мг/г
Поверхностное	6,50±0,20	0,07±0,00
Глубинное	4,87±0,15	0,15±0,01
Стационарное мембранно-жидкостное	11,05±0,33	0,17±0,01

Разработан лабораторный регламент для наработки противогрибкового пептида EmiA в стационарных биотехнологических системах и при мембранно-жидкостном культивировании на полимерной подложке (бактериальной целлюлозе). Получали матрицы бактериальной целлюлозы культивированием штамма *G. hansenii* GH-1/2008 в стационарных условиях при температуре 27 °С в течение 14 суток на жидкой среде Н-5 [Патент RU 2464307, 2012]. Продуктивность

по выходу пептида на бактериальной целлюлозе – 11 мг антибиотика на литр среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках работы впервые изучены способность к образованию разных форм и компонентный состав новых пептаиболов эмерициллипсинов для коллекции штаммов грибов вида *E. alkalina*, выделенных из почв и донных отложений с разными типами засоления. Максимальные значения количества основного компонента EmiA отмечены у изолятов *E. alkalina* из содовых почв, что согласуется с ранее полученными данными по первичному скринингу нескольких культур этого вида – обитателей содовых озер [Rogozhin et al., 2018]. Были отобраны новые штаммы-продуценты эмерициллипсинов EmiA-E вида *E. alkalina*, обладающих выраженной противогрибковой активностью в отношении широкого спектра грибов и дрожжей. Разработан более эффективный способ выделения антибиотиков из культуральной жидкости продуцента и показано его наличие в мицелии. Разработана технологическая схема для наработки основного компонента EmiA для отобранного штамма-продуцента.

Впервые установлено, что помимо EmiA, алкалофильные грибы *E. alkalina* образуют еще 4 гомолога, а штаммы близкородственных видов способны к образованию дегидратированной формы EmiA (dEmiA), не содержащей гидроксильную группу, что, однако, не влияет на противогрибковые свойства молекулы. Для гомологов В-Е изучена их противогрибковая активность, которая зависит от первичной структуры полипептидной цепи. Установлены минимальные ингибирующие концентрации для каждого из выделенных эмерициллипсинов. Ингибирующая активность основного соединения EmiA против азолустойчивых клинических изолятов *Aspergillus* spp. и *Candida* spp. и *Cryptococcus* spp. проявляется на уровне амфотерицина В.

Помимо выраженного противогрибкового действия, EmiA обладал слабым ингибирующим действием на формирование биопленок грамположительных бактерий из группы ESKAPE – клинически значимых возбудителей инфекционных заболеваний. Антибиопленочная активность пептида находилась в диапазоне от 50 до 200 мкг/мл для грамположительных бактерий (*S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*).

Практическое применение АМП как потенциальных лекарственных средств в клинике ограничено их токсическим действием на клетки человека. Поэтому актуальна оценка гемолитических и цитотоксических эффектов при отборе соединения – кандидата для разработки новых антибиотиков [Carstens et al., 2017]. Установлено, что EmiA обладает низкой и избирательной цитотоксической активностью. В модельных системах на опухолевых и нормальных клеточных линиях цитотоксическое действие показано только в отношении колоректальной карциномы (HCT116). При концентрации пептида 1,0 мкг/мл достоверно снижается значение клеточного индекса С1 и индуцируется апоптоз, а концентрация 0,25 мкг/мл является минимально ингибирующей концентрацией в отношении клеток колоректальной карциномы. При исследовании эффекта на эритроциты человека показано низкое гемолитическое действие пептида, в концентрации 20 мкМ лизису подвергалось не более 12 % клеток, что свидетельствует о перспективности данного соединения для дальнейшего изучения как нового природного антибиотика с противогрибковым действием для лечения глубоких и инвазивных микозов.

ВЫВОДЫ

1. Изучены особенности образования антимикробных пептидов эмерициллипсинов для 38 штаммов микромицетов алкалофильных грибов рода *Emericellopsis*. Показано, что образование антибиотиков не является штаммоспецифичным признаком, но их суммарное количество варьирует в зависимости от штамма – продуцента.
2. Впервые выделены и охарактеризованы четыре новых антимикробных пептида EmiB-E, проведена идентификация первичной их структуры. У двух штаммов видов: *Emericellopsis* cf. *maritima* и *E. cf. terricola* была идентифицирована также дегидратированная форма основного компонента EmiA.
3. Показано, что спектр антифунгальной активности и ее выраженность зависят от первичной структуры эмерициллипсинов и снижаются в ряду A-E. Ингибирующая активность EmiA против азолустойчивых патогенных изолятов *Aspergillus* spp., *Candida* spp. и *Cryptococcus* spp. проявляется на уровне антифунгального препарата амфотерицина В в диапазоне 0,25-2 мкг/мл. Кроме того, EmiA ингибирует формирование биопленок грамположительных бактерий из группы ESKAPE – клинически значимых возбудителей инфекционных заболеваний.
4. Установлено, что основной компонент EmiA практически не оказывает токсического действия на нормальные клеточные линии (PFC) и не проявляет гемолитическую активность по отношению к эритроцитам человека. Цитотоксическая активность в отношении колоректальной карциномы (HCT116) при концентрации пептида 1,0 мкг/мл эффективно снижает значение клеточного индекса (CI) и индуцирует апоптоз на клеточных линиях.
5. Разработан лабораторный регламент для наработки EmiA в стационарных биотехнологических системах и на полимерной подложке (бактериальной целлюлозе). Использование полимера позволяет повысить выход основного компонента – EmiA в 1,7 раза в сравнении с поверхностным способом культивирования и в 2,3 раза в сравнении с глубинным культивированием.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI:

1. Kuvarina A.E., **Gavryushina I.A.**, Sykonnikov M.A., Efimenko T.A., Markelova N.N., Bilanenko E.N., Bondarenko S.A., Kokaeva L.Y., Timofeeva A.V., Serebryakova M.V., Barashkova A.S., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Sadykova V.S. Exploring Peptaibol's Profile, Antifungal and Antitumor Activity of Emericellipsin A of Emericellopsis Species from Soda and Saline Soils // *Molecules*. 2022. V. 27. № 5. P. 1736. doi: 10.3390/molecules27051736. IF(WoS): 4.412, SJR: 0.782, Q2
2. Kuvarina A.E., **Gavryushina I.A.**, Kulko A.B., Ivanov I.A., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Sadykova V.S. The Emericellipsins A-E from an Alkalophilic Fungus *Emericellopsis alkalina* Show Potent Activity against Multi-drug-Resistant Pathogenic Fungi // *Journal of Fungi*. 2021. V. 7. №2. P. 153. doi:10.3390/jof7020153. IF(WoS): 4.621, SJR: 1.42, Q1
3. **Гаврюшина И. А.**, Георгиева М. Л., Куварина А. Е., Садыкова В. С. Пептаиболы как потенциальные антифунгальные и противоопухолевые антибиотики: современные исследования и перспективы (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2021. Т. 57, № 5. С. 432-440.

- doi:10.31857/S055510992105007X. IF(РИНЦ): 1,63 [**Gavryushina I.A.**, Georgieva M.L., Kuvarina A.E., Sadykova V.S. Peptaibols as Potential Antifungal and Anticancer Antibiotics: Current and Foreseeable Development (Review) // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2021. V. 57, № 5. P. 556-563. doi: 10.1134/S0003683821050070. IF(WoS): 0.886, SJR: 0.25, Q4]
4. Садыкова В.С., **Гаврюшина И.А.**, Куварина А.Е., Маркелова Н.Н., Седых Н.Г., Георгиева М.Л., Барашкова А.С., Рогожин Е.А. Антимикробная активность липопептида Эмерициллипсина А, выделенного из *Emericellopsis alkalina* в отношении биопленкообразующих бактерий // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. Т. 56, № 3. С. 250-256. doi: 10.31857/S0555109920030101. IF(РИНЦ): 1,63 [Sadykova V.S., **Gavryushina I.A.**, Kuvarina A.E., Markelova N.N., Sedykh N.G., Georgieva M.L., Barashkova A.C., Rogozhin E.A. Antimicrobial Activity of the Lipopeptide Emericellipsin A Isolated from *Emericellopsis alkalina* against Biofilm-Forming Bacteria // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. V. 56, No 3. P. 292-297. doi: 10.1134/S0003683820030102. IF(WoS): 0.886, SJR: 0.25, Q4]
 5. Pigaleva M.A., Bulat M.V., Gromovykh T.I., **Gavryushina I.A.**, Lutsenko S.V., Gallyamov M.O., Novikov I.V., Buyanovskaya A.G., Kiselyova O.I. A new approach to purification of bacterial cellulose membranes: What happens to bacteria in supercritical media? // *The Journal of Supercritical Fluids*. 2019. V. 147. P. 59-69. doi:10.1016/j.supflu.2019.02.009. IF(WoS): 4.036, SJR: 1.055, Q1
- В прочих изданиях:**
1. Садыкова В.С., Георгиева М.Л., Рогожин Е.А., **Гаврюшина И.А.**, Кулько А.Б. Изыскание антимикробных пептидов грибов, активных в отношении возбудителей пневмомикозов с лекарственной устойчивостью // *Успехи медицинской микологии*. Москва. 2019. Т. 20. С. 523-525. IF РИНЦ: 0.285
 2. Рогожин Е.А., Садыкова В.С., **Гаврюшина И.А.**, Габрия Р.А., Куварина А.Е., Барашкова А.С., Георгиева М.Л. Биотехнология получения нерибосомальных пептидных антибиотиков грибного происхождения // *Актуальная биотехнология*. 2019. Т. 30, № 3. С. 430–431
- Патенты РФ:**
Садыкова В.С., Рогожин Е.А., Баранова А.А., Георгиева М.Л., Биланенко Е.Н., **Гаврюшина И.А.**, Васильченко А.С. Способ получения противогрибкового антибиотика Эмерициллипсина А // Патент RU 2710377, МПК С07К5/23, С12Р21/00 ФГБНУ «НИИНА им. Г.Ф. Гаузе» (RU). – № 2019104723, Заявл. (20.02.2019); Оpubл. (26.12.2019)