

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Природные антимикробные пептидные комплексы в борьбе с антибиотикорезистентными биопленками: хирургические личинки *Calliphora vicina*

Наталья Гордя¹, Андрей Яковлев¹, Анастасия Кругликова¹, Дмитрий Тулин¹, Евдокия Потолицына¹, Татьяна Суборова², Доменико Бордо³, Камилло Розано³, Сергей Черныш^{1*}

1 Лаборатория биофармакологии и иммунологии насекомых, биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия, **2** Исследовательский центр Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, **3** IRCCS AOU San Martino IST — Национальный институт онкологических исследований, Генуя, Италия

* sichernysh1951@gmail.com



ОТКРЫТЫЙ ДОСТУП

Ссылка для цитирования этой статьи: Гордя Н., Яковлев А., Кругликова А., Тулин Д., Потолицына Е., Суборова Т. и др. (2017). Природные антимикробные пептидные комплексы в борьбе с антибиотикорезистентными биопленками: хирургические личинки *Calliphora vicina*. PLOS ONE 12 (3): e0173559. DOI: 10.1371/journal.pone.0173559

Редактор: Сураджит Бхаттачарджья, Наньянский технологический университет, СИНГАПУР

Поступило в редакцию: 10 ноября 2016 г.

Принято: 23 февраля 2017 г.

Опубликовано: 9 марта 2017 г.

Авторское право: © 2017 Гордя и др. Эта статья находится в открытом доступе и распространяется в соответствии с [лицензией Creative Commons «С указанием авторства»](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение материала на любом носителе при условии, что указаны автор и источник оригинала.

Заявление о доступности данных: данные транскриптома передаются в общедоступную базу данных GenBank TSA (номер заявки SUB2063450, название «Транскриптом *Calliphora vicina*»). Последовательности антимикробных пептидов, выделенных из *Calliphora vicina* и упомянутых в статье, доступны в базе данных UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot>) (ID C0HJX7, V3EWY, C0HJX8, C0HJX9, C0HJY0).

Финансирование: исследование было поддержано грантом Российского научного фонда (URL <http://rscf.ru/>), грант № 16-14-00048 (С. Ч., Н. Г., А. Я., Д. Т., Е. П., А. К.). Спонсор не принимал участия в определении дизайна исследования, сборе и анализе

Аннотация

Биопленки представляют собой фиксированные скопления микроорганизмов, погруженные в биополимерный матрикс; они вызывают подавляющее большинство бактериальных инфекций человека и многие серьезные осложнения, такие как хронические воспалительные заболевания и рак. Из-за резистентности биопленок к действию иммунной системы хозяина и антибиотикам с подобной инфекцией особенно трудно бороться. Антимикробные пептиды (АМП) являются широко распространенным компонентом врожденного иммунитета у животных. Однако активность АМП изучалась в основном на планктонных культурах бактерий, тогда как об их воздействии на биопленки известно немного. Мы исследовали структуру и активность в отношении биопленок комплекса АМП, производимого личинками красноголовой синей падальницы *Calliphora vicina*, живущими в средах, чрезвычайно загрязненных бактериями, образующими биопленки. Комплекс вызывает гибель клеток и разрушение матрикса, демонстрируя высокую активность в отношении патогенных для человека антибиотикорезистентных биопленок *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Acinetobacter baumannii* при отсутствии токсичности для клеток иммунной системы человека. Было обнаружено, что комплекс содержит АМП, принадлежащие семействам дефензинов, цекропинов, диптерицинов и пролин-богатых пептидов, которые одновременно экспрессируются в ответ на бактериальную инфекцию и кодируются сотнями изоформ мРНК. Все семейства обладают механизмами, вызывающими гибель клеток и разрушение матрикса, но соотношение этих видов воздействия и спектр антибактериальной активности у каждого семейства индивидуальны. Эти молекулы резко расширяют список известных АМП, действующих против биопленок. Однако фармацевтическая разработка комплекса в целом может иметь значительные преимущества по сравнению с обычным однокомпонентным подходом. В частности, сравнимая степень активности против биопленки и планктонных бактерий (соотношение МВЕС/МИК) обеспечивает значительное преимущество комплекса перед традиционными антибиотиками. Благодаря наличию доступных методов биосинтеза данного комплекса *in situ* и *in vitro* эта идея осуществима на практике.

Введение

Бактерии существуют в двух основных формах жизни: планктонной форме, предназначенной для распространения бактерий, и в форме биопленки, позволяющей им выживать в

данных, принятии решения о публикации или подготовке рукописи.

Конфликт интересов: С. Ч. и Н. Г. являются изобретателями патента RUN№2447896 «Антимикробный материал», патентообладатель — компания «Аллофарм». Другие соавторы не имеют конфликта интересов. Это не влияет на соблюдение авторами политики PLOS ONE в отношении обмена данными и материалами. Авторы заявляют, что не имеют конфликта интересов.

неблагоприятных условиях. Биопленки, фиксированные скопления микроорганизмов, погруженные в биополимерный матрикс, привлекают особое внимание, поскольку они вызывают основную часть бактериальных инфекций человека и обладают высокой степенью резистентности к антибиотикам и действию иммунной системы хозяина (обзор см. в [1–5]). Проведенные недавно исследования показали, что бактериальные биопленки играют определенную роль в возникновении и развитии рака желудка [6], толстой кишки [7], ободочной кишки [8], предстательной железы [9], молочной железы [10] и легкого [11]. Таким образом, воздействие биопленок на жизнь и смерть человека выходит далеко за рамки классической инфекционной патологии. Это делает поиск новых препаратов против биопленок особенно актуальным. Природные антимикробные пептиды (АМП) в целом признаются перспективной основой для разработки антибактериальных препаратов [12–16]. Хотя практически все изученные на сегодняшний день многоклеточные животные используют ту или иную форму АМП для защиты от патогенов, наибольшее разнообразие их обнаружено у насекомых. Классификация, структурное и функциональное разнообразие и механизм действия АМП насекомых рассматриваются в обзорных статьях [17, 18]. Значительное внимание уделялось АМП насекомых с точки зрения лечебного потенциала [18–21]. Тем не менее, на пути развития терапевтических АМП возникает множество хорошо известных препятствий [22–24]. Среди прочего следует отметить, что разработки направлены на отдельные антимикробные соединения, способные остановить развитие инфекции при применении отдельно. Этот подход отражает опыт разработки традиционных антибиотиков. Однако в природных системах защиты на основе АМП используются комплексы активных молекул, а не один их вид [25]. Преимущества многокомпонентных систем АМП для хозяина по-прежнему изучены слабо, хотя синергетическое/усиливающее взаимодействие среди встречающихся природных АМП [26–29] и способность предотвращать развитие резистентности у бактерий [30] были описаны в экспериментах с различными формами планктонных бактерий.

В этой статье анализируется активность в отношении биопленок комплекса АМП хозяина, которая до сих пор не изучена, хотя некоторые из рассматриваемых АМП по отдельности [15, 31–33] продемонстрировали антибиопленочную активность. Основываясь на нашей предыдущей работе, мы выбрали для экспериментального исследования природный комплекс АМП, выделенный из личинок красноглазой синей падальницы *Calliphora vicina* (отряд двукрылые, семейство Calliphoridae) и названный здесь FLIP7 (аббревиатура от Fly Larvae Immune Peptides 7 — иммунопептиды личинок мухи 7). Как и другие члены семейства Calliphoridae, известные в медицине как «хирургические личинки» [34], личинки *C. vicina* в ответ на бактериальную инфекцию незамедлительно синтезируют и накапливают в гемолимфе катионные АМП из четырех семейств: дефензины, цекропины, диптерицины и пролин-богатые пептиды [30, 35, 36]. Гемолимфа также содержит другие компоненты, связанные с иммунным ответом, в том числе противовирусные и противоопухолевые пептиды аллофероны [37]. Дефензин *Calliphora*, а также дефензины других насекомых и позвоночных представляют собой пептиды с трехмерной структурой, содержащей альфа-спирали / бета-слои, соединенные тремя дисульфидными мостиками и преимущественно проявляющие активность против грамположительных бактерий. Механизм антибактериальной активности дефензинов насекомых включает разрушение / повышение проницаемости бактериальной клеточной стенки [17]. Цекропин *Calliphora* представляет собой линейный амфипатический альфа-спиральный пептид, особенно активный в отношении грамотрицательных бактерий. Известно, что все цекропины насекомых способны вызывать образование пор и повышение проницаемости клеточной мембраны [17]. Диптерицины *Calliphora* являются членами семейства глицин-богатых АМП, избирательно токсичных для некоторых грамотрицательных энтеробактерий, таких как *E. coli*, за счет разрушения клеточной стенки [38]. Пролин-богатые пептиды *Calliphora* [30, 36] относятся к семейству пролин-/аргинин-богатых АМП, которые, как известно, вызывают гибель бактерий за счет нарушения синтеза ДНК и/или белка [39].

Материалы и методы

Насекомые

Эксперименты проводились на лабораторной популяции красноглазых синих падальниц *C.*

vicina, (получены в Санкт-Петербурге, северо-запад России) характеризующихся стабильной личиночной диапаузой. Условия размножения по существу были такими же, как описано ранее [40]. Чтобы вызвать диапаузу у личинок, взрослых мух содержали в условиях короткого светового дня (12 часов световой день: 12 часов ночь). Личинок кормили свежей говядиной при 12 °С, личинок третьего возраста перемещали в температурные условия 3 °С в конце периода кормления, оставляли на 2 недели для индукции диапаузы, а затем начинали эксперименты.

Приготовление комплекса АМП *C. vicina*

Процесс приготовления комплекса был таким же, как описано ранее [30]. Чтобы вызвать иммунный ответ у личинок *C. vicina* в состоянии диапаузы, использовали лиофилизированную живую культуру штамма *E. coli* M17 («Микроген», Россия), которую суспендировали в стерильной дистиллированной воде. Личинкам делали укол иглой, предварительно погруженной в суспензию, содержащую 10^{10} бактериальных клеток/мл иглой, и оставляли их на ночь при температуре 25 °С. Затем их поверхность стерилизовали 70% раствором этанола, промывали личинок стерильной дистиллированной водой и подсушивали. Гемолимфу (приблизительно по 10 мкл от одной особи) собирали в охлажденные на льду пробирки посредством прокола кутикулы. Образцы гемолимфы хранили при –70 °С до использования. Размороженную гемолимфу подкисляли 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ) до конечной концентрации 0,05%, а нерастворенные частицы удаляли путем центрифугирования (30 мин. при 8000 G при 4 °С). Супернатант наносили на картриджи с обращенной фазой Ser-Pak C18 (фирма Waters) после стабилизации 0,05% ТФУ из расчета 5 мл/г сорбента. Соединения с высокой степенью гидрофильности удаляли путем промывания картриджа 0,05% раствором ТФУК. Затем сорбированные на картридже компоненты элюировали 50%-ным раствором ацетонитрила, подкисленным 0,05% ТФУ, лиофилизировали на вакуумной сушилке FreeZone, Labconco и хранили при температуре –70 °С. Перед использованием лиофилизированный образец растворяли в деионизированной воде (50 мг/мл), стерилизовали фильтрованием через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм (Milliex-GS, Millipore) и замораживали при –70 °С.

Характеристика антимикробных пептидов

АМП комплекса были выделены ранее и охарактеризованы при помощи комбинации методов обращенно-фазовой ВЭЖХ, масс-спектрометрии (МС) и методов деградации по Эдману [25, 35]. В этом исследовании 1 мг лиофилизированного соединения растворяли в деионизированной воде и наносили на ВЭЖХ-систему Shimadzu LC20 Prominence с аналитической колонкой C18 Vydac (4,6 × 250 мм, 5 мкм, Grace), уравновешенной 0,05% ТФУ. Элюцию с колонки проводили линейным градиентом ацетонитрила (ACN) от 0 до 50% в подкисленной воде (0,05% ТФУ) в течение 50 мин. Хроматографические фракции автоматически собирали с интервалом в 1 мин. Оптическая плотность фракций регистрировалась с помощью УФ-детектора на двух фиксированных длинах волн 214 и 280 нм. Фракции лиофилизировали, растворяли в деионизированной воде и тестировали против планктонных штаммов *M. luteus* A270 и *E. coli* D31, используя метод подавления роста в чашке Петри. Активность фракций против суточных биопленок, образованных *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* 203, анализировали с помощью методов с ТТХ и кристаллическим фиолетовым, как описано ниже.

Масс-спектрометрия

Хроматографические фракции, содержащие антибактериальные материалы, разбавляли деионизированной водой до объема 100 мкл. Молекулярные массы материалов определяли методом Micro-TOF ESI на хроматографическом масс-спектрометре MaXis (Bruker Daltonik, Бремен, Германия). Масс-спектры регистрировались с использованием режима положительного иона в диапазоне масс 50–1000. Было установлено напряжение 4500 В и 500 В на концах капилляра. Сухой газ подавали при скорости потока 4 л/мин. при температуре 180 °С. Была включена фрагментация в источнике ионов (ISCID), использовались напряжения столкновения до 200 В. Масс-спектрограммы обрабатывались вручную для учета отличия всех пиков от фонового сигнала. Экспериментально определенные массы сравнивались с ранее описанными в литературе характеристиками отдельных АМП *C. vicina*.

Анализ транскриптома

Иммунный ответ, приводящий к резкой активации биосинтеза АМП, был индуцирован у личинок в состоянии диапаузы через 1 неделю после окончания периода кормления в соответствии с процедурой, описанной в разделе «Приготовление комплекса АМП *S. vicina*». Через 18 часов, когда титр АМП в гемолимфе достигал максимума [35], личинок замораживали в жидком азоте и измельчали. Выделение тотальной РНК проводили с использованием реагента TRIzol® в соответствии с протоколом производителя (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf). Полученную тотальную РНК использовали для синтеза кДНК с использованием системы синтеза кДНК Roche (<https://lifescience.roche.com/shop/products/cdna-synthesis-system>). кДНК секвенировали на устройстве Ion Torrent, а база данных кДНК была создана с использованием программного обеспечения Mira. Поиск последовательностей антимикробных пептидов в базе данных кДНК проводили с использованием программного обеспечения Blast, а также в ранее описанных АМП *S. vicina* путем запросов. Метод выравнивания: корректировка композиционной матрицы [41]. В анализе использовались последовательности с 70–100%-м сходством ($P < 0,001$).

Антимикробные препараты

В эксперименте в качестве препаратов сравнения использовались следующие антибиотики серийного производства: карбопенем меропенем тригидрат (AstraZeneca), цефалоспорин третьего поколения цефотаксим натрия (Abolmed), природный полипептид полимиксина В сульфат (Applichem) и гликопептид ванкомицин («Красфарма»). Антибиотики растворяли в стерильной деионизированной воде в концентрации 1 мг/мл, делили на аликвоты объемом по 0,05 мл и хранили при -70°C до использования.

Бактерии

В качестве моделей бактерий, образующих биопленку, были использованы штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922 и NCTC 13353, а также ряд клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Acinetobacter baumannii*. Описание геномной сборки штаммов ATCC 25922 и NCTC 13353 *E. coli* с комментариями доступно по ссылкам <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP009072> и <https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/ERS530434>, соответственно. Геном штамма *A. baumannii* 28 секвенирован и депонирован в базе данных GenBank (№ NZ_MAF00000000.1) и доступен по ссылке https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_MAF00000000. Секвенирование гена штамма позволяет спрогнозировать резистентность к аминогликозидам, бета-лактамам и хлорамфениколу. Клинические штаммы получены из хирургической клиники Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова (Санкт-Петербург, Россия), за исключением штаммов *A. baumannii* 28 и *S. aureus* 203, полученных из коллекции Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова и Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, Россия), соответственно. Штаммы *E. coli* D31 и *Micrococcus luteus* A270, обычно используемые в исследованиях АМП насекомых, были получены из Института генетики и молекулярной и клеточной биологии (Франция) и использованы для описания характеристик АМП комплекса. Профили антибиотикорезистентности клинических штаммов определялись в соответствии с рекомендациями (Национальный комитет по клиническому лабораторному стандарту, 2003. Стандарты проведения дисковых тестов на антимикробную чувствительность. Утвержденный стандарт M2-A8. НККЛС, Уэйн, штат Пенсильвания). По результатам исследования диско-диффузионным методом штаммы классифицировали как чувствительные, умеренно резистентные или резистентные к тому или иному антибиотику. Для тестирования резистентных профилей штаммов *A. baumannii* использовались следующие антибиотики: амикацин, гентамицин, имипенем, меропенем, цефепим, цефоперазон, цефотаксим, цефтазидим, ципрофлоксацин (Oxoid, Великобритания). Штамм 143 был устойчив ко всем антибиотикам, за исключением амикацина, к которому он был умеренно резистентен. Штамм 149.2 показал резистентность к цефоперазону, цефотаксиму, цефтазидиму, промежуточную резистентность к цефепиму и чувствительность к остальным антибиотикам. Были изучены профили *S. aureus* в отношении амикацина, пенициллина, ванкомицина, гентамицина, доксициклина, азитромицина, клиндамицина, хлорамфеникола, нетилмицина, оксациллина,

цефазолина, ципрофлоксацина, фузидовой кислоты, линезолида (Oxoid, Великобритания). Штамм 203 был чувствителен ко всем протестированным антибиотикам, тогда как штамм 73.1 показал резистентность только к азитромицину. Кроме того, исследования методом серийных микроразведений показали чувствительность к полимиксину В всех штаммов *A. baumannii* и *E. coli*, используемых в экспериментах.

Оценка антибактериальной активности

Анализ ингибирования роста на твердой среде. Для идентификации и относительной количественной оценки активных соединений комплекса использовали стандартный метод подавления роста в чашке Петри. Метод был по существу таким же, как описанный ранее [30]. Культуры *E. coli* D31 и *M. luteus* A270 выращивали в жидкой питательной среде LB (Invitrogen) в течение 18–20 часов при температуре 37 °С. Стерильные чашки Петри (диаметром 9 см) заполняли 7,5 мл среды LB, дополненной 12 г/л агарозы (Invitrogen). 4×10^6 КОЕ исследуемых микроорганизмов на чашку, измеренных по оптической плотности (OD), инокулировали в теплую среду. Аналиты растворяли в 20 мкл деионизированной стерильной воды и аликвоты раствора объемом по 2 мкл наносили на поверхность твердой среды. Диаметр зоны ингибирования роста измеряли после 24-часовой инкубации при 37 °С, зона ингибирования рассчитывалась и использовалась для относительной количественной оценки активности действия АМП против *M. luteus* и *E. coli*.

Анализ ингибирования роста в жидкой среде. Для определения МИК применяли стандартный метод микроразведений с использованием среды LB (Invitrogen) согласно рекомендациям (Институт клинических лабораторных стандартов, 2015 г.). Методы разведения для определения антимикробной чувствительности аэробных бактерий. Утвержденный стандарт, 10-е издание, M07-A10. НККЛС, Уэйн, Пенсильвания). В каждую лунку 96-луночного плоскодонного планшета (Sarstedt, Ньютон, штат Северная Каролина), содержащего 100 мкл жидкой питательной среды LB (Invitrogen) с двойными разведениями антибиотика, инокулировали приблизительно 5×10^5 КОЕ/мл исследуемых бактерий. Исходный инокулят выращивали на твердой питательной агарной среде LB (Invitrogen), отдельные колонии собирали, переносили в жидкую среду (основа для приготовления среды LB, 25 г/л) и инкубировали в течение ночи при 37 °С. Планшеты для микротитрования инкубировали в течение 20 часов при 37 °С.

Формирование биопленки

Приготовление суточных биопленок проводилось в соответствии с процедурой, описанной ранее Christensen et al. [42]. Бактерии культивировали в 5 мл жидкой питательной среды LB (Invitrogen) в течение 18–20 часов при 37 °С. Культуры, выдержанные в течение ночи, разводили до концентрации 5×10^5 КОЕ/мл тестируемых микроорганизмов, измеренной по OD. В каждую лунку 96-луночного плоскодонного планшета (Sarstedt AG & Co., Ньютон, штат Северная Каролина) инокулировали аликвоты разведенной бактериальной суспензии объемом по 100 мкл и инкубировали во влажной камере в течение 24 часов при 37 °С. Отрицательным контролем служила жидкая питательная среда LB.

Для визуализации и количественного определения образованной биопленки проводился анализ с кристаллическим фиолетовым в соответствии с рекомендациями [43]. Бактерии инкубировали в течение 24 часов на 96-луночных планшетах, отмывали от культуральной среды и окрашивали кристаллическим фиолетовым, как описано в разделе «Тест на эрадикацию биопленки». Оптическая плотность использовалась как мера толщины биопленки. Каждый эксперимент выполнялся по восемь раз.

Микроскопическая визуализация биопленки

Покровное стекло размером 24 × 24 мм (Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Брауншвейг, Германия) помещали в каждую лунку 6-луночного микротитровального планшета (Falcon, Becton Dickinson Labware, Франклин Лейкс, штат Нью-Джерси, США). Лунки заполняли 2,8 мл бактериальной суспензии, приготовленной как указано выше, и инкубировали 24 часа при 37 °С. Затем суточные биопленки трижды промывали 3 мл стерильного буферного физиологического раствора (PBS) для удаления неприкрепленных бактерий и заполняли свежей

культуральной средой (контроль) или средой, дополненной 4 мг/мл пептидного комплекса FLIP7. Планшеты инкубировали еще 24 часа при 37 °C. Затем покровные стекла извлекали из лунок, промывали в PBS, помещали на предметное стекло вверх дном и фотографировали с помощью микроскопа Leica DMI 2500 (Leica Microsystems GmbH, Вецлар, Германия) и оптики Номарского с увеличением $\times 400$ и $\times 1000$.

Тест на уничтожение клеток с ТТХ

Мы использовали колориметрический тест на чувствительность к антимикробным препаратам, позволяющий измерить антимикробную чувствительность бактериальных биопленок [44]. При этом методе используется триметилтетразолий-хлорид (ТТХ) в качестве индикатора жизнеспособности бактерий, исследование состоит из следующих этапов: приготовление суточной биопленки, обработка антимикробным агентом, добавление 0,02% ТТХ и измерение поглощения ТТХ при 540 нм. Поскольку восстановление ТТХ жизнеспособными бактериями приводит к образованию красного формазана, ингибирование роста бактерий можно количественно измерить путем колориметрической абсорбции при 540 нм. 24-часовые биопленки в 96-луночных микротитровальных планшетах трижды промывали 200 мкл стерильного буферного физиологического раствора (PBS) для удаления неприкрепленных бактерий и высушивали на воздухе. Приготавливали последовательные двукратные разведения антимикробных препаратов. В каждую лунку добавляли 100 мкл соответствующей концентрации и инкубировали планшеты в течение 24 ч при 37 °C во влажной камере. После инкубации добавляли 11 мкл 0,2% ТТХ (Ленреактив, Россия) до конечной концентрации 0,02%. После инкубации в течение 1 часа при 37 °C измерялась OD_{540} на автоматическом фотометре для микропланшетов Epoch (BioTek). В качестве контроля применяли среднее значение OD_{540} 48-часовых биопленок без обработки антимикробным препаратом. Каждый эксперимент повторяли три раза. Затем минимальная концентрация, подавляющая образование биопленки (MBIC) определялась как самая низкая концентрация лекарственного средства, приводящая к среднему процентному значению менее 100%.

Тест на эрадикацию биопленки кристаллическим фиолетовым

Тест на эрадикацию биопленки выполнялся аналогично ранее описанному методу с некоторыми модификациями [43]. 24-часовые биопленки в 96-луночных микротитровальных планшетах трижды промывали 200 мкл стерильного раствора PBS и высушивали на воздухе. Получали последовательные двукратные разведения антимикробных препаратов. В каждую лунку добавляли 100 мкл соответствующей концентрации и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C. После инкубации отработанную среду удаляли, а планшеты трижды промывали 200 мкл раствора PBS, высушивали на воздухе и окрашивали 0,1% кристаллического фиолетового в воде (Ленреактив, Россия) строго в течение 2 мин. Окрашенные биопленки трижды промывали 200 мкл раствора PBS, высушивали на воздухе и растворяли в 200 мкл 95% этанола в течение 1 часа. Затем связанный с клетками биопленки краситель измеряли при OD_{570} с использованием фотометра Epoch (BioTek). Каждый эксперимент повторяли три раза. Минимальную эрадикационную концентрацию для биопленки (MBEC) определяли как MBEC₅₀ и MBEC₉₀, что соответствует концентрации препарата, уменьшающей связывание кристаллического фиолетового в предварительно сформированных биопленках на 50% и 90%, соответственно.

Тест на цитотоксичность

В качестве модели для оценки цитотоксичности FLIP7 использовались мононуклеарные лейкоциты человека (лимфоциты и моноциты). Клетки были выделены из донорской венозной крови с помощью пробирок BD Vacutainer® CPT (BD Biosciences) в соответствии с рекомендациями производителя и перенесены в культуральную среду RPMI, обогащенную глутамином, 10% эмбриональной телячьей сывороткой и антибиотическим антимикотическим раствором A5955 (Sigma-Aldrich). Лиофилизированный FLIP7 растворяли в культуральной среде, пропускали через фильтр 0,45 мкм и вводили в среду в конечной концентрации 0,5, 5 и 10 мг/мл. Затем подсчитывали количество лимфоцитов и моноцитов, дифференцированно окрашенных аннексином V (маркер апоптоза) и йодистым пропидием (PI, маркер некроза),

путем стандартного проточного цитометрического анализа Annexin-V-FITC в соответствии с инструкциями производителя (BioRad ANNEXIN V KIT). Анализ проводили с помощью проточного цитометра BD FACSAria III (фильтры 530/30 нм и 616/23 нм) с программным обеспечением BD FACSDiva.

Клетки были разделены на следующие категории:

- Нормальные (неповрежденные) клетки (двойное отрицательное связывание с аннексином V и PI)
- Апоптотные (положительное связывание с аннексином V)
- Некротические (отрицательное связывание с аннексином V, положительное — с PI)

Каждый эксперимент включал шесть независимых повторений. Среднее количество апоптотных и некротических клеток на 100 гейтированных клеток использовалось как количественный показатель токсичности FLIP7.

Статистические методы

Значения МИК, МВІС и МВЕС (среднее ± стандартная ошибка) были рассчитаны с помощью программного обеспечения Primer of Biostatistics, версия 4.03. Статистическую значимость различий анализировали с помощью дисперсионного анализа, результаты считались достоверными при P < 0,05.

Результаты

Способность исследуемых бактерий к формированию биопленки

Для визуализации и количественной оценки способности бактерий образовывать биопленки применялся стандартный метод окрашивания кристаллическим фиолетовым. Все исследуемые бактерии могли образовывать различимые биопленки на пластиковой поверхности, но толщина суточной биопленки, измеренная с помощью кристаллического фиолетового в единицах оптической плотности, варьировала в зависимости от штамма (таблица 1). Максимальная способность к образованию биопленок была обнаружена в штаммах *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* 203.

Микроскопическая визуализация образования биопленки и активность FLIP7 против биопленок

Формирование биопленки также изучали с помощью световой микроскопии с использованием штаммов *A. baumannii* 28, *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* 203, которые показали высокую способность образования биопленки в анализе с кристаллическим фиолетовым. Все три штамма образовывали плотные биопленки, содержащие живые бактерии, прикрепленные к поверхности стекла (рис. 1).

Таблица 1. Способность исследуемых бактерий к образованию биопленки (анализ с кристаллическим фиолетовым)

Бактерии	Характеристики штамма	Оптическая плотность A ₅₇₀ нм, ед.		P*	Способность к формированию биопленки
		Контроль	1-суточная биопленка		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Чувствительность к антибиотикам	0,1 ± 0,002	0,7 ± 0,05	<0,001	Высокая
<i>E. coli</i> NCTC 13353	Производство бета-лактамазы	0,1 ± 0,004	0,1 ± 0,03	0,17	Низкая
<i>S. aureus</i> 203	Чувствительность к антибиотикам	0,1 ± 0,002	1,1 ± 0,08	<0,001	Высокая
<i>S. aureus</i> 73.1	Резистентность к азитромицину	0,1 ± 0,01	0,3 ± 0,03	0,03	Средняя
<i>A. baumannii</i> 28	Мультирезистентность к антибиотикам	0,1 ± 0,002	0,6 ± 0,04	<0,001	Высокая
<i>A. baumannii</i> 143	Мультирезистентность к антибиотикам	0,1 ± 0,01	0,26 ± 0,03	0,02	Средняя
<i>A. baumannii</i> 149.2	Мультирезистентность к антибиотикам	0,1 ± 0,01	0,8 ± 0,09	0,002	Высокая

* P — статистическая значимость различий в оптической плотности по сравнению с контрольными лунками без добавленных бактерий. Каждый тест состоял из трех независимых измерений.

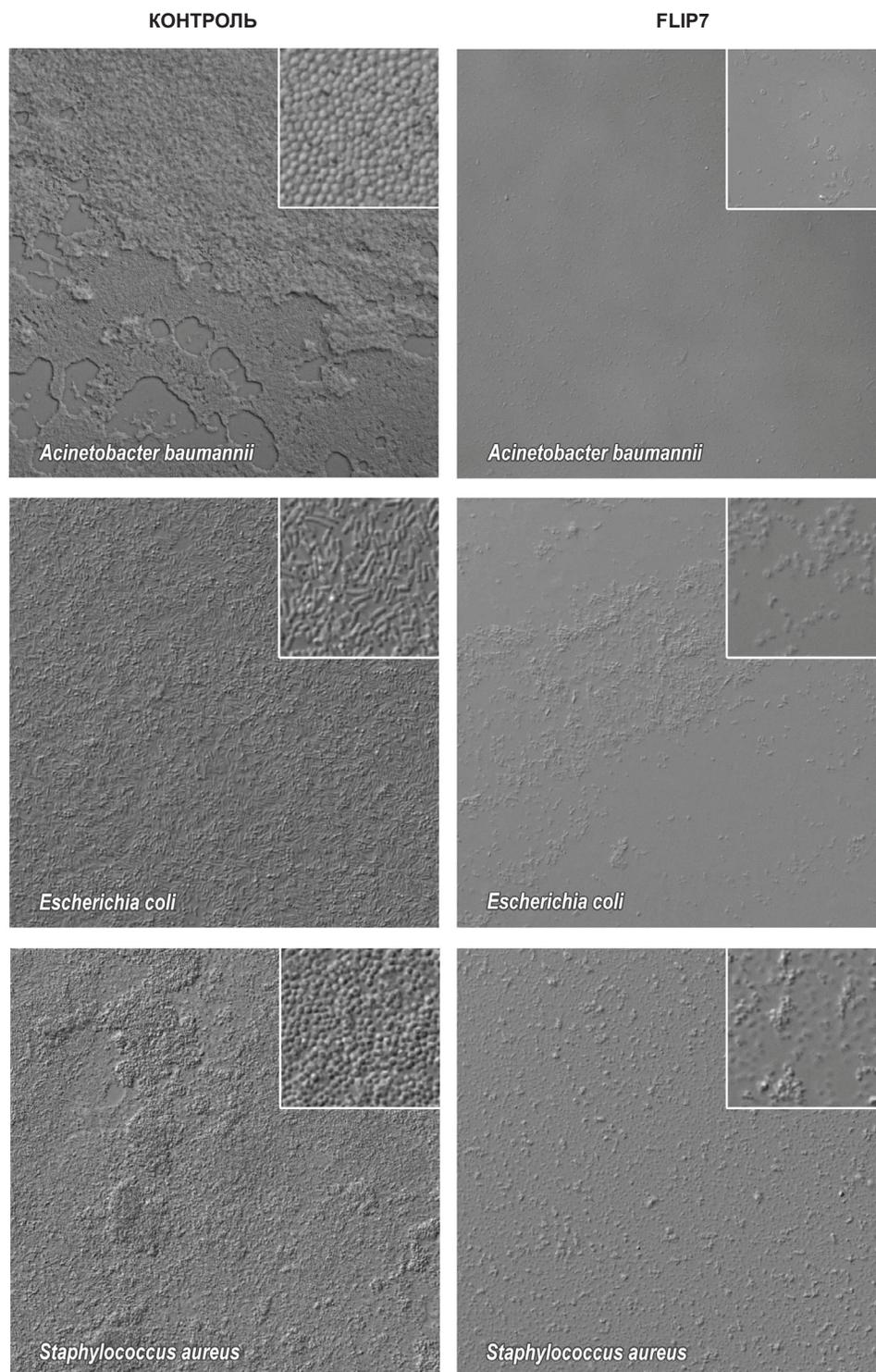


Рис. 1. Микрофотографии биопленок, образованных тремя бактериальными штаммами в нормальных условиях и в присутствии FLIP7. *A. baumannii* 28, *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* 203, выращенные, как описано в разделе «Материалы и методы», инкубировали 24 часа в культуральной среде (контроль) или среде, дополненной 4 мг/мл FLIP7, и фотографировали с использованием оптики Номарского с 400-кратным и 1000-кратным (врезка) увеличением. Все три штамма образовывали плотные биопленки, содержащие живые бактерии, прикрепленные к поверхности стекла (контроль). В то же время присутствие FLIP7 в среде привело к разрушению биопленки, в остатках которой видны главным образом клетки, которые потеряли свою характерную форму.

doi: 10.1371 / journal.pone.0173559.g001

Внешний вид обработанных FLIP7 биопленок резко отличался от их обычного состояния. Остатки биопленок превратились в бесформенный детрит, а несколько оставшихся бактериальных клеток напоминали клетки, обработанные мембрано-активными пептидами. [45, 46].

Влияние FLIP7 и традиционных антибиотиков на жизнеспособность планктонных культур и биопленок

Сравнение чувствительности бактерий в форме планктона и в форме биопленки к FLIP7 и антибиотикам сравнения проводилось с помощью стандартного теста на жизнеспособность клеток с ТТХ (таблица 2). Указанные антибиотики были выбраны для каждого штамма на основании его профиля антибиотикорезистентности, описанного в разделе «Материалы и методы». Все исследованные материалы продемонстрировали антибиопленочную активность, которую можно количественно выразить значением $MBIC_{90}$. Однако соотношение $MBIC_{90}/МИК$ демонстрирует вариации роста резистентности в зависимости от особенностей бактерий, формирующих биопленки. У штаммов *E. coli* устойчивость к FLIP7 возрастала с 3,3 до 10,3 раза (в среднем $6,8 \pm 3,5$), тогда как резистентность к антибиотикам сравнения увеличивалась в 24–40 ($31,4 \pm 3,4$) раза. В биопленках *S. aureus* рост резистентности к FLIP7 был еще менее значительным: 0,9–2,3 раза ($1,6 \pm 0,7$) по сравнению с планктонными формами, в то время как рост резистентности к меропенему варьировал в широком диапазоне от 3,6 до >167 раз. Резистентность биопленок *A. baumannii* выросла с 18 до 51 раз (в среднем $33 \pm 9,64$) к FLIP7 и с 43 до 667 раз к полимиксину В. Поскольку активные компоненты как полимиксина В, так

Таблица 2. Чувствительность планктонных бактерий и биопленок к FLIP7 и антибиотикам сравнения (анализ с ТТХ)

Штамм	МИК планктонных бактерий, мкг/мл	$MBIC_{90}$ биопленочных бактерий, мкг/мл	P*	Соотношение $MBIC_{90}/МИК$
<i>E. coli</i> ATCC 25922				
FLIP7	500 ± 0,00	1667 ± 88	<0,001	3,3
Цефотаксим	0,125 ± 0,00	3 ± 0,7	0,005	24
Меропенем	0,03 ± 0,00	0,9 ± 0,3	<0,001	30
Полимиксин	0,5 ± 0,00	12,3 ± 0,3	<0,001	24,6
<i>E. coli</i> NCTC 13353				
FLIP7	250 ± 0,00	2567 ± 617	0,02	10,3
Меропенем	0,06 ± 0,00	2,3 ± 0,9	0,073	38,3
Полимиксин	1,3 ± 0,3	52 ± 14	0,022	40,0
<i>S. aureus</i> 203				
FLIP7	667 ± 167	1543 ± 137	0,015	2,3
Меропенем	0,03 ± 0,005	>5		>167
Ванкомицин	0,5 ± 0,00	25 ± 13	0,134	50
<i>S. aureus</i> 73.1				
FLIP7	8000 ± 0,00	7333 ± 167	0,016	0,9
Меропенем	0,08 ± 0,00	0,29 ± 0,08	0,06	3,6
<i>A. baumannii</i> 28				
FLIP7	125 ± 0,00	6433 ± 1417	0,011	51
Полимиксин В	0,4 ± 0,1	267 ± 67	0,016	667
<i>A. baumannii</i> 143				
FLIP7	125 ± 0,00	3767 ± 33	<0,001	30
Полимиксин В	0,25 ± 0,00	>20		>80
<i>A. baumannii</i> 149.2				
FLIP7	416 ± 83	7600 ± 306	<0,001	18
Меропенем	0,5 ± 0,00	1,5 ± 0,06	<0,001	3
Полимиксин В	0,7 ± 0,2	30,3 ± 6,2	0,009	43

* Каждый тест состоял из трех независимых измерений

и FLIP7 представляют собой АМП, эти бактерии, по-видимому, образуют биопленки, хорошо приспособившиеся к воздействию АМП, в отличие от *E. coli* и *S. aureus*. Примечательно, что бета-лактамный антибиотик меропенем продемонстрировал более высокую активность против биопленок *A. baumannii* и *S. aureus* 73.1, но не против других бактерий.

Сравнительное влияние FLIP7 и антибиотиков сравнения на уничтожение клеток и эрадикацию биопленки

Антибиопленочная активность материалов дополнительно изучалась с помощью тестов с ТТХ и кристаллическим фиолетовым с использованием в качестве моделей штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* 203 (таблица 3). Биопленки *E. coli* продемонстрировали 6-кратный рост резистентности к FLIP7 по сравнению с планктонной культурой, как показали анализ жизнеспособности клеток с ТТХ и тест на эрадикацию биопленки с кристаллическим фиолетовым. Таким образом, оба эффекта FLIP7 реализованы в одной и той же концентрации, и с этой точки зрения тесно связаны. Цефотаксим и меропенем уменьшали толщину биопленки на 90% при применении в концентрации, в 4 раза превышающей МИК для планктонной культуры, однако это не приводило к смерти бактерий. Чтобы уничтожить 90% бактерий, необходимо было увеличить концентрацию этих антибиотиков в 17–33 раза. Концентрация полимиксина, разрушающая 90% бактерий в биопленке *E. coli*, в 50 раз превышала МИК для планктонной культуры.

Эксперимент с биопленкой *S. aureus* показал еще более заметную разницу между FLIP7 и антибиотиками сравнения. Устойчивость биопленки *S. aureus* к FLIP7 по сравнению с планктонной культурой выросла менее чем в 2 раза по результатам тестов с ТТХ и кристаллическим фиолетовым. В то же время значения МВЕС₉₀ меропенема и ванкомицина превышали максимальный определяемый уровень в 167 и 83 раза, соответственно. Кроме того, в таблице 3 приведены значения МВЕС₅₀, демонстрирующие резкий рост устойчивости биопленки *S. aureus* к указанным антибиотикам, но не к FLIP7.

Состав антимикробных пептидов FLIP7

Структура АМП FLIP7 первоначально описывалась при помощи комбинации методов жидкостной хроматографии и анализа ингибирования роста на твердой среде (рис. 2). 1 мг FLIP7 фракционировали с помощью ВЭЖХ; 52 фракции, собранные с интервалами в 1 мин, лиофилизировали и количественно оценивали их антибактериальную активность путем анализа ингибирования роста на твердой среде с использованием планктонных культур грамотрицательных бактерий *E. coli* D31 и грамположительных бактерий *M. luteus* A270 на твердой агаровой среде.

Таблица 3. Воздействие FLIP7 и антибиотиков сравнения на жизнеспособность клеток и толщину биопленок *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* 203

Штаммы	Планктонные	Жизнеспособность клеток биопленки*			Плотность биопленки*		
	МИК*	(анализ с ТТХ)			(анализ с кристаллическим фиолетовым)		
	мкг/мл	МВЕС ₉₀	МВЕС ₉₀ /	МВЕС ₅₀	МВЕС ₅₀ /	МВЕС ₉₀	МВЕС ₉₀ /
		мкг/мл	МИК	мкг/мл	МИК	мкг/мл	МИК
<i>E. coli</i>							
FLIP7	667 ± 167	4100 ± 208	6,15	817 ± 60	1,2	4083 ± 1543	6,1
Цефотаксим	0,125 ± 0,00	4,17 ± 0,83	33,4	0,14 ± 0,03	1,1	0,53 ± 0,04	4,24
Меропенем	0,06 ± 0,00	1 ± 0,00	16,7	0,14 ± 0,01	2,3	0,24 ± 0,0006	4,0
Полимиксин	0,5 ± 0,00	24,7 ± 0,3	49,4	9,4 ± 0,3	18,8	14,3 ± 1,1	28,6
<i>S. aureus</i>							
FLIP7	500 ± 0,00	933 ± 17	1,9	590 ± 105	1,2	973 ± 15	1,9
Меропенем	0,03 ± 0,00	>5	>167	3,5 ± 0,8	116,7	>5	>167
Ванкомицин	0,6 ± 0,00	>50	>83	17,5 ± 5,1	29,2	>50	>83

* Каждый тест состоял из трех независимых измерений

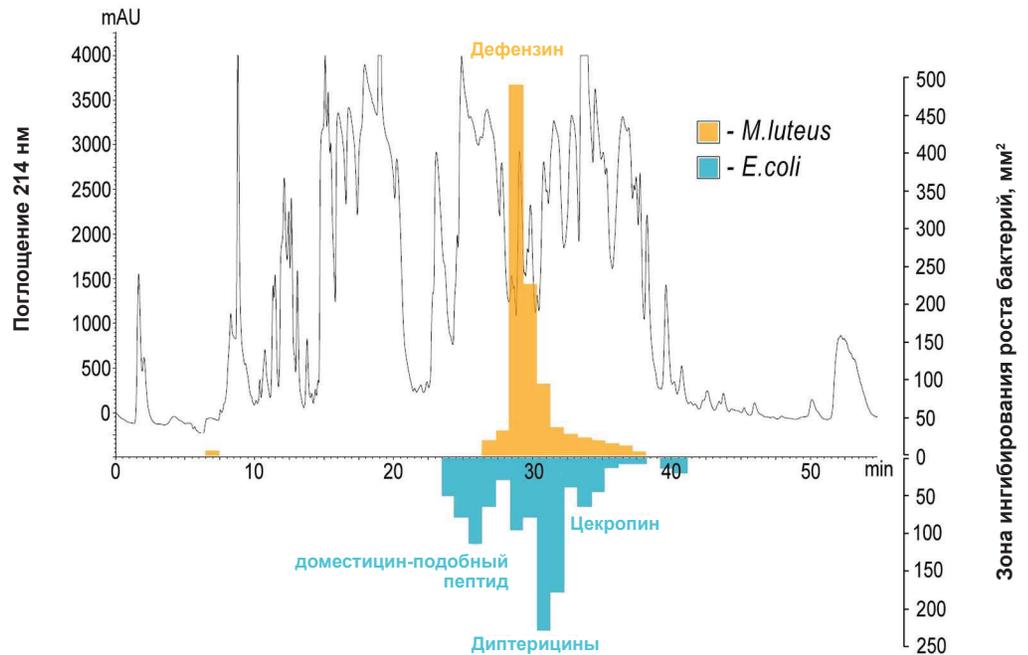


Рис. 2. Хроматографическое фракционирование комплекса АМП *C. vicina* и расположение антибиопленочных компонентов. Комплекс подвергли обращенно-фазовой ВЭЖХ, и полученные фракции антимикробной активности против штаммов *E. coli* D31 и *M. luteus* A270 тестировали с использованием метода ингибирования роста на твердой среде, как описано в разделе «Материалы и методы». Полученные фракции использовали для масс-спектрометрического анализа состава и антимикробной активности компонентов. Активные фракции обозначены полосками, высота которых соответствует площади зоны ингибирования роста.

doi:10.1371/journal.pone.0173559.g002

Основная часть активности против *M. luteus* наблюдалась во фракциях 28–30, тогда как соединения, активные против *E. coli*, были обнаружены в широком диапазоне фракций с 23 до 34. Распределение активных фракций было по существу таким же, как описано ранее [30].

Антибиопленочную активность одних и тех же хроматографических фракций анализировали с использованием комбинации тестов с ТТХ и кристаллическим фиолетовым. Для простоты из таблицы 4 исключены фракции 1–21 и 40–52, не обладающие антибактериальной активностью против планктонных бактерий (анализ ингибирования роста на твердой среде) и биопленок (анализы с ТТХ, кристаллическим фиолетовым). Эксперименты с биопленкой *E. coli* ATCC 25922 продемонстрировали очевидную активность, связанную с уничтожением клеток, во фракциях 26 и 28–33, а также активность в отношении эрадикации биопленок во фракциях 28–34, соответственно. В соответствии с анализом ингибирования роста на твердой среде (рис. 2), в котором тестировались планктонные бактерии, все фракции можно разделить на неактивные (без зоны ингибирования) и активные (размер зоны колеблется в зависимости от активности фракции). Оптическая плотность в неактивных фракциях 5–21, 37, 40–47 (n=26) при измерении посредством тестов с ТТХ и кристаллическим фиолетовым составляла соответственно $0,7 \pm 0,016 \text{ AU}_{540 \text{ нм}}$ ($\sigma = 0,076$) и $1,23 \pm 0,045 \text{ AU}_{570 \text{ нм}}$ ($\sigma = 0,299$; AU — единица оптической плотности). Активные фракции были разделены на две подгруппы в соответствии с антибиопленочной активностью. Большая степень антибиопленочной активности характерна для фракций 28–33, в которых жизнеспособность клеток и толщина биопленки достигают минимального уровня. Здесь оптическая плотность в тестах с ТТХ и кристаллическим фиолетовым в каждой фракции была далеко за пределами порога 3σ для среднего значения оптической плотности в неактивных фракциях. Средние значения оптической плотности с ТТХ ($0,23 \pm 0,067$) и кристаллическим фиолетовым ($0,26 \pm 0,047$) в этих фракциях были также достоверно ниже ($P < 0,001$) по сравнению с неактивными фракциями. Наибольшая активность по уничтожению клеток (подавление 96% по сравнению со средним значением неактивных фракций) наблюдается во

Таблица 4. Активность фракций FLIP7 по уничтожению клеток (анализ с ТТХ) и эрадикации биопленок (анализ с кристаллическим фиолетовым) против биопленок *E. coli* и *S. aureus*

Фракция №	<i>S. aureus</i>				<i>E. coli</i>			
	ТТХ		Анализ с кристаллическим фиолетовым		ТТХ		Анализ с кристаллическим фиолетовым	
	OD	%*	OD	%*	OD	%*	OD	%*
22	1,28		1,09		0,77		1,29	
23	1,44		1,99		0,84		1,11	
24	1,38		0,85		0,71		0,93	
25	1,54		1,08		0,45	64	0,96	
26	1,44		1,14		0,46	66	0,74	
27	1,44		0,81		0,70		0,74	
28	0,08	6	0,22	17	0,05	7	0,17	14
29	0,12	9	0,33	26	0,30	43	0,24	20
30	0,75		0,33	26	0,09	13	0,14	11
31	1,96		1,07		0,24	34	0,12	10
32	1,32		0,57		0,03	4	0,29	24
33	1,09		0,62		0,41	59	0,39	32
34	1,21		1,10		0,47		0,44	36
35	1,23		1,15		0,47		1,26	
36	1,30		1,17		0,47		0,72	
37	1,39		0,56		0,56		0,56	
38	1,53		0,73		0,62		0,73	
39	1,45		1,10		0,62		1,10	

* % от среднего уровня неактивных фракций

doi:10.1371/journal.pone.0173559.t004

фракции 32, тогда как наивысшая активность по уничтожению биопленки (эрадикация 90%) — во фракции 31. В то же время фракции 22–27 и 38–39, активные в анализе ингибирования роста на твердой среде, не показали значимой активности против биопленки *E. coli*.

Эксперименты с биопленкой *S. aureus* 203 показали высокую активность по уничтожению клеток во фракциях 28 и 29 (подавление 94 и 91% по сравнению с неактивными фракциями, соответственно) и уничтожению биопленок во фракциях 28–30 (83–74%). Оптическая плотность неактивных фракций в анализах с ТТХ и кристаллическим фиолетовым составляла, соответственно, $1,3 \pm 0,04 \text{ AU}_{540 \text{ нм}}$ ($\sigma = 0,244$) и $1,26 \pm 0,04 \text{ AU}_{570 \text{ нм}}$ ($\sigma = 0,259$). Эти значения в активных фракциях находятся далеко за пределами порога неактивных фракций 3σ и не могут быть объяснены случайной вариацией. Сравнение средних значений активных ($0,1 \pm 0,02$ и $0,29 \pm 0,037$ для тестов с ТТХ и кристаллическим фиолетовым, соответственно) и неактивных в отношении биопленок фракций подтверждает статистическую значимость этих различий ($P < 0,001$). Несмотря на наличие остаточной активности фракций 26, 27 и 31–37 в отношении планктонной культуры, их влияния на состояние биопленки *S. aureus* не обнаружено.

Масс-спектрометрическая идентификация антибиопленочных соединений FLIP7

Фракции 26, 28–34, демонстрирующие антибиопленочную активность в тестах с ТТХ и/или кристаллическим фиолетовым, были дополнительно исследованы с помощью масс-спектрометрии с электрораспылением, а полученные массы сравнили с массами известных АМП *S. vicina* (таблица 5). Было обнаружено, что фракции 25–26 содержат пептид с массой, идентичной массе доместин-подобного пептида. Было выявлено, что фракции 28 и 29 содержат, помимо других соединений, пролин-богатый пептид (2987 Да) и дефензин (4032 Да) и демонстрируют высокую эффективность уничтожения клеток и эрадикации биопленки как в отношении биопленок *E. coli*, так и *S. aureus*, в особенности фракция 28. Фракция 30 содержала два соединения с массами, соответствующими массам ранее секвенированных АМП *S.*

Таблица 5. Масс-спектрометрические характеристики и профили антибиопленочной активности АМП FLIP7

Фракция	Молекулярные массы АМП, Да		Относительная активность биопленки			
	Найдено в образце	Массы известных пептидов	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
			ТТХ	Кристаллический фиолетовый	ТТХ	Кристаллический фиолетовый
25–26	4442,2	4442,2 (доместицин-подобный пептид) ²	+	-	-	-
28	2986,7		+++	+++	+++	+++
	4032,5	2987,0 (П-богатый) ³				
29	2986,7	4032,0 (дефензин) ³	+	++	+++	++
	4032,5					
30	8886,2	8886,2 (диптерицин) ³	+++	+++	-	++
	8999,4	8999,7 (диптерицин) ³				
31	3483–3631		+	+++	-	-
	6773–6973	Не найдено				
	8468					
32	6773–6798		+++	+	-	-
33	4156	4156,0 (цекропин) ³	+	+	-	-
34	4156		-	+	-	-

¹На основании данных из Таблицы 4

²[36]

³[30]

doi:10.1371/journal.pone.0173559.t005

vicina семейства диптерицина. Эта фракция демонстрировала максимальную активность по уничтожению клеток и уничтожению биопленки против *E. coli* и умеренную активность по уничтожению биопленок, но не уничтожению клеток, против *S. aureus*. Фракции 33–34, среди других соединений, содержали соединение с массой 4156 Да, точно соответствующей массе цекропина — ранее секвенированного АМП *C. vicina*. Фракции 31–32 не содержали известных АМП *C. vicina*, хотя продемонстрировали активность против *E. coli* (но не *S. aureus*). Фракция 31 содержала три группы материалов с массами, указанными в таблице 5. Фракция 32 состояла только из одной группы, которая характеризуется массами, подобными или идентичными только одной группе материалов из фракции 31. Таким образом, фракции 31 и 32, по всей видимости, содержат новую группу АМП. Примечательно, что фракция 31 продемонстрировала преимущественно эрадикационную активность в отношении клеток, в отличие от фракции 32, демонстрирующей, главным образом, активность по уничтожению клеток. Этот факт указывает на присутствие по меньшей мере двух соединений с дополнительной антибиопленочной активностью.

Транскриптомный анализ АМП *C. Vicina*

В дополнение к вышеуказанному масс-спектрометрическому анализу АМП личинок их состав дополнительно анализировали с помощью анализа транскриптома, как описано в разделе «Материалы и методы». Данные анализа доступны по адресу https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?view=search_obj (номер заявки SRR5210297). База данных мРНК, содержащая 1,1 млн записей, была подвергнута скринингу с использованием последовательностей известных АМП *C. vicina* по запросу. В таблице 6 приведены основные результаты анализа базы данных. Анализ выявил две последовательности, названные здесь дефензин 1 и дефензин 2, идентичные дефензинам *C. vicina* [35] и *Lucilia sericata* [47]. Кроме того, мы обнаружили одну последовательность, идентичную цекропину и широкий спектр последовательностей с высоким уровнем сходства с диптерицинами и пролин-богатыми пептидами, ранее выделенными из гемолимфы *C. vicina* [30, 35]. Пул пролин-богатых пептидов включает 47 последовательностей с уровнем сходства 82–86% с ранее секвенированным пептидом ($P < 0,001$). Диптерицин-подобные пептиды присутствуют в 385 последовательностях с уровнем сходства 70–82% с ранее секвенированным диптерицином. Таким образом, в таблице 6 содержится лишь небольшая часть возможного разнообразия диптерицинов и пролин-богатых пептидов.

Таблица 6. Последовательности АМП *S. Vicina*, определенные с помощью транскриптомного анализа и секвенирования пептидов

Пептид	UnitProt ID	Последовательность AA	Источник информации	
			База данных мРНК	Секвенирование пептидов
Дефензин 1	C0HJX7	ATCDLLSGTGANHSACAANCLLRGNRGGYCNGKAVCVCRN	+	+ ¹
Дефензин 2 (Люцифензин-II)	B3EWY5	ATCDLLSGTGIKHSACAANCLLRGNRGGYCNGRAICVCRN	+	-
Цекропин	C0HJX8	GGWLKKGKIERVGGQHTRDATIQGLAVAQQAANVAATAR	+	+ ¹
Диптерицин 1	C0HJX9	DSKPLNLVLPKEEPPNPNQTYGGGGGSRKDDFDVVLQGAQXEV. . (N-концевой)	-	+ ¹
Диптерицин 2		QNKPFKLTLPKEEPKNLPQLYGGGGGSRKQGFVSLGAQKQVWESQNKRHSVDNAGY	+	-
П-богатый 1	C0HJY0	FVDRNRIPRSNNGPKIPIISNP. . (N-концевой)	-	+ ¹
П-богатый 2		FVDRSRRPNSNNGPKIPIISNPPFNMPDLPGRE	+	-
П-богатый 3		FVDRSRRPNSNNGPKIPIISNPPFNPNARPAW	+	-
П-богатый 4		IVDRSRRPNSNNGPKIPIISNPPLIQMPDLPG	+	-
Доместин-подобный пептид		SRDARPVQPRFNPFPKRRERPIIYDAPIRRPGPKTMYA	+	+ ²

¹На основании данных из Таблицы 4

²[36]

³[30]

doi:10.1371/journal.pone.0173559.t005

Цитотоксичность FLIP7 для клеток крови человека

Анализ цитотоксичности с помощью проточной цитометрии на основе дифференциального подсчета некротизированных (пропидиум йодид-положительных, аннексин V-отрицательных) и апоптозных (аннексин V-положительных) клеток, инкубированных в течение 12 часов в культуральной среде, дополненной FLIP7, подтвердил отсутствие прямой токсичности комплекса АМП для лимфоцитов и моноцитов периферической крови человека (таблица 7). Количество некротизированных лимфоцитов и моноцитов оставалось на уровне контрольного варианта.

Дисперсионный анализ также не выявил достоверного влияния на количество некротизированных лимфоцитов и моноцитов во всем диапазоне концентраций в соответствии со значениями P, представленными в таблице.

Подсчет аннексин V-положительных клеток в популяции лимфоцитов также не выявил значимого влияния FLIP7. Однако в популяции моноцитов при концентрации FLIP7 10 мг/мл наблюдалось значительное увеличение числа апоптозных клеток по сравнению с контролем (P = 0,004). Дисперсионный анализ подтверждает достоверное влияние FLIP7 на апоптоз моноцитов в исследуемом диапазоне концентраций

Обсуждение

Результаты исследования комплекса АМП *S. vicina*, представленные в этой статье, наглядно демонстрируют активность комплекса в отношении биопленок с известной антибиотикорезистентностью, образованных патогенными для человека бактериями *E. coli*,

Таблица 7. Число (среднее ± стандартная ошибка) апоптозных (аннексин V-положительных) и некротизированных (пропидиум йодид-положительных и аннексин V-отрицательных) лейкоцитов периферической крови человека на 100 гейтированных клеток после инкубации *in vitro* с FLIP7

FLIP7, мг/мл	Лимфоциты		Моноциты	
	Апоптозные	Некротизированные	Апоптозные	Некротизированные
0	2,5 ± 0,8	0,40 ± 0,136	26,8 ± 5,50	0,57 ± 0,180
0,5	2,2 ± 0,69	0,31 ± 0,139	27,5 ± 6,28	0,38 ± 0,103
5	2,2 ± 0,40	0,76 ± 0,263	40,4 ± 12,70	0,31 ± 0,077
10	3,5 ± 0,84	0,46 ± 0,183	71,7 ± 10,91	0,23 ± 0,049
P	0,817	0,384	0,009	0,207

doi:10.1371/journal.pone.0173559.t007

S. aureus и *A. baumannii*. Однако повышение резистентности биопленок по сравнению со степенью резистентности планктонных клеток значительно зависит от вида микроорганизма. Рост, количественно определяемый отношением $MVIC_{90}/MIK$, ничтожно мал у *S. aureus* (от нуля до двух), умеренный (три — десять раз) у *E. coli* и значительный (18–51 раз) в штаммах *A. baumannii*. Тем не менее, степень резистентности биопленок к ряду антибиотиков сравнения в большинстве случаев была значительно выше (в 24–667 раз), чем значения комплекса. Активность FLIP7 в основном привлекает своим соотношением $MVBC/MIK$ по сравнению со стандартными антибиотиками, а не абсолютным значением МИК. Другим ключевым преимуществом комплекса является его способность блокировать развитие резистентности у грамотрицательных бактерий [30]. Не менее важно, что комплекс активен как в отношении планктонных бактерий, так и в отношении биопленок. Поскольку каждая бактериальная инфекция инициируется свободноживущими клетками и в большинстве случаев далее образуется биопленка, это позволяет при помощи комплекса контролировать разные стадии развития болезни. Активность комплекса в отношении биопленок включает в себя два согласованных процесса: уничтожение клеток и разрушение матрикса, — которые происходят при одинаковых пороговых концентрациях комплекса и, следовательно, могут препятствовать распространению выживших бактерий за пределы очага инфекции после разрушения матрикса.

Антибиопленочная функция комплекса обусловлена действием по меньшей мере пяти полностью секвенированных пептидов, обозначенных в этой статье как дефензин 1, цекропин, диптерицин 1, пролин-богатый пептид 1 и доместицин-подобные пептиды *Calliphora* (таблица 6). Те же самые АМП были выявлены у *C. vicina* с использованием в качестве тестовой системы планктонных бактерий [30, 35,36]. Диптерицин 1 ранее был секвенирован лишь частично, теперь же доступна его полная последовательность. Более того, полученные данные продемонстрировали наличие некоторых дополнительных АМП против *E. coli*, которые нуждаются в последующем изучении. Таким образом, комплекс содержит по меньшей мере 7 АМП, которые синтезируются и накапливаются в гемолимфе личинок в ответ на бактериальную инфекцию (таблица 5). Секвенированные пептиды относятся к четырем семействам катионных АМП: дефензины, цекропины, диптерицины и пролин-богатые пептиды, соответственно. Дефензины, цекропины и пролин-богатые пептиды — широко распространенные и хорошо изученные АМП насекомых [17, 18]. Дефензины представляют собой группу АМП, содержащих элементы альфа-спираль / бета-лист, связанные тремя дисульфидными мостиками и известные своей избирательной активностью в отношении грамположительных бактерий. Цекропины представляют собой линейные амфипатические альфа-спиральные АМП, избирательно активные в отношении грамотрицательных бактерий. Диптерицины являются членами семейства глицин-богатых АМП, избирательно токсичных для некоторых грамотрицательных энтеробактерий, таких как *E. coli*, за счет разрушения клеточной стенки [38]. Пролин-богатые пептиды *C. vicina* относятся к группе пролин-/аргинин-богатых АМП, которые, как известно, убивают бактерии, нарушая синтез ДНК и/или белка [39]. Таким образом, комплекс АМП *C. vicina* состоит из трех структурно различных групп АМП, разрушающих клеточную стенку и ориентированных преимущественно на клеточные мембраны грамотрицательных (цекропины, диптерицины) или грамположительных (дефензины) бактерий, и одной группы, влияющей на внутриклеточные механизмы (пролин-/аргинин-богатые пептиды).

Биотестирование хроматографических фракций комплекса показало, что все выявленные семейства АМП обладают антибиопленочной активностью двух типов: уничтожение клеток (определяемое анализом с ТТХ) и разрушение матрикса (определяемое анализом с кристаллическим фиолетовым). Однако соотношение данных видов воздействия и активности в отношении биопленок, образованных различными типами бактерий, для каждого семейства индивидуальны. Хроматографические фракции, содержащие дефензин 1 и пролин-богатые пептиды 1, обеспечивали большую часть антистафилококковой активности и значительную долю активности против *E. coli*. Фракции, содержащие цекропин, диптерицин и доместицин-подобные пептиды, а также неопознанные АМП, были избирательно активны в отношении биопленок *E. coli*, но не *S. aureus*. Разнообразный состав АМП, токсичных для *E. coli*, соответствует массовому распространению энтеробактерий и родственных им видов грамотрицательных бактерий в естественных местах обитания *C. vicina*.

Анализ состава АМП *C. vicina* демонстрирует сложный характер этой системы защиты. На самом деле он может быть еще более сложным. Анализ транскриптома выявил около 500

изоформ мРНК, кодирующих последовательности всех четырех семейств АМП. Одно из этих семейств — семейство диптерицинов — содержит не менее 385 изоформ мРНК, содержащих последовательности из пяти глициновых остатков, типичные для диптерицинов насекомых, и демонстрирует 70–82% сходство последовательностей с ранее секвенированным диптерицином 1 *C. vicina*. Не все обнаруженные мРНК формируют АМП. Например, мы обнаружили мРНК *C. vicina*, кодирующую люцифензин-II — дефензин другого вида мух *Lucilia sericata* [47], но не нашли сам пептид. Нет никакого сомнения в том, что многие другие мРНК, кодирующие АМП, также являются «молчащими», как это было продемонстрировано у некоторых насекомых [29, 48]. Другие мРНК могут кодировать пептиды, не имеющие антимикробной активности. Тем не менее мы не можем исключить, что комплекс содержит больше АМП, чем обнаружено на сегодняшний день.

АМП считаются потенциально перспективными препаратами для борьбы с биопленками [31–33]. Согласно данным, представленным в этой статье, к этому списку можно добавить дефензины, диптерицины, цекропины и пролин-богатые пептиды *C. vicina*. Однако природа, по всей видимости, не напрасно использует многокомпонентные комплексы, а не отдельные АМП. В дополнение к вышеупомянутым преимуществам, это позволяет иммунной системе использовать синергетическую активность различных АМП. Синергия в литературе неоднократно описана в отношении комбинации двух [27–29] или трех [49] АМП. Важной задачей остается анализ более сложных комбинаций. Не менее важно, что для того, чтобы стать лекарством, полученная синергетическая комбинация должна обладать и рядом других качеств. Это сильно затрудняет разработку терапевтических комбинаций АМП. Изучение природных комплексов АМП может быть очень полезным для решения этой проблемы. Особенно перспективными с этой точки зрения являются комплексы АМП *C. vicina* и других мух, живущих в среде с высочайшей концентрацией патогенной для человека микрофлоры [25]. Информация о структуре и свойствах антимикробных комбинаций выдержала тщательное и беспристрастное исследование естественным отбором и, более того, личинки *C. vicina* могут поставлять необходимые компоненты для производства таких комбинаций. Методы биосинтеза комплекса АМП *C. vicina in situ* и *in vitro* делают его технически и экономически целесообразным [25, 36]. В будущем этот и подобные природные комплексы АМП могут применяться в различных областях медицины, от лечения обычных бактериальных инфекций до лечения хронических воспалительных заболеваний и рака. Наиболее перспективным является их использование для лечения и профилактики заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными биопленками.

Благодарности

Авторы выражают благодарность ресурсным центрам «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Химический анализ и исследование материалов» и «Коллекции культур микроорганизмов» научного парка Санкт-Петербургского государственного университета за техническую помощь в осуществлении анализов транскриптома, масс-спектрометрии, проточной цитометрии и световой микроскопии.

Вклад авторов

Формирование общей концепции: С. Ч.

Курирование данных: А. К.

Формальный анализ: А. К., Д. Б., Н. Г., Д. Т., К. Р., С. Ч.

Получение финансирования: С. Ч.

Исследование: Н. Г., А. Я., Д. Т., А. К., Е. П., Т. С.

Методология: Н. Г., Д. Т., С. Ч., А. Я.

Администрирование проекта: С. Ч.

Ресурсы: Т. С., Н. Г.

Программное обеспечение: Д. Б., А. К.

Контроль: С. Ч.

Валидация: Н. Г., С. Ч.

Написание — оригинальная версия: С. Ч.

Написание — рецензирование и редакция: К. Р.

References

- Leid JG. Bacterial biofilms resist key host defenses. *Microbe*. 2009; 4(2): 66–70.
- Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35: 322–332. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011) PMID: [20149602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20149602/)
- Dufour D, Leung V, Levesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 2012; 22: 2–16.
- Romling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies (Review). *J Intern Med*. 2012; 272: 541–561. doi: [10.1111/joim.12004](https://doi.org/10.1111/joim.12004) PMID: [23025745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23025745/)
- Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol*. 2015; 198(1): 1–15. doi: [10.1007/s00203-015-1148-6](https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6) PMID: [26377585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26377585/)
- Pinto-Santini D, Salama NR. The biology of *Helicobacter pylori* infection, a major risk factor for gastric adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 2005; 14: 1853–1858.
- Collins D, Hogan AM, Winter DC. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011; 12(5): 504–512. doi: [10.1016/S1470-2045\(10\)70186-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70186-8) PMID: [21067973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21067973/)
- Johnson CH, Dejea CM, Edler D, Hoang LT, Santidrian AF, Felding BH, et al. Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis. *Cell Metab*. 2015; 21(6): 891–897. doi: [10.1016/j.cmet.2015.04.011](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.011) PMID: [25959674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25959674/)
- Cohen RJ, Shannon BA, McNeal JE, Shannon T, Garrett KL. Propionibacterium acnes associated with inflammation in radical prostatectomy specimens: a possible link to cancer evolution? *J Urol*. 2005; 173: 1969–1974. doi: [10.1097/01.ju.0000158161.15277.78](https://doi.org/10.1097/01.ju.0000158161.15277.78) PMID: [15879794](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15879794/)
- Rao VP, Poutahidis T, Ge Z, Nambiar PR, Boussahmain C, Wang YY, et al. Innate immune inflammatory response against enteric bacteria *Helicobacter hepaticus* induces mammary adenocarcinoma in mice. *Cancer Res*. 2006; 66: 7395–7400. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-06-0558](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0558) PMID: [16885333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16885333/)
- Zhan P, Suo LJ, Qian Q, Shen XK, Qiu LX, Yu LK, Song Y. Chlamydia pneumoniae infection and lung cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2011; 47: 742–747. doi: [10.1016/j.ejca.2010.11.003](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.11.003) PMID: [21194924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21194924/)
- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002; 415: 389–395. doi: [10.1038/415389a](https://doi.org/10.1038/415389a) PMID: [11807545](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11807545/)
- Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. 2006; 24: 1551–1557. doi: [10.1038/nbt1267](https://doi.org/10.1038/nbt1267) PMID: [17160061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17160061/)
- Peters BM, Shirtliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog*. 2010; 6(10): e1001067. Available from: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1001067> doi: [10.1371/journal.ppat.1001067](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001067) PMID: [21060861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21060861/)
- Pletzer D, Coleman SR, Hancock RE. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin in Microbiol*. 2016; 33: 35–40.
- Fox JL. Antimicrobials stage a comeback. *Nat Biotechnol*. 2013; 31: 379–382. doi: [10.1038/nbt.2572](https://doi.org/10.1038/nbt.2572) PMID: [23657384](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23657384/)
- Bulet P, Stöcklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett*. 2005; 12(1): 3–11. PMID: [15638797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15638797/)
- Mylonakis E, Podsiadlowski L, Muhammed M, Vilcinskas A. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2016; 371(1695). Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2015.0290>
- Hull R, Katete R, Ntwasa M. Therapeutic potential of antimicrobial peptides from insects. *Biotechnol Mol Biol Rev*. 2012; 7: 31–47.
- Ratcliffe N, Azambuja P, Mello CB. Recent advances in developing insect natural products as potential modern day medicines. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2014. Article ID 904958. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/904958>

21. Tonk M, Vilcinskas A, Rahnamaeian M. Insect antimicrobial peptides: potential tools for the prevention of skin cancer. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100: 7397–7405. doi: [10.1007/s00253-016-7718-y](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7718-y) PMID: [27418360](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27418360/)
22. Bell G, Gouyon PH. Arming the enemy: the evolution of resistance to self-proteins. *Microbiology*. 2003; 149: 1367–1375. doi: [10.1099/mic.0.26265-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.26265-0) PMID: [12777478](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12777478/)
23. Habets MG, Brockhurst MA. Therapeutic antimicrobial peptides may compromise natural immunity. *Biol Lett*. 2012; 8: 416–418. doi: [10.1098/rsbl.2011.1203](https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.1203) PMID: [22279153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22279153/)
24. Napier BA, Burd EM, Satola SW, Cagle SM, Ray SM, McGann P, et al. Clinical use of colistin induces cross-resistance to host antimicrobials in *Acinetobacter baumannii*. *mBio*. 2013; 4(3). Available from: <http://mbio.asm.org/content/4/3/e00021-13.full>
25. Chernysh SI, Gordja NA. The immune system of maggots of the blow fly (*Calliphora vicina*) as a source of medicinal drugs. *J Evol Biochem Physiol*. 2011; 47(6): 524–533.
26. McCafferty DG, Cudic P, Yu MK, Behenna DC, Kruger R. Synergy and duality in peptide antibiotic mechanisms. *Curr Opin Chem Biol*. 1999; 3: 672–680 PMID: [10600730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10600730/)
27. Yan H, Hancock RE. Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(5): 1558–1560. doi: [10.1128/AAC.45.5.1558-1560.2001](https://doi.org/10.1128/AAC.45.5.1558-1560.2001) PMID: [11302828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11302828/)
28. Rahnamaeian M, Cytryńska M, Zdybicka-Barabas A, Dobszlaff K, Wiesner J, Twyman RM, et al. Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. *Proceedings of the Royal Society B*. 2015; 282: 20150293. Available from: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/282/1806/20150293> doi: [10.1098/rspb.2015.0293](https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0293) PMID: [25833860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25833860/)
29. Pöppel AK, Vogel H, Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59: 2508–2514. doi: [10.1128/AAC.05180-14](https://doi.org/10.1128/AAC.05180-14) PMID: [25666157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25666157/)
30. Chernysh SI, Gordya NA, Suborova TN. Insect antimicrobial peptide complexes prevent resistance development in bacteria. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0130788. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130788> doi: [10.1371/journal.pone.0130788](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130788) PMID: [26177023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26177023/)
31. Batoni G, Maisetta G, Esin S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1858(5): 1044–60. doi: [10.1016/j.bbammem.2015.10.013](https://doi.org/10.1016/j.bbammem.2015.10.013) PMID: [26525663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26525663/)
32. Luca M, Maccari G, Nifosi R. Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. *Pathog Dis*. 2014; 70: 257–270. doi: [10.1111/2049-632X.12151](https://doi.org/10.1111/2049-632X.12151) PMID: [24515391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24515391/)
33. Stempel N, Strehmel J, Overhage J. Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Curr Pharm Des*. 2015; 21(1): 67–84. PMID: [25189860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25189860/)
34. Sherman RA. Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here? *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014. Article ID 592419. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/592419>
35. Chernysh SI, Gordya NA, Simonenko NP. Diapause and immune response: induction of antimicrobial peptides synthesis in the blowfly, *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera, Calliphoridae). *Entomol Sci*. 2000; 3: 139–144.
36. Yakovlev AY, Nesin AP, Simonenko NP, Gordya NA, Tulin DV, Kruglikova AA, et al. Fat body and hemocyte contribution to the antimicrobial peptide synthesis in *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera: Calliphoridae) larvae. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2016.
37. Chernysh SI, Kim SI, Bekker G, Pleskach VA, Filatova NA, Anikin VB, et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(20): 12628–12632. doi: [10.1073/pnas.192301899](https://doi.org/10.1073/pnas.192301899) PMID: [12235362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12235362/)
38. Keppi E, Pugsley AP, Lambert J, Wicker C, Dimarcq JC, Hoffmann JA, et al. Mode of action of dipterin A, a bactericidal peptide induced in the hemolymph of *Phormia terranova* larvae. *Arch Insect Biochem Physiol*. 1989; 10: 229–239.
39. Nicolas P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J*. 2009; 276: 6483–6496. doi: [10.1111/j.1742-4658.2009.07359.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07359.x) PMID: [19817856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19817856/)
40. Nesin AP, Simonenko NP, Numata H, Chernysh SI. Effects of photoperiod and parental age on the maternal induction of larval diapause in the blowfly, *Calliphora vicina*. *Appl Entomol Zool*. 1995; 30: 351–356.
41. Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schäffer AA, et al. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J*. 2005; 272: 5101–5109. doi: [10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x) PMID: [16218944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16218944/)

42. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985; 22(6): 996–1006. PMID: [3905855](#)
43. Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14(1): 49–54. doi: [10.1111/j.1469-0691.2007.01842.x](#) PMID: [18005176](#)
44. Knezevic P, Petrovic OA. Colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J Microbiol Methods.* 2008; 74(2–3): 114–118. doi: [10.1016/j.mimet.2008.03.005](#) PMID: [18433900](#)
45. Palm-Apergi C, Hällbrink M. A new rapid cell-penetrating peptide based strategy to produce bacterial ghosts for plasmid delivery. *J Control Release.* 2008; 132(1): 49–54. doi: [10.1016/j.jconrel.2008.08.011](#) PMID: [18786580](#)
46. Kacprzyka L, Rydengård V, Mörgelinc M. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta—Biomembranes.* 2007; 1768(11): 2667–2680.
47. Cerovsky V, Zdarek J, Fucik V, Monincova L, Voburka Z, Bem R. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67: 455–466. doi: [10.1007/s00018-009-0194-0](#) PMID: [19921400](#)
48. Riddell CE, Garces JDL, Adams S, Barribeau SM, Twell D, Mallon EB. Differential gene expression and alternative splicing in insect immune specificity. *BMC Genomics.* 2014; 15: 1031. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/1031> doi: [10.1186/1471-2164-15-1031](#) PMID: [25431190](#)
49. Yu G, Baeder DY, Regoes RR, Rolff J. Combination effects of antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60: 1717–1724. doi: [10.1128/AAC.02434-15](#) PMID: [26729502](#)