



УДК 577.112.6

ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЕ ДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА LKEKK

© 2025 г. Е. В. Наволоцкая*,#, Д. В. Зинченко*, А. А. Колобов**,
Ю. А. Золотарев***, А. Н. Мурашев*

* Филиал ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

** ГНЦ РФ Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов,
Россия, 197110 Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7

*** ФГБУН ГНЦ “Институт молекулярной генетики” РАН, Россия, 123182 Москва, пл. Акад. Курчатова, 2

Поступила в редакцию 02.10.2024 г.

После доработки 16.10.2024 г.

Принята к публикации 17.10.2024 г.

Исследована активность синтетического пептида LKEKK в мышиной модели туберкулеза, индуцированного штаммом *Mycobacterium bivis-bovinus* 8. Терапия пептидом (одна внутрибрюшинная инъекция в дозах 0,1, 1 и 10 мкг/кг в течение пяти дней) достоверно снижала индекс повреждения легких мышей по сравнению с животными контрольных групп (без лечения и лечение изониазидом). С помощью [³H]LKEKK показано, что высокая чувствительность перитонеальных макрофагов и спленоцитов инфицированных мышей к пептиду сохранялась по крайней мере в течение трех недель (K_d 18.6 и 16.7 нМ для мембран макрофагов и спленоцитов соответственно). Исследование продукции цитокинов спленоцитами инфицированных мышей показало, что на 24-й день после обработки пептидом (дозы 1 и 10 мкг/кг) секреция IL-2 восстанавливалась до уровня, наблюдаемого у неинфицированных животных. Продукция IFN-γ клетками селезенки инфицированных мышей после обработки пептидом также достоверно увеличивалась. Одновременно в спленоцитах снижалась продукция IL-4. Кроме того, лечение пептидом стимулировало фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, которая была снижена вследствие туберкулезной инфекции. Таким образом, синтетический пептид LKEKK повышал эффективность противотуберкулезной терапии, а также силу иммунного ответа. Пептид может быть использован в комплексной терапии туберкулеза.

Ключевые слова: белки, пептиды, рецепторы, цитокины, туберкулез

DOI: 10.31857/S0132342325020139, **EDN:** LBMFXT

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез – широко распространенное хроническое инфекционное заболевание человека и животных, которое вызывают различные виды микобактерий из группы *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*). Ежегодно туберкулез становится причиной более полутора миллионов смертей [1–3]. Специалисты отмечают, что за последние годы существенно возросла лекарственная устойчивость штаммов микобактерий. В настоящее

время все чаще наблюдается инфицирование пациентов штаммами, устойчивыми практически ко всем антибиотикам, что требует срочного поиска новых лекарственных препаратов и методов лечения [4].

Отличительная особенность микобактерии – сложность ее клеточной стенки. Эта структура состоит из плазматической мембраны, ядра клеточной стенки и внешней оболочки, помимо этого она включает множество сложных липидов, пептидогликанов и мицелевых кислот [5–8]. Мицелевые кислоты – длинноцепочечные разветвлен-

Сокращения: Con A – конканавалин A; ТМ – тимозин.

Автор для связи: (тел.: +7 (496) 773-66-68; эл. почта: navolotskaya@bibch.ru).

ные жирные кислоты с перекрестными сшивками, содержащие по 60–90 атомов углерода в молекуле, – это исключительный компонент клеточной стенки микобактерий; они делают поверхность бацилл воскообразной и сильно гидрофобной, обеспечивая тем самым защиту от гидрофильных антибиотиков, окислительного повреждения и иммунного ответа хозяина [9].

Несмотря на усилия мирового сообщества по искоренению туберкулеза, в период с 2021 по 2023 гг. от него умерло в общей сложности ~5 млн человек, фактически в этот период он был вторым по значимости инфекционным убийцей после COVID-19. С 2024 г. туберкулез, вероятно, снова станет основной причиной смертности в мире, тем более что во время пандемии COVID-19 все ресурсы здравоохранения были направлены на сдерживание SARS-CoV-2, а важные противотуберкулезные программы были проигнорированы. Кроме того, серьезной проблемой становится лекарственно-устойчивый туберкулез: его лечение сложное, длительное, дорогостоящее и часто требует применения токсичных и плохо переносимых препаратов [10]. В этой связи внимание специалистов все больше привлекают пептиды, применение которых обещает решить проблемы существующих схем лечения туберкулеза. По сравнению с уже существующими противотуберкулезными препаратами, пептиды имеют ряд преимуществ. Во-первых, они обладают широким спектром активности в отношении различных штаммов микобактерий туберкулеза, в том числе штаммов, устойчивых к лекарственным средствам, что делает их потенциальными кандидатами на лечение лекарственно-устойчивого туберкулеза. Во-вторых, пептиды действуют быстро, и это означает, что они могут оперативно убивать микробы, что сократит продолжительность лечения. В-третьих, пептиды имеют низкий риск развития лекарственной устойчивости, поскольку они одновременно воздействуют на несколько компонентов бактериальных клеток и клетки орга-

низма-хозяина. И наконец, они, как правило, хорошо переносятся организмом. Эти преимущества делают потенциальные противотуберкулезные пептидные препараты привлекательным вариантом для разработки новых схем лечения туберкулеза [4].

Несколько лет назад мы синтезировали пептид LKEKK, соответствующий последовательностям 16–20 тимозина- α_1 (TM- α_1) и 131–135 интерферона- α_2 (IFN- α_2) человека. Исследование активности пептида показало, что он способен оказывать противомикробное и противовоспалительное действие *in vitro* и *in vivo* [11–14].

Цель настоящей работы – изучить действие пептида LKEKK на модели туберкулеза у мышей, инфицированных *Mycobacterium bovis-bovinus* 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные характеристики пептидов LKEKK и KKEKL приведены в табл. 1. Реакцией высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена был получен меченный тритием пептид LKEKK ($[^3\text{H}]$ LKEKK, 2 мКи, уд. активность 42 Ки/моль). Время удерживания $[^3\text{H}]$ LKEKK и немеченого LKEKK на колонке Kromasil C18 (условия хроматографии приведены в разделе “Экспериментальная часть”) совпадало; отношения экстинкций при 220 и 280 нм для меченого и немеченого пептида также совпадали, что свидетельствует о сохранении химического строения LKEKK при замещении водорода на тритий.

Мы получили характеристики связывания $[^3\text{H}]$ LKEKK с плазматическими мембранами перитонеальных макрофагов и спленоцитов интактных мышей и сравнили их с соответствующими показателями мышей, инфицированных *M. bovis-bovinus* 8. Эксперименты показали, что в выбранных нами условиях (см. раздел “Экспериментальная часть”) $[^3\text{H}]$ LKEKK с высоким сродством связывается с мембранами из обоих типов клеток неинфицированных животных. Величину специфического связывания $[^3\text{H}]$ LKEKK

Таблица 1. Основные характеристики синтезированных пептидов

Пептид	Чистота, %	Данные аминокислотного анализа	<i>M</i> , Да
LKEKK	>98	Glu 1.09 (1), Leu 1.00 (1), Lys 3.27 (3)	645.2 (расчетное значение – 644.87)
KKEKL	>97	Glu 1.12 (1), Leu 1.03 (1), Lys 3.32 (3)	648.6 (644.87)

определяли по разности между его общим и неспецифическим связыванием. Величину неспецифического связывания $[^3\text{H}]$ LKEKK оценивали в присутствии 10 мкМ немеченого LKEKK. На рис. 1 показана зависимость величины общего (график 1), специфического (2) и неспецифического (3) связывания пептида $[^3\text{H}]$ LKEKK с плазматическими мембранами перитонеальных макрофагов (рис. 1а) и спленоцитов (рис. 1б) мыши при 4°C от времени инкубации. Видно, что в обоих случаях динамическое равновесие в системе “[^3H]LKEKK – участок специфического связывания (рецептор)” устанавливалось примерно через 1 ч и сохранялось по крайней мере 2 ч. Поэтому для определения величины равновесной константы диссоциации (K_d) реакцию связывания проводили в течение 1 ч. В этих усло-

виях неспецифическое связывание $[^3\text{H}]$ LKEKK с мембранными макрофагов и тимоцитов составляло, соответственно, 7.2 ± 0.6 и $4.8 \pm 0.4\%$ от величины его общего связывания.

Анализ специфического связывания $[^3\text{H}]$ -LKEKK с плазматическими мембранами перитонеальных макрофагов (рис. 2а, график 1) и спленоцитов (рис. 2а, график 2) неинфицированных мышей в координатах Скэтчарда показал, что на поверхности этих клеток имеется один класс участков связывания (рецепторов) пептида – графики представляют собой прямую линию. Величина K_d , равная 2.1 ± 0.1 нМ (мембранные макрофаги) и 3.1 ± 0.2 нМ (мембранные спленоциты), свидетельствует о высокой аффинности связывания.

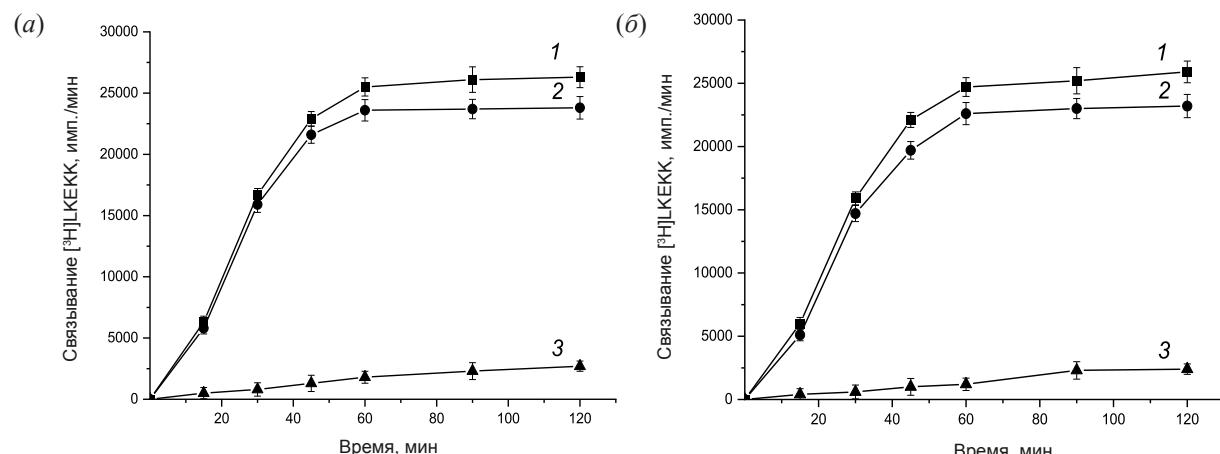


Рис. 1. Зависимость общего (1), специфического (2) и неспецифического (3) связывания пептида $[^3\text{H}]$ LKEKK с мембранными перитонеальных макрофагов (а) и спленоцитов (б) мыши от времени инкубации. Величину специфического связывания меченого пептида определяли как разность между его общим и неспецифическим связыванием.

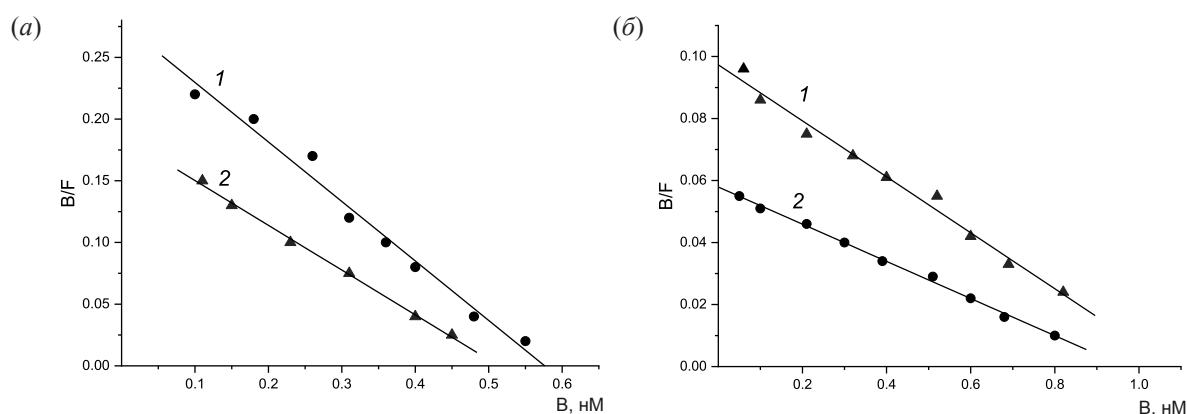


Рис. 2. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания пептида $[^3\text{H}]$ LKEKK с плазматическими мембранными перитонеальных макрофагов (1) и спленоцитов (2) интактных мышей (а) и мышей, инфицированных *M. bovis-bovinus* 8 (б). В и F – молярные концентрации связанного и свободного меченого пептида $[^3\text{H}]$ LKEKK соответственно.

Для характеристики специфичности связывания в качестве потенциальных конкурентов [³H]LKEKK были протестиированы немеченные пептиды LKEKK и KKEKL. Оказалось, что только пептид LKEKK способен ингибировать специфическое связывание [³H]LKEKK с мембранами макрофагов и спленоцитов ($K_i = 2.5 \pm 0.2$ нМ и 2.9 ± 0.3 нМ соответственно), пептид с инвертированной последовательностью KKEKL был неактивен. Таким образом, связывание [³H]LKEKK с мембранами перитонеальных макрофагов и спленоцитов интактных мышей характеризуется высокой специфичностью.

На рис. 2б приведены графики Скэтчарда, характеризующие специфическое связывание пептида [³H]LKEKK с мембранами перитонеальных макрофагов (1) и спленоцитов (2) мышей, инфицированных *M. bovis-bovinus* 8. Сравнение графиков на рис. 2а и 2б, а также соответствующих значений K_d позволяет заключить, что инфицирование приводило к значительному снижению сродства [³H]LKEKK к рецептору на мембранах обоих типов клеток; тем не менее значения K_d (для мембран макрофагов – 18.6 ± 0.2 нМ, для мембран спленоцитов – 16.7 ± 0.3 нМ на 21-й день с момента инфицирования) показывают, что оно оставалось высоким, и, следовательно, чувствительность клеток к действию пептида сохранялась по крайней мере в течение трех недель после заражения.

Исследование действия пептида LKEKK *in vivo* при экспериментальном туберкулезе у мышей показало, что его применение тормозило развитие заболевания. Через 4 дня после окончания пятидневной терапии (28-й день с момента заражения) у мышей, получавших пептид в дозах 0.1, 1.0 и 10 мкг/кг, наблюдалось значительное снижение индекса поражения легких: 2.2 ± 0.3 , 1.8 ± 0.2 и 1.4 ± 0.3 соответственно ($p < 0.05$). В то же время у мышей после изониазид-терапии этот показатель составлял 2.6 ± 0.2 ($p < 0.05$), а у инфицированных животных без терапии – 3.8 ± 0.4 ($p < 0.05$).

Снижение продукции IL-2 в Con A-стимулированных клетках селезенки наблюдалось у инфицированных животных с обширным поражением легких: 12.5 ± 1.6 ед./мл по сравнению с 74.3 ± 6.5 ед./мл у неинфицированных животных ($p < 0.05$). Лечение пептидом LKEKK (0.1 и 1.0 мкг/кг) сопровождалось увеличением продук-

ции цитокина уже через 4 дня после завершения терапии: соответственно, 39.2 ± 2.8 и 41.6 ± 5.6 ед./мл в сравнении с 25.2 ± 2.4 ед./мл после изониазид-терапии ($p < 0.05$). На 24-й день после окончания лечения пептидом продукция IL-2 была восстановлена до уровня, наблюдаемого у неинфицированных животных.

Инфицирование приводило к резкому снижению продукции IFN- γ Con A-стимулированными клетками селезенки: 10.3 ± 1.4 в сравнении с 22.5 ± 2.4 ед./мл у неинфицированных мышей ($p < 0.05$). Через 4 дня после завершения терапии пептидом во всех использованных дозах продукция цитокина не отличалась от таковой у животных, получавших только изониазид-терапию. Однако уже через 10 дней наблюдалось значительное повышение его уровня у животных, получавших пептид в дозах 1 и 10 мкг/кг: 15.6 ± 2.0 и 18.9 ± 1.5 ед./мл по сравнению с 12.5 ± 1.7 ед./мл при лечении только изониазидом ($p < 0.05$).

Напротив, продукция IL-4 в Con A-стимулированных клетках селезенки инфицированных мышей была резко повышена: 20.2 ± 2.6 против 11.2 ± 1.6 ед./мл у неинфицированных животных ($p < 0.05$). Лечение изониазидом оказалось неэффективным: 19.0 ± 2.2 ед./мл, в то время как пептид в дозах 1 и 10 мкг/мл уже через 4 дня после окончания лечения значительно снижал уровень цитокина: 15.7 ± 2.1 и 14.3 ± 2.0 ед./мл. Следует отметить, что другие авторы также отмечали повышенный уровень IL-4 и значительное снижение уровней IL-2 и IFN- γ у животных и людей с туберкулезом [15–17].

За последние несколько лет достигнут значительный прогресс в понимании иммунопатогенеза туберкулеза: стало понятно, что ключевую роль в прогрессировании и тяжести заболевания играет дисбаланс в активности Т-хелперных Th1- и Th2-клеток, в результате которого происходит снижение продукции IL-2, IL-12, IFN- γ и нарушение экспрессии их рецепторов [18–21]. Адекватный иммунный ответ на *Mycobacterium* характеризуется большей активностью Th1-клеток и продукцией IFN- γ и IL-2, в то время как низкая устойчивость к инфекции – это результат стимуляции Th2-клеток и продукции IL-4 [22–24]. Более того, установлено, что реактивация латентного туберкулеза сопровождается повышенной продукцией Th2-цитокинов и снижением активности Th1-клеток [23, 25].

Имеются данные, свидетельствующие о наличии у Th1-цитокинов противотуберкулезной активности. Так, показано, что терапия с использованием рекомбинантного IL-2 (rIL-2) приводит к нормализации экспрессии рецептора IL-2, пролиферации лимфоцитов и, частично, продукции IFN- γ в культурах лимфоцитов, полученных от пациентов с активным туберкулезом [25–27]. Терапия с применением IFN- γ приводила к уменьшению количества бактериальных клеток в культурах органов мышей, инфицированных *M. avium* и *M. tuberculosis* [28, 29]. У пациентов с тяжелой формой туберкулеза, инфицированных *M. tuberculosis*, терапия IFN- γ приводила к улучшению клинической картины и повышению функциональной активности лимфоцитов [30]. Более того, положительное влияние IFN- γ на клиренс *M. tuberculosis* было обнаружено у пациентов с множественной лекарственной устойчивостью [31]. И наконец, IL-12 оказался эффективным вспомогательным средством при лечении пациентов, страдающих прогрессирующим клиническим туберкулезом [32, 33].

Мы установили, что у мышей с обширным поражением легких наблюдается снижение активности перитонеальных макрофагов, о чем свидетельствует слабое переваривание дрожжевых клеток. Средняя фагоцитарная активность через 28 дней после заражения составила 4.6% по сравнению с 64.2% у неинфицированных мышей ($p < 0.01$). Терапия пептидом в дозах 1.0 и 10 мкг/кг приводила к значительному повышению этого показателя – до 29.8 и 38.5% соответственно; лечение изониазидом также сопровождалось возрастанием фагоцитарной активности – в среднем до 19.4% ($p < 0.05$).

Следует отметить, что фагоцитоз дрожжей – чувствительный маркер активности макрофагов при экспериментальном туберкулезе. Полагают, что ингибирование функций макрофагов – результат действия не только *Mycobacterium*, но и противотуберкулезных препаратов, в частности изониазида [34–36]. Полученные нами результаты показывают, что лечение пептидом LKEKK стимулирует функции макрофагов значительно активнее, чем изониазид-терапия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали *Mycobacterium bivisbovinus* 8 (коллекция ВНИИ экспериментальной

ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Москва), IL-2, IL-4, IFN- γ , TM- α_1 (Immunodiagnostik AG, Германия); фенилметилсульфонилфторид (PMSF), Tris (Fluka, США); фетальную сыворотку теленка, окись алюминия (Al_2O_3) (Sigma, США); L-глутамин, N-(2-гидроксиэтил)-пиперазин-N'-2-этилсульфоновую кислоту (HEPES), Rh/ Al_2O_3 (Flow, США); сахарозу, BCA, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), азид натрия (NaN_3) (Serva, Германия); N-метилпирролидон, дизопропилкарбодиимид, 1-гидроксибензотриазол, тиоанизол (Merck, Германия); цинтиллятор Unisolv 100 (Amersham, Англия). Остальные реактивы имели квалификацию “ос. ч.”. Для культивирования клеток использовали среду 199 (ФГБНУ “Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова”, Москва) и RPMI-1640 (Serva, ФРГ). Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Mono-Q (Millipore, США).

Пептиды LKEKK и KKEKL синтезировали на автоматических синтезаторах (модель 430A и Vega Coupler, модель C250; Applied Biosystems, США) с использованием Boc/Bzl-тактики наращивания пептидной цепи и очищали препартивной обращенно-фазовой хроматографией (хроматограф Gilson, Франция), колонка Waters SymmetryPrep C18 (19 × 300 мм) (Malva, Греция). Синтезированные пептиды были охарактеризованы данными аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ (хроматограф Gilson, Франция; колонка XTerra RP18, Malva, Греция), аминокислотного анализа (гидролиз 6 М HCl, 24 ч, 110°C; аминокислотный анализатор 4151 Alpha Plus, LKB, Швеция) и масс-спектрального анализа (масс-спектрометр Finnigan, США).

Для получения [3H]LKEKK использовали реакцию высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) [37]. К раствору пептида (1.0 мг в 1 мл воды) добавляли 20 мг окиси алюминия и упаривали на роторном испарителе при 20°C. Окись алюминия с нанесенным пептидом смешивали с 10 мг катализатора (5% Rh/ Al_2O_3). Полученную твердую смесь помещали в ампулу объемом 10 мл на 20 мин. Ампулу вакуумировали, заполняли газообразным тритием до давления 250 мм рт. ст., нагревали до 170°C и выдерживали при этой температуре в течение 20 мин. Затем ампулу

охлаждали, вакуумировали, продували водородом и повторно вакуумировали. Меченный пептид экстрагировали из твердой реакционной смеси двумя порциями по 3 мл 50%-ного водного этанола, полученный раствор объединяли и упаривали. Для удаления лабильного трития процедуру повторяли дважды. Очистку меченого пептида проводили методом ВЭЖХ со спектрофотометром Beckman Beckman DU 800 (США) при длинах волн 220 и 280 нм последовательно на колонках Kromasil C18 (10×250 мм) и MN C8 (8×250 мм) при 20°C в градиенте концентрации водного раствора ацетонитрила в присутствии 0.1%-ной трифтормукусной кислоты. Количество включенного трития в пептид рассчитывали с использованием жидкостного сцинтилляционного счета.

Заражение мышей линии СВА (самцы, возраст 8–10 недель, вес 20–25 г), полученных из Питомника животных Рапполово (Ленинградская область, Россия), проводили путем введения суспензии *M. bovis-bovinus* 8 (0.1 мг в 0.2 мл физиологического раствора, ~100 бактериальных телец, подкожно). Начиная с 7-го дня после инокуляции, каждые два дня умершвляли двух мышей и исследовали легкие. При обнаружении единичных субмилиарных очагов (<1 мм) в легких у забитой мыши (12-й день после инокуляции) всех остальных животных отбирали в одну из групп и проводили терапию изониазидом (ежедневно в течение 5 дней в дозе 5 мг/кг внутрибрюшинно). Лечение пептидом LKEKK, состоящее из одной ежедневной внутрибрюшинной инъекции в течение пяти дней (дозы 0.1, 1.0 и 10 мкг/кг), начиналось на 20-й день после инокуляции (когда на аутопсии необработанных мышей были обнаружены множественные субмилиарные очаги). Контрольные группы включали мышей без терапии (контроль инфицирования) и мышей, получавших только терапию изониазидом (контроль терапии). Тяжесть экспериментального туберкулеза оценивали путем визуального осмотра и рассчитывали как “индекс поражения легких”. Каждая экспериментальная и контрольная группа состояла из 15 животных.

Использовали следующие критерии: одиночные субмилиарные очаги оценивались в 0.5 ед., множественные субмилиарные очаги (<20) – в 1.0 ед., множественные субмилиарные очаги (>20) – в 1.5 ед., одиночные миллиарные очаги –

в 1.75 ед., множественные ассоциированные субмилиарные и миллиарные очаги (<10) – 2.25 ед., множественные ассоциированные миллиарные очаги – 2.75 ед., мелкие казеозные очаги – 3.0 ед., множественные казеозные очаги – 4.0 ед., поражение всего легкого – 5.0 ед. При мацерации легких серозной жидкостью показатель, в зависимости от степени поражения, повышался на 0.25–1.0 ед. Вес легких и селезенки также измеряли и сравнивали с общим весом мыши, чтобы получить индекс веса органа.

Спленоциты и макрофаги брюшной полости мышей получали и культивировали согласно предложенным нами ранее методикам [38, 39]. Жизнеспособность клеток по тесту с акридиновым оранжевым составляла 93–95%. Мембранные из клеток селезенки и макрофагов получали по методу [40]. Концентрацию белка определяли с помощью метода Лоури, используя в качестве стандарта БСА [41].

Реакцию связывания [^{3}H]LKEKK с мембранными, выделенными из спленоцитов и макрофагов, проводили в Трис-НCl-буфере (pH 7.4), по следующей схеме: в стеклянные пробирки вносили 100 мкл меченого пептида (10^{-10} – 10^{-7} М, три параллельные пробы для каждой концентрации), 100 мкл буфера (общее связывание) или 100 мкл 10^{-3} М раствора немеченого пептида в буфере (неспецифическое связывание) и 800 мкл свежеприготовленной суспензии мембран (2 мг белка). Пробирки инкубировали при 4°C в течение 1 ч. По окончании инкубации реакционную смесь фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/C (Whatman, Англия). Фильтры трижды промывали 5 мл ледяного буферного раствора. Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS 5801 (Beckman, США). Величину специфического связывания [^{3}H]LKEKK с мембранами определяли по разности между его общим и неспецифическим связыванием, а величину его неспецифического связывания – в присутствии 100 мкМ немеченого LKEKK (1000-кратный избыток по отношению к самой большой концентрации меченого пептида – 100 нМ) и выражали в молях на 1 мг белка. Для определения равновесной K_d строили график зависимости отношения молярных концентраций связанного (B) и свободного (F) [^{3}H]LKEKK от молярной концентрации связанной ^{125}I -меченной СТ-В (B) [42].

Для оценки способности ТМ- α_1 , IFN- α_2 , пептидов LKEKK и KKEKL ингибировать специфическое связывание [^3H]LKEKK с мембранами спленоцитов и макрофагов, суспензию мембран (2 мг белка) инкубировали с меченным пептидом (5 нМ) и одним из потенциальных конкурентов (диапазон концентраций 100 нМ–10 мкМ, три повтора для каждой концентрации), как описано выше. Константу ингибирования (K_i) определяли по формуле:

$$K_i = IC_{50}/(1 + [L]/K_d) \quad [43],$$

где [L] – молярная концентрация [^3H]LKEKK; K_d – равновесная константа диссоциации комплекса [^3H]LKEKK–рецептор; IC₅₀ – концентрация немеченого лиганда, вызывающая 50%-ное ингибирование специфического связывания меченого пептида. Величину IC₅₀ определяли графически на основании кривой ингибирования. Значение K_d измеряли предварительно, как описано выше.

Для определения продукции спленоцитами цитокинов, 100 мкл суспензии клеток (10^7 кл./мл RPMI 1640, содержащей 10% FCS, апратинин, лейпептин, пепстатин А – 10 мкг/мл каждого) добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета для культуры клеток. В контрольные лунки добавляли только RPMI 1640. Выработку цитокинов индуцировали конканавалином А (Con A, конечная концентрация 2.5 мкг/мл). Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После инкубации из каждой лунки отбирали по 150 мкл супернатанта. Супернатанты хранили при –70°C. Концентрацию цитокинов в супернатантах определяли с помощью ELISA Kits (BD Biosciences, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Активность перитонеальных макрофагов оценивали по их способности к фагоцитозу *in vitro*. Клетки высевали в концентрации 10^6 клеток на чашку Петри и добавляли среду, содержащую 10^7 клеток *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D (коллекция Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино, Московская область), опсонизированных мышиной сывороткой. Под микроскопом (Биомед 4 LED, Биомед, Россия) при увеличении 1350× определяли фагоцитарную активность (процент макрофагов, участвующих в фагоцитозе) и переваривающую способность (количество кле-

ток, переваренных макрофагами в течение 1.5 ч инкубации).

Достоверность различий между контролем и опытом оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента, $p < 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено действие пептида LKEKK на модели туберкулеза у мышей, инфицированных *Mycobacterium bovis-bovinus* 8. Установлено, что синтетический пептид LKEKK обладает значительной противотуберкулезной активностью и может быть использован в комплексной терапии этого заболевания.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.В. Наволоцкая – эксперименты на спленоцитах и макрофагах, написание статьи; Д.В. Зинченко – рецепторные исследования; А.А. Колобов – исследование пептида LKEKK на модели туберкулеза; Ю.А. Золотарев – получение меченого пептида LKEKK; А.Н. Мурашев – координация исследований, анализ полученных результатов, работа над статьей.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Churchyard G., Kim P., Shah N.S., Rustomjee R., Gandhi N., Mathema B., Dowdy D., Kasmar A., Cardenas V. // J. Infect. Dis. 2017. V. 216. P. S629–S635. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix362>
- Furin J., Cox H., Pai M. // Lancet. 2019. V. 393. P. 1642–1656. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30308-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30308-3)
- Natarajan A., Beena P.M., Devnikar A.V., Mali S. // Indian. J. Tuberc. 2020. V. 67. P. 295–311. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2020.02.005>

4. *Jacobo-Delgado Y.M., Rodríguez-Carlos A., Serrano C.J., Rivas-Santiago B.* // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. P. 1194923.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1194923>
5. *Chiaradia L., Lefebvre C., Parra J., Marcoux J., Burlet-Schiltz O., Etienne G., Tropis M., Daffé M.* // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 12807.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12718-4>
6. *Stokas H., Rhodes H.L., Purdy G.E.* // *Tuberculosis.* 2020. V. 125. P. 102007.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102007>
7. *Grzegorzewicz A.E., de Sousa-d'Auria C., McNeil M.R., Huc-Claustre E., Jones V., Petit C., Angala S.K., Zemanová J., Wang Q., Belardinelli J.M., Gao Q., Ishizaki Y., Mikušová K., Brennan P.J., Ronning D.R., Chami M., Houssin C., Jackson M.* // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 18867–18879.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.739227>
8. *Singh P., Rameshwaram N.R., Ghosh S., Mukhopadhyay S.* // *Future Microbiol.* 2018. V. 13. P. 689–710.
<https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0135>
9. *Singh G., Kumar A., Maan P., Kaur J.* // *Curr. Drug Targets.* 2017. V. 18. P. 1904–1918.
<https://doi.org/10.2174/1389450118666170711150034>
10. *Khadela A., Chavda V.P., Postwala H., Shah Y., Mistry P., Apostolopoulos V.* // *Vaccines (Basel).* 2022. V. 10. P. 1740.
<https://doi.org/10.3390/vaccines10101740>
11. *Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A., Lipkin V.M., Murashev A.N.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 122–128.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019020092>
12. *Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Zav'yalov V.P., Murashev A.N.* // *J. Clin. Exp. Immunol.* 2021. V. 6. P. 356–361.
<https://doi.org/doi.org/10.33140/JCEI.06.05.02>
13. *Navolotskaya E.V., Zinchenko D.V., Murashev A.N.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 35–40.
<https://doi.org/10.1134/S106816202301020X>
14. *Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Murashev A.N.* // *J. Clin. Exp. Immunol.* 2023. V. 8. P. 590–595.
<https://doi.org/10.33140/JCEI.08.03.01>
15. *Ellner J.J.* // *J. Lab. Clin. Med.* 1997. V. 130. P. 469–475.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2143\(97\)90123-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2143(97)90123-2)
16. *Estrada García I., Hernández Pando R., Ivanyi J.* // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. P. 684200.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.684200>
17. *Torres-Juarez F., Trejo-Martínez L.A., Layseca-Espinoza E., Leon-Contreras J.C., Enciso-Moreno J.A., Hernandez-Pando R., Rivas-Santiago B.* // *Microb. Pathog.* 2021. V. 153. P. 104768.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104768>
18. *Kaufmann S.H., Ladel C.H., Flesch I.E.* // *Ciba Found Symp.* 1995. V. 195. P. 123–132.
<https://doi.org/10.1002/9780470514849.ch9>
19. *Mustafa T., Phyu S., Nilsen R., Jonsson R., Bjune G.* // *Scand. J. Immunol.* 2000. V. 51. P. 548–556.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2000.00721.x>
20. *Vasiliu A., Martinez L., Gupta R.K., Hamada Y., Ness T., Kay A., Bonnet M., Sester M., Kaufmann S.H.E., Lange C., Mandalakas A.M.* // *Clin. Microbiol. Infect.* 2024. V. 30. P. 1123–1130.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.10.023>
21. *Lange C., Aaby P., Behr M.A., Donald P.R., Kaufmann S.H.E., Netea M.G., Mandalakas A.M.* // *Lancet Infect. Dis.* 2022. V. 22. P. e2–e12.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00403-5)
22. *Baliko Z., Szereeday L., Szekeres-Bartho J.* // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1998. V. 22. P. 199–204.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1998.tb01207.x>
23. *Dieli F., Singh M., Spallek R., Romano A., Titone L., Sireci G., Friscia G., Di Sano C., Santini D., Salerno A., Ivanyi J.* // *Scand. J. Immunol.* 2000. V. 52. P. 96–102.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2000.00744.x>
24. *Tamburini B., Badami G.D., Azgomi M.S., Dieli F., La Manna M.P., Caccamo N.* // *Tuberculosis (Edinb).* 2021. V. 130. P. 102–109.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102109>
25. *Shiratsuchi H., Okuda Y., Tsuyuguchi I.* // *Infect. Immun.* 1987. V. 55. P. 2126–2131.
<https://doi.org/10.1128/iai.55.9.2126-2131>
26. *McDyer J.F., Hackley M.N., Walsh T.E., Cook J.L., Seder R.A.* // *J. Immunol.* 1997. V. 158. P. 492–500.
27. *McDyer J.F., Li Z., John S., Yu X., Wu C.Y., Ragheb J.A.* // *J. Immunol.* 2002. V. 169. P. 2736–2746.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.5.2736>

28. Bermudez L.E., Stevens P., Kolonoski P., Wu M., Young L.S. // *J. Immunol.* 1989. V. 143. P. 2996–3000.
29. Denis M. // *Cell. Immunol.* 1991. V. 132. P. 150–157. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(91\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0008-8749(91)90014-3)
30. Suárez-Méndez R., García-García I., Fernández-Olivera N., Valdés-Quintana M., Milanés-Virelles M.T., Carbonell D., Machado-Molina D., Valenzuela-Silva C.M., López-Saura P.A. // *BMC Infect. Dis.* 2004. V. 4. P. 44. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-4-44>
31. Giosue S., Casarini M., Ameglio F., Zangrilli P., Palla M., Altieri A.M., Bisetti A. // *Eur. Cytokine Netw.* 2000. V. 11. P. 99–104.
32. Kobayashi K., Kasama T. // *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi*. 2000. V. 69. P. 77–82. <https://doi.org/10.5025/hansen.69.77>
33. Greinert U., Ernst M., Schlaak M., Entzian P. // *Eur. Respir. J.* 2001. V. 17. P. 1049–1051. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.17510490>
34. Phyu S., Tadesse A., Mustafa T., Tadesse S., Jonsson R., Bjune G. // *Scand. J. Immunol.* 2000. V. 51. P. 147–154. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2000.00662.x>
35. Beltan E., Horgen L., Rastogi N. // *Microb. Pathog.* 2000. V. 28. P. 313–318. <https://doi.org/10.1006/mpat.1999.0345>
36. Ragno S., Romano M., Howell S., Pappin D.J., Jenner P.J., Colston M.J. // *Immunol.* 2001. V. 104. P. 99–108. <https://doi.org/10.1046/j.0019-2805.2001.01274.x>
37. Zolotarev Y.A., Dadayan A.K., Bocharov E.V., Borisov Y.A., Vaskovsky B.V., Dorokhova E.M., Myasoe-dov N.F. // *Amino Acids*. 2003. V. 24. P. 325–333. <https://doi.org/10.1007/s00726-002-0404-7>
38. Sadovnikov V.B., Navolotskaya E.V. // *J. Pept. Sci.* 2014. V. 20. P. 212–215. <https://doi.org/10.1002/psc.2603>
39. Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Navolotskaya E.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2016. V. 42. P. 269–271. <https://doi.org/10.1134/S1068162016030122>
40. Dal Farra C., Zsurger N., Vincent J.-P., Cupo A. // *Peptides*. 2000. V. 21. P. 577–587. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(00\)00182-0](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(00)00182-0)
41. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr O.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
42. Pennock B.E. // *Anal. Biochem.* 1973. V. 56. P. 306–309. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90195-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90195-4)
43. Cheng Y.C., Prusoff W. // *Biochem. Pharmacol.* 1973. V. 22. P. 3099–3108. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2)

Antituberculosis Action of the Synthetic Peptide LKEKK

E. V. Navolotskayay*, D. V. Zinchenko*, A. A. Kolobov**,
Yu. A. Zolotarev***, and A. N. Murashev*

Phone: +7 (496) 773-66-68; e-mail: navolotskaya@bibch.ru

* Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

** State Research Center for Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA of the Russian Federation,
ul. Pudozhskaya 7, St. Petersburg 197110 Russia

*** Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Science,
pl. akad. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

In this work, the activity of the synthetic peptide LKEKK was investigated in a mouse model of tuberculosis induced by *Mycobacterium bovis-bovinus* 8 strain. Therapy with peptide at doses of 0.01, 0.1 and 1 µg/kg (5 daily injections) significantly reduced the lung injury index of mice compared to animals in the control groups (no treatment and isoniazid treatment). Using [³H]LKEKK, it was shown that the high sensitivity of peritoneal macrophages and splenocytes of infected mice to the peptide was maintained for at least three weeks (K_d 18.6 and 16.7 nM for macrophage and splenocyte membranes, respectively). A study of cytokine production by splenocytes of infected mice showed that on the 24th day after treatment with the peptide (doses of 1 and 10 µg/kg) the secretion of IL-2 was restored to the level observed in uninfected animals. IFN-γ production by spleen cells of infected mice also significantly increased upon peptide treatment. At the same time, IL-4 production decreased in splenocytes. In addition, the peptide treatment stimulated the phagocytic activity of peritoneal macrophages, which was reduced due to tuberculosis infection. Thus, the synthetic peptide LKEKK increased the effectiveness of anti-tuberculosis therapy, as well as the strength of the immune response. The peptide can be used in complex therapy of tuberculosis.

Keywords: proteins, peptides, receptors, cytokines, tuberculosis