

Изучение первичных фармакодинамических эффектов и возможного цитотоксического действия синтетического пептидомиметика КАМП-1

Любушкина Е.М.*, Бондарева Е.А., Солдатова М.С., Мадонов П.Г.

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

* lizaveta.lyubushkina@list.ru

Ключевые слова: антибиотикорезистентность; КАМП-1; МИК; острая токсичность

Мотивация и цель: Антибактериальная резистентность представляет собой угрозу для общественного здравоохранения, по подсчетам команды под руководством О'Neil к 2050 году смертность достигнет до 10 млн человек в год, а финансовые потери приведут к убыткам более 100 трлн долларов [1]. Современные технологии антибактериальной терапии реализуется за счет несколько групп антибиотиков, к большинству из которых уже сформировалась резистентность. Поиск новых антибактериальных средств, к которым еще не сформировалась резистентность, является эффективным решением данной проблемы. На сегодняшний день синтетические антимикробные пептидомиметики представляют интерес из-за отсутствия специфической микробной мишени, а, следовательно, ниже риск развития резистентности к ним. Целью работы было определить параметры антибактериальной и противогрибковой активностей, а также детальное изучение острой токсичности инновационного пептидомиметика (КАМП-1).

Методы и алгоритмы: КАМП-1 состоит из остатка аргинина, триптофана модифицированного трет-бутильными группами, и еще одного аргинина с фенэтиламидной группой. Молекулярная масса пептида составляет 788 Дальтон. Для тестирования противомикробной активности использовались тест-культуры аттестационных штаммов бактерий и грибов. Применялся метод серийных разведений КАМП-1 в жидкой питательной среде. В кратный ряд разведений вещества добавляли взвесь инокулюма тестируемой культуры. После инкубации делали высеив на плотную питательную среду с последующим подсчетом КОЕ. Наименьшая доза вещества, при которой наблюдалось полное подавление роста культуры бактерий, считалась минимальной ингибирующей концентрацией (МИК). В каждой исследуемой группе по результатам повторных опытов рассчитывали средний показатель и стандартную ошибку. Полученные результаты обрабатывались с использованием пакета статистических программ Biostatistics. В исследованиях *in vitro* МИК изучаемого вещества для тест-штаммов не превышал 100 мг/л, что согласно методическим рекомендациям по доклиническим исследованиям лекарственных веществ, характеризует его перспективным противомикробным средством [2]. В дальнейшем определялись параметры острой токсичности после однократного введения в ретроорбитальный синус и ежедневного наблюдения за животными в течение 14 дней. Использовались беспородные половозрелые мыши обоих полов. Первая группа мышей была получена и выращена в конвенциональных условиях

($n = 40$), а вторая группа мышей – в условиях SPF-вивария ($n = 48$). Главной отличительной особенностью являлось наличие микробиома у конвенциональных мышей с целью изучения различий в результатах между нестерильными и стерильными испытуемыми, содержащиеся в условиях SPF-вивария. В первую и вторую группы были включены мыши линии CD-1 обоих полов с внешними хорошими показателями экстерьера и весом в диапазоне от 25–35 г. Животные содержались в стандартных условиях ухода со свободным доступом к пище и воде. Для изучения острой токсичности исследуемой субстанции методом пробит-анализа по В.Б. Прозоровскому высчитывались летальные дозы LD_{10} , LD_{50} , LD_{90} при помощи программы StatPlus. Раствор КАМП-1 был изготовлен в разных концентрациях от 7,0–10 мг/кг и вводили животным из расчета 1 мкл на 1 г веса. Павшим животным проводили некроскопическое исследование, а по прошествии 14 дней выжившие животные подвергались эвтаназии при помощи закиси углерода и далее осуществлялось макроскопическое исследование внутренних органов.

Результаты: Полученные данные демонстрируют, что КАМП-1 обладает антимикробной и противогрибковой активностью, что отображено в табл. 1. МИК КАМП-1 меньше допустимого предела в 100 мг/л (100 мкг/мл) на изученных аттестованных тест-культурах: *S. aureus*, *B. cereus*, *Corynebacterium hoffmani* K22, *E. coli* более чем в 14 раз; для *P. aeruginosa*, *C. tropicalis* PY23, *C. krusei* PY22, *C. albicans* NCTC 885-653 примерно в 2 раза; для *C. glabrata* KY22, *C. parapsilosis* KY23 в 1.3 раза. Следовательно, КАМП-1 является перспективной фармацевтической субстанцией антибактериального и противогрибкового действия.

Таблица 1. Минимально ингибирующие концентрации КАМП-1 на тест-культурах

Инокулом 10^3	МИК, мкг/мл
<i>S. aureus</i>	6.67 ± 1.67
<i>B. cereus</i>	6.67 ± 1.67
<i>E. coli</i>	8.33 ± 1.67
<i>P. aeruginosa</i>	60.0 ± 20.82
<i>Corynebacterium hoffmani</i> K22	5.56 ± 0.63
<i>C. glabrata</i> KY22	80.0 ± 12.08
<i>C. tropicalis</i> PY23	40.0 ± 4.08
<i>C. krusei</i> PY22	40.0 ± 3.34
<i>C. parapsilosis</i> KY23	80.0 ± 10.22
<i>C. albicans</i> NCTC 885-653	40.0 ± 5.58

При использовании концентрации 7.0 мг/кг не регистрировалась гибель животных. Токсический эффект исследуемого вещества наблюдался в диапазоне доз от 7.5 до 10 мг/кг. В среднем смерть животного наступала в течение первой минуты после введения. Результаты по количеству павших и выживших животных в исследуемых группах представлено в табл. 2.

В концентрациях от 7.5 до 10 мг/кг токсический эффект исследуемой субстанции у каждого животного проявлялся схожей симптоматикой: замедление реакции, учащенное дыхание, отсутствие реакции на звуковые раздражители, отказ от корма и еды, клонические судороги. В данном диапазоне доз у некоторых животных наблюдалось восстановление витальных функций. При воздействии КАМП-1 не было зафиксировано различий в симптомах между самками и

самцами. Результаты по выявленным летальным дозам исследуемой субстанции представлены в табл. 3.

Таблица 2. Результаты исследования мышей после внутривенного введения КАМП-1

Доза, мг/кг	Конвенциональные мыши		Мыши SPF-статуса	
	выжившие	павшие	выжившие	павшие
7.0	5	0	6	0
7.5	5	0	5	1
8.0	4	1	5	1
8.5	4	1	4	2
9.0	3	2	3	3
9.5	2	3	2	4
10.0	0	5	0	6

Таблица 3. Параметры острой токсичности после однократного внутривенного введения КАМП-1 у мышей

Группа животных	LD ₁₀ , мг/кг	LD ₅₀ , мг/кг	LD ₉₀ , мг/кг
Конвенциональные мыши	7.86	9.09	10.32
Мыши SPF-статуса	7.48	8.88	10.28

При вскрытии не были выявлены макроскопические изменения внутренних органов (легкие, сердце, печень, головной мозг, селезенка, кишечник). У исследуемых животных, подвергнутых эвтаназии, не наблюдалось существенных визуальных отличий внутренних органов от интактных мышей. Диапазоны летальных доз и расчетные дозы LD₁₀, LD₅₀, LD₉₀ при изучении на животных с наличием микрофлоры и SPF-статуса фактически совпадают. Различия наблюдались лишь в незначительном количестве павших животных, что объясняется разным числом подопытных в обеих группах. Следовательно, наличие микробиома не сказывается на результатах острой токсичности, что в последующем позволит изучить субхроническую, хроническую токсичность в стандартных условиях вивария. Можно предположить, что гибель животных в эксперименте наступала от циркуляторного шока, спровоцированный пептидомиметиком при взаимодействии с рецепторным аппаратом эндотелия.

Выводы: таким образом, КАМП-1 может рассматриваться как перспективная противомикробная фармацевтическая субстанция. Данное обстоятельство подтверждается наличием минимальной ингибирующей концентрацией для широкого спектра аттестованных штаммов, которая не превышает более 100 мг/л. При использовании КАМП-1 наблюдается дозозависимый летальный эффект. При однократном внутривенном введении в диапазоне доз 7.5–10.0 мг/кг регистрируется остротоксическое действие данной субстанции, которое проявлялось гибелью животных, полулетальная доза 8.88 мг/кг, LD₁₀ (7.48 мг/кг), LD₉₀ (10.28 мг/кг).

Финансирование: Исследование выполнено по теме государственного задания № FWNR-2024-0005.

Analysis of primary pharmacodynamic effects and possible cytotoxic effects of synthetic peptidomimetics SAMP-1

Lyubushkina E.M.*, Bondareva E.A., Soldatova M.S., Madonov P.G.

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

* lizaveta.lyubushkina@list.ru

Key words: antibiotic resistance; SAMP-1; MIC; acute toxicity

Motivation and Aim: Antibacterial resistance is a threat to public health; according to the estimation of the team led by O'Neil, by 2050, mortality will reach up to 10 million people per year, and financial losses will lead to losses of more than \$100 trillion [1]. Modern technologies of antibiotic therapy are implemented at the expense of several groups of antibiotics, to most of which resistance has already been formed. The search for new antibacterial agents to which resistance has not yet formed is an effective solution to this problem. Today, synthetic antimicrobial peptidomimetics are of interest due to the lack of a specific microbial target, and, therefore, lower risk of resistance development to them. The aim of this work was to determine the parameters of antibacterial and antifungal activities, as well as a detailed study of acute toxicity of an innovative peptidomimetic (SAMP-1).

Methods and Algorithms: SAMP-1 consists of an arginine residue, tryptophan modified with tert-butyl groups, and arginine with a phenethylamide group. The molecular mass of the peptide is 788 Dalton. Test cultures of certification strains of bacteria and fungi were used to test antimicrobial activity. The method of serial dilutions of SAMP-1 in liquid nutrient medium was used. A suspension of inoculum of the daily culture was added to a series of twofold dilutions of the substance. After incubation, sowing was performed on a dense nutrient medium with subsequent counting of CFU. The lowest dose of the substance at which complete inhibition of bacterial culture growth was observed was considered the minimum inhibitory concentration (MIC). In each study group, the mean and standard error were calculated based on the results of repeated experiments. The obtained results were processed using Biostatistics statistical software package. In "*in vitro*" studies, the MIC of the studied substance for test strains did not exceed 100 mg/l, which, according to the guidelines for preclinical studies of substances/substances, characterizes it as a promising antimicrobial agent. Acute toxicity parameters were further determined after a single injection into the retroorbital sinus and daily observation of the animals for 14 days. Mongrel mature mice of both sexes were used. The first group of mice were obtained and grown under conventional conditions ($n = 40$) and the second group of mice was grown under SPF-vivarium conditions ($n = 48$). The main distinguishing feature was the presence of the microbiome in conventional mice in order to examine differences in outcomes between non-sterile and sterile subjects maintained under SPF-vivarium conditions. The first and second groups included CD-1-line mice of both sexes with external good exterior parameters and weight range from 25–35 g. The animals were kept under standard care conditions with free access to food and water. To study the acute toxicity of the investigated substance, lethal doses LD₁₀, LD₅₀, LD₉₀ were calculated using the StatPlus software by the probit analysis method according to V.B. Prozorovsky. SAMP-1 solution was made

in different concentrations from 7.0–10 mg/kg and administered to animals at the rate of 1 µl per 1 gram of weight. The fallen animals were necroscopically examined and after 14 days, the surviving animals were euthanized using carbon dioxide and further macroscopic examination of internal organs was carried out.

Results: The obtained data demonstrate that SAMP-1 has antimicrobial and antifungal activity, which is shown in Table 1. MIC of SAMP-1 is less than the permissible limit of 100 mg/l (100 µg/ml) on the studied certified test-cultures: *S. aureus*, *B. cereus*, *Corynebacterium hoffmani* K22, *E. coli* more than 14 times; for *P. aeruginosa*, *C. tropicalis* PY23, *C. krusei* PY22, *C. albicans* NCTC 885-653 approximately 2 times; for *C. glabrata* KY22, *C. parapsilosis* KY23 1.3 times. Consequently, SAMP-1 is a promising pharmaceutical substance of antibacterial and antifungal action.

Table 1. Minimally inhibitory concentrations of SAMP-1 on test cultures

Inoculum 10 ³	MIC, µg/ml
<i>S. aureus</i>	6.67 ± 1.67
<i>B. cereus</i>	6.67 ± 1.67
<i>E. coli</i>	8.33 ± 1.67
<i>P. aeruginosa</i>	60.0 ± 20.82
<i>Corynebacterium hoffmani</i> K22	5.56 ± 0.63
<i>C. glabrata</i> KY22	80.0 ± 12.08
<i>C. tropicalis</i> PY23	40.0 ± 4.08
<i>C. krusei</i> PY22	40.0 ± 3.34
<i>C. parapsilosis</i> KY23	80.0 ± 10.22
<i>C. albicans</i> NCTC 885-653	40.0 ± 5.58

No death of animals was registered at the concentration of 7.0 mg/kg. Toxic effect of the investigated substance was observed in the dose range from 7.5 to 10 mg/kg. On average, animal death occurred within the first minute after administration. The results of the number of fallen and survived animals in the studied groups are presented in Table 2.

Table 2. Results of mice after intravenous administration of SAMP-1

Dose, mg/kg	Conventional mice		SPF-status mice	
	survived	deceased	survived	deceased
7.0	5	0	6	0
7.5	5	0	5	1
8.0	4	1	5	1
8.5	4	1	4	2
9.0	3	2	3	3
9.5	2	3	2	4
10.0	0	5	0	6

In concentrations from 7.5 to 10 mg/kg toxic effect of the tested substance in each animal was manifested by similar symptoms: slowed reaction, rapid breathing, lack of reaction to sound stimuli, refusal of feed and food, clonic convulsions. In this dose range, some animals showed recovery of vital functions. No differences in symptoms between females and males were recorded during exposure to SAMP-1. The results for the detected lethal doses of the tested substance are presented in Table 3.

Table 3. Parameters of acute toxicity after a single intravenous injection of SAMP-1 in mice

Animal group	LD ₁₀ , mg/kg	LD ₅₀ , mg/kg	LD ₉₀ , mg/kg
Conventional mice	7.86	9.09	10.32
SPF-status mice	7.48	8.88	10.28

No macroscopic changes of internal organs (lungs, heart, liver, brain, spleen, intestine) were detected at autopsy. No significant visual differences of internal organs from intact mice were observed in euthanized animals under study. The ranges of lethal doses and calculated doses LD₁₀, LD₅₀, LD₉₀ when studied on animals with the presence of microflora and SPF status actually matched. Differences were observed only in the minor number of dead animals, which is explained by the different number of subjects in both groups. Consequently, the presence of microbiome does not affect the results of acute toxicity, which in the future will allow to study subchronic, chronic toxicity under standard vivarium conditions.

It can be assumed that the death of animals in the experiment was due to circulatory shock provoked by the peptidomimetic in interaction with the receptor apparatus of the endothelium.

Conclusion: Thus, SAMP-1 can be considered as a promising antimicrobial pharmaceutical substance. This fact is confirmed by the presence of the minimum inhibitory concentration for a wide range of certified strains, which does not exceed more than 100 mg/L. A dose-dependent lethal effect is observed when using SAMP-1. At a single intravenous injection in the dose range of 7.5–10.0 mg/kg the acutely toxic effect of this substance is registered, which was manifested by death of animals, semi-lethal dose 8.88 mg/kg, LD₁₀ (7.48 mg/kg), LD₉₀ (10.28 mg/kg).

Funding: The research was carried out under the subject of the state assignment No. FWNR-2024-0005.

Список литературы/References

1. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. London, 2016. Available at: <https://amr-review.org/> (Accessed May 1, 2024)
2. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М., 2012
3. Lashin S.A., Matushkin Yu.G. Haploid evolutionary constructor: new features and further challenges. *In Silico Biol.* 2011;11(3-4):125-135